

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Dosagem urinária de 6-sulfatoximetatonina como predição da eficácia  
terapêutica de antidepressivo**

JULIO CARLOS PEZZI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria Paz Loayza Hidalgo, PhD

Orientadora

Porto alegre, 15 de dezembro de 2009

P522d **Pezzi, Julio Carlos**

Dosagem urinária de 6-sulfatoximetatonina como predição da eficácia terapêutica de antidepressivo / Julio Carlos Pezzi ; orient. Maria Paz Hidalgo. – 2009.

53 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Antidepressivos 2. Resultado de tratamento 3. Melatonina 3.

Marcadores biológicos 4. Urina I. Hidalgo, Maria Paz Loayza II. Título.

NLM: QV 77.5

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

"E aqueles que foram vistos dançando foram julgados  
insanos por aqueles que não podiam ouvir a música."

(Friedrich Nietzsche)

## Agradecimentos

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Cronobiologia Humana pela aprendizagem nesse atribulado período que me tornou mestre. Nessa trajetória, encontrei pessoas que me fizeram amadurecer, decidir por caminhos certos, bem como amizades que levarei para o resto da vida.

Muito obrigado a minha família e a todos aqueles que sempre estiveram do meu lado e sei que sempre estarão.

Em especial, gostaria de agradecer a **Associação de Psiquiatria do Rio Grande do Sul (APRS)**, a qual me concedeu a Primeira Colocação no I Prêmio Cyro Martins de Incentivo à Pesquisa, prêmio cujo um dos requisitos refere-se ao projeto de pesquisa que originou esse trabalho.

## Sumário

Resumo .....	6
Introdução.....	8
Revisão da Literatura .....	10
Objetivos.....	19
Referências Bibliográficas .....	20
Artigo Submetido .....	23
Considerações Gerais .....	45
Anexos .....	47

## Resumo

**Introdução:** Estudos baseados na teoria monoaminérgica da depressão tem hipotetizado que a produção de melatonina está alterada no transtorno depressivo, como consequência de distúrbios na transmissão de noradrenalina. Seguindo essa idéia, outros estudos têm encontrado que o tratamento com antidepressivos aumentaria a excreção de 6-sulfatoximelatonina (aMT6s), metabólito da melatonina e possível marcador de atividade simpática, em pacientes deprimidos, livres de tratamento.

**Objetivos:** Avaliar a relação entre a excreção de aMT6s nas primeiras 24 horas de tratamento com nortriptilina e a resposta clínica medida duas e oito semanas após.

**Métodos:** Participaram do estudo 23 mulheres com diagnóstico de episódio depressivo atual (SCID-I) livres de medicação. Iniciou-se tratamento com nortriptilina seguindo-se por 8 semanas (aumento fracional da dose conforme necessidade clínica), sendo a gravidade dos sintomas avaliada pela Escala Hamilton Depressão (HAM-D) antes do tratamento, e na segunda e oitava semanas após. Foi realizada coleta de urina de 24 horas um dia antes e um dia após o início do tratamento. Após aliquotagem das amostras em quatro períodos (08h00-12h00, 12h00-18h00, 18h00-00h00 e 00h00-06h00) foi dosada 6-sulfatoximelatonina (sMT6a).

**Resultados:** O período de maior excreção da aMT6s ocorreu entre a 00h00-06h00, conforme confirmação por análises *Post hoc* (Bonferroni) ( $p < 0.05$ ). Esse aumento durante o período da madrugada ocorreu antes ( $p < 0.05$ ) e após ( $p < 0.05$ ) o início da medicação. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a excreção de aMT6 antes e após o início de nortriptilina ( $r = 0.76; p < 0.01$ ), mas não entre excreção de aMT6 antes da droga e aumento fracional dessa ( $r = -0.33; p = 0.88$ ).

**Conclusão:** Nesse estudo foi observado que após o primeiro dia de uso da nortriptilina por pacientes deprimidos livres de medicação há um aumento na excreção urinária do metabólito da melatonina aMT6s. Isso corrobora com a hipótese de que a excreção de aMT6s durante a madrugada sugere um aumento na produção de melatonina pineal possivelmente relacionada com o efeito farmacológico da nortriptilina. Dessa forma a aMT6s poderia ser um interessante marcador de resposta terapêutica.

## Introdução

O transtorno depressivo é um problema de saúde pública, devido a sua alta prevalência e ao declínio na qualidade de vida e no funcionamento global que acarretam ao paciente [1]. É uma doença de origem multifatorial e, muito provavelmente, reflete uma adaptação a mudanças na neurotransmissão monoaminérgica.

A eficácia terapêutica dos antidepressivos requer quatro semanas de administração contínua e, em geral, espera-se oito semanas para modificar a conduta terapêutica. O início da psicofarmacoterapia é empírico, muitas vezes baseado em critérios subjetivos, como perfil de efeitos adversos da medicação. Estudos prévios mostram significativa correlação entre o aumento da excreção do principal metabólito urinário da melatonina, a 6-sulfatoximelatonina (SMT6a) no primeiro dia de tratamento e resposta terapêutica positiva de antidepressivos inibidores da captação de noradrenalina[2]. O aumento da produção de melatonina pela pineal é o resultado da maior atividade simpática em resposta ao bloqueio da captação neuronal do neurotransmissor. Como observado em estudos em animais, esse efeito seria observado apenas no primeiro dia, ou eventualmente no segundo dia de tratamento, sendo posteriormente compensado por alterações pré e pós-sinápticas. Além disso, recentemente foi demonstrada uma variabilidade individual da atividade do sistema nervoso simpático em humanos [3]. Desta forma, essa pesquisa foi desenhada com o intuito de se estabelecer o valor preditivo da concentração urinária de 6-sulfatoximelatonina como sinalizador de resposta terapêutica aos antidepressivos tricíclicos.

A confirmação da hipótese preditiva do teste será de grande valia para a prática



médica, uma vez que um teste simples predizerá precocemente quais pacientes serão responsivos à terapêutica com antidepressivos, possibilitando então, modificar o tratamento dos possíveis não respondedores já no início do tratamento, evitando o transtorno de um tratamento prolongado e ineficiente.

## Revisão da Literatura

Sintomas depressivos são universalmente sentidos por quase todas as pessoas em algum momento da vida. A distinção desse sentimento normal de uma doença é o que se denomina transtorno depressivo e requer tratamento. O transtorno depressivo é uma doença debilitante e potencialmente fatal, que causa um alto custo econômico e social para o paciente, a família e a sociedade [4]. Além disso, a depressão encontra-se entre as quatro doenças crônicas que mais determinam incapacidade [5-7], além de estar relacionada à maior prevalência de infarto do miocárdio, diminuição da imunidade, *diabetes mellitus*, dentre outras patologias crônicas [8]. A prevalência desse transtorno na população geral varia de 5 a 13%, com média de 10% em serviços de atenção primária de saúde [9]. O transtorno depressivo costuma cursar com humor depressivo, anedonia, diminuição do apetite, insônia ou hipersonia, tendo que perdurar no mínimo por duas semanas, por praticamente todos os dias. Além disso, é observada diminuição acentuada da atividade motora ou grande inquietação, perda de energia e fadiga, sentimento de culpa e de inutilidade, diminuição da capacidade de concentração e alta frequência de ideação suicida [10]. No curso da doença, os sintomas estão associados ao maior número de visitas médicas aos serviços públicos de saúde, à solicitação de benefícios por incapacidade e ao maior número de tentativas de suicídio [11]. Os episódios depressivos duram, em geral, cerca de alguns meses, havendo períodos de normalidade entre os mesmos. É importante ressaltar que resposta é considerada a melhora em pelo menos 50% de redução de sintomas. Por outro lado, remissão é a denominação usada quando os sintomas desaparecem e não apenas 50% deles. Quando a remissão perdura por 6 a 12 meses, é considerado recuperação ou remissão completa [12].

A fisiopatologia da depressão é um processo complexo e envolve alterações neuroquímicas ligadas aos neurotransmissores noradrenalina, serotonina e dopamina[13]. A primeira teoria de importância sobre a etiologia da depressão postulou que esta era devida à deficiência de neurotransmissores monoaminérgicos, principalmente a noradrenalina (NA) e a serotonina (5HT). As evidências eram empíricas, relativamente simples: determinadas drogas que depletavam esses neurotransmissores poderiam induzir depressão e os antidepressivos conhecidos na época (tricíclicos e inibidores da MAO) tinham ações farmacológicas que potencializavam tais neurotransmissores [14]. Portanto, a idéia era de que a quantidade “normal” de neurotransmissores monoaminérgicos tornava-se depletada, talvez por meio patológico, ou induzido por drogas, ocasionando sintomas depressivos. A hipótese monoaminérgica da depressão embora pareça simplificada, foi de suma importância em focar a atenção sobre os três sistemas de neurotransmissão dessa via: noradrenalina, dopamina e serotonina [15].

De mais a mais, fisiologicamente, a noradrenalina está envolvida na regulação do tônus simpático, no estado de vigília, nos estados afetivos, em processos de memória e aprendizado, na reatividade ao estresse ambiental, nas funções endócrinas [16]. Já a serotonina mostra-se importante na determinação do comportamento alimentar, sistema de recompensa, humor e ansiedade [17].

Entre os efeitos adaptativos, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que resultam em hipercortisolismo podem gerar alterações no sistema serotoninérgico implicado na origem e desenvolvimento da depressão [16, 18]. O aumento crônico dos níveis de colesterol, por sua vez, acaba levando a uma dessensibilização dos receptores hipotalâmicos para cortisol/corticosterona, o que resulta em uma perda do sistema de retroalimentação negativa através do controle da produção de hormônio

corticotrófico (CRH) [19]. Além disso, a redução de corticotrofina reduz o número de sinapses e a velocidade de neurotransmissão [20].

Apesar de ser pouco conhecido todos os passos envolvidos no processo etiológico da depressão, sabidamente a expressão de receptores de serotonina na membrana, principalmente receptores do tipo 5HT<sub>1B</sub>, faz parte deste quadro complexo. Um trabalho recente [21], publicado na *Science*, é uma ilustração da problemática da evolução de uma área multifatorial. Os autores propuseram que uma proteína adaptadora (p11), é responsável pela expressão de receptores 5HT<sub>1B</sub> na membrana plasmática, e que ela está reduzida em cérebros de pacientes deprimidos. Sua implicação na fisiopatologia da depressão é corroborada por dados experimentais em ratos submetidos a modelos de indução de depressão nos quais antidepressivos e eletroconvulsoterapia promoveram um aumento significativo da expressão desta proteína. No mesmo ano, foi publicado um artigo mostrando que dados anteriores da literatura apresentavam o mesmo resultado, mas usavam outra forma de denominação da proteína adaptadora: S100A10 [22].

Diante disso, fica evidente que o estabelecimento de um quadro de depressão é um fenômeno crônico, multifatorial que envolve uma série de adaptações de médio e longo prazo, levando as alterações de neurotransmissão e hormonais.

Com relação ao tratamento da depressão, sabe-se que os antidepressivos são eficazes, mas não são todos os pacientes que se beneficiam deles. Além disso, apenas aproximadamente dois em cada três pacientes com depressão responderão a qualquer antidepressivo, enquanto apenas um de três responderão ao placebo [15]. Estudos de seguimento de pacientes deprimidos, após um ano de tratamento clínico, revelam que aproximadamente 40% ainda terão o mesmo diagnóstico, 40% não terão diagnóstico e o restante se recuperará parcialmente ou desenvolverá o diagnóstico de distímia [1].

Nas décadas de 1970 a 1980, os critérios diagnósticos de depressão começaram a focar a tentativa de identificar quais pacientes deprimidos seriam os melhores candidatos para os tratamentos antidepressivos disponíveis. Durante esse período, a ideia era a de que poderia haver um subtipo de deprimidos unipolares que seria especialmente reativo a antidepressivos e outros que não seriam. Dizia-se que o primeiro grupo teria um tipo de depressão biológica, respondendo bem a medicação e outro que teria uma depressão caracteriológica ou de origem neurótica que responderia a psicoterapia e não a psicofármacos [23]. Hoje, é reducionista pensar dessa forma. Entretanto, a dúvida com relação à eficácia a antidepressivos persiste.

A maioria dos antidepressivos conhecidos são substâncias que alteram a disponibilidade de serotonina, noradrenalina ou ambas na fenda sináptica [22]. O efeito terapêutico destas drogas, embora tenha latência de duas a quatro semanas para se instalar, é lento, já que para remissão total dos sintomas são necessárias mais que oito semanas. Em muitos casos, após a espera de dois meses e a verificação da falta de resposta terapêutica, há a necessidade de se alterar a conduta. Essa longa espera e o reinício de uma terapia, sem um indicativo de sucesso, apresenta um componente de reforço da doença e também de grande perturbação nos familiares e pessoas diretamente envolvidas com os pacientes. Pode-se supor que a melhora da compreensão prognóstica da doença auxiliaria no aumento da eficácia terapêutica e na redução dos custos do tratamento, pois atualmente os pacientes deprimidos classificados como refratários consomem a metade dos recursos dispensados para o tratamento do transtorno [24, 25].

Portanto, o desafio de uma previsão terapêutica é determinar testes laboratoriais que possam detectar algumas alterações passíveis de serem facilmente determinadas. Na literatura, são escassas publicações e pesquisas no campo da predição de

antidepressivos. Um artigo recente mostrou que SNPs (Single-nucleotide polymorphisms) nos genes FKBP5, GRIK4 e HTR2A mostram associação com resposta ao uso de citalopram [26]. Outra pesquisa estudou um polimorfismo no gen da Monoaminoxidase A (MAOA), associando-o a resposta positiva no tratamento da depressão maior com o uso de mirtazipina [20]. Esse gen é o regulador da expressão da enzima monoaminoxidase. No entanto, esses estudos são demasiadamente caros, necessitando ainda de validação em diversos tipos de populações para boa validade.

O estudo da relação entre depressão e a pineal é bastante antigo, e algo frustrante. O foco de avaliação sempre foi verificar se havia alteração do padrão de secreção de melatonina em pacientes deprimidos e se estas alterações poderiam estar correlacionadas com distúrbios de sono. Sendo a produção de melatonina sujeita às variações sazonais e genéticas e a depressão uma afecção determinada por multifatores, a literatura apresenta resultados controversos, e muitas vezes apenas descritivos [27].

A glândula pineal é parte integrante do sistema de temporização endógeno e produz melatonina no escuro, sinalizando a ocorrência da noite e sua duração. No sistema de temporização endógena a informação fóptica captada pelas células granulares da retina, através das células que expressam melanopsina é transmitida diretamente para os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo. Estas células não transmitem a informação fóptica para o córtex e, portanto, não estão envolvidas no processo de visão, mas sim no processo de percepção do claro e do escuro [28]. Os núcleos supraquiasmáticos são o principal oscilador endógeno que marca aproximadamente 24 horas, sendo também chamados de relógio biológico. Estes se projetam via o núcleo paraventricular para os neurônios simpáticos do núcleo intermediolateral do segmento superior da medula espinhal torácica. Destes núcleos,

as fibras entram no tronco simpático fazendo sinapse com células nervosas do gânglio cervical superior que inervam diretamente a pineal. Este circuito elétrico é desligado quando há incidência de luz, visto que não são disparados potenciais de ação a partir dos núcleos supraquiasmáticos. Na vigência do escuro, essa via entra em ação e a noradrenalina liberada atua sobre adrenoceptores localizados nos pinealócitos desencadeando a ativação da via biossintética da melatonina [29]. (Figura 1A – Anexos)

A melatonina é sintetizada a partir da serotonina, que é acetilada formando o intermediário N-acetilserotonina, que ao ser metilado se transforma em 5-metoxiN-acetilserotonina, ou seja a melatonina. Esta é uma molécula com alto coeficiente de partição óleo-água que atinge a corrente sanguínea de forma imediata, sem ser estocada. A melatonina é metabolizada no fígado em hidroximelatonina, que pode ser sulfatada ou glicuronada. (Figura 2A – Anexos) Apesar de a melatonina poder ser produzida por outros tecidos (mucosa estomacal) ou células (linfócitos, macrófagos e células do colostro), o pico noturno de melatonina é a real expressão da atividade pineal, ou seja, da atividade simpática [3]. Desta forma, a razão entre a produção noturna e diurna de melatonina é um marcador da atividade simpática.

Apesar de ocorrerem variações entre os animais de experimentos usados neste campo e o homem os mecanismos fisiológicos e celulares têm-se mostrado altamente conservados. Variações importantes são encontradas apenas em nível molecular, sugerindo fortemente que a regulação da transcrição gênica é diferente entre as espécies. Recentemente foi comprovado que em humanos o ritmo diário de melatonina é resultante da inervação simpática da glândula pineal. Moller e colaboradores examinaram a excreção de 6-sulfatoximelatonina em nove pacientes submetidos à simpatectomia bilateral na altura do segundo gânglio torácico para o tratamento de

hiperidrose das palmas das mãos [30]. Em cinco dos nove pacientes o incremento noturno de melatonina foi totalmente eliminado, e em apenas três houve a manutenção do ritmo observado antes da cirurgia. Esta discrepância foi atribuída a uma variação na distribuição anatômica dos nervos que emergem da medula espinhal, visto que em alguns humanos a saída é superior ao local onde foi realizada a secção. Corroborando esta hipótese encontramos os achados de Zeitzer e colaboradores obtidos em pacientes com injúria completa da medula espinhal cervical (tetraplegia) [31]. Estes pacientes apresentam paralisia oculosimpática e ausência de secreção noturna de melatonina. Assim, como observado nas outras espécies, em humanos a produção de melatonina é uma função da atividade simpática e, portanto, da liberação de noradrenalina.

Durante a infância, a produção noturna de melatonina cai progressivamente até em torno de 80% quando os níveis da vida adulta são atingidos [32]. Durante a maior parte da vida adulta, a concentração de melatonina no plasma [33] e de SMT6a na urina mantém-se constante [2] decaindo na idade avançada.

Estudos populacionais com grande número de indivíduos para normalização dos dados de distribuição da concentração de melatonina ainda são escassos. Recentemente foi realizado um grande estudo sobre a concentração de melatonina em indivíduos normais, conduzido durante o período de um ano, em várias regiões geográficas. Neste estudo, Wetterberg e colaboradores observaram que as mulheres secretavam mais melatonina que os homens [32]. Foi observado ainda que a concentração de melatonina na população como um todo poderia ser dividida em dois padrões: aqueles que secretavam altas concentrações deste hormônio, definido por concentrações anuais maiores que 0,25 nmol/L e aqueles que secretavam baixas concentrações. Como nenhum fator demográfico como sexo, idade, altura, peso,



estação do ano foi responsável por essa diferença, os autores sugeriram que este padrão provavelmente reflete uma variabilidade genética nos níveis de secreção de noradrenalina, já que a produção de melatonina é regulada via um sinal simpático e/ou na atividade das enzimas de síntese de melatonina, N-acetilserotonina/hidroxi-indol-O-metil transferase, durante a noite [34]. A variabilidade na resposta a antidepressivos em indivíduos com fenótipos depressivos semelhantes poderia estar associada a uma variabilidade na atividade simpática. Desta forma, uma droga que atua primariamente através do bloqueio da captação neuronal de noradrenalina teria um efeito muito reduzido quando a atividade simpática fosse menor que a média da população.

No nosso estudo foi utilizada a nortriptilina. Foi preferida a outros antidepressivos, por ser uma molécula mais pura (por exemplo, ela é o produto final da metabolização da amitriptilina), evitando possíveis vieses.

Estudos preliminares, como na tese de doutorado de Livia Reno, ficou demonstrado que tanto placebo como antidepressivos (fluoxetina ou hypericum) levavam a uma melhora significativa do quadro clínico da depressão, mas a excreção de 6-sulfatoximelatonina seguia direções opostas, sendo significativamente aumentada pelas drogas e reduzida pelo placebo [35]. Cabe ressaltar que o efeito placebo é maior no início do tratamento, mas depois não é sustentado. Estes achados poderiam significar que o efeito de alteração da SMT6a estava ligado ao problema da depressão e não apenas a uma ação farmacológica sobre a captação neuronal.

A importância dessa pesquisa estaria no fato de que um simples teste de laboratório, realizado 24 horas após o início do tratamento com antidepressivos serviria como índice de predição do sucesso ou insucesso de um regime terapêutico.

Esta premissa baseia-se no fato que o efeito terapêutico depende de um bloqueio da captação neuronal de catecolaminas que só pode ser evidenciado até 24

horas após o início do tratamento, visto que em seguida se instalam os efeitos adaptativos sinápticos. É sabido que estes efeitos são a base para a ação terapêutica que só será evidenciada seis a oito semanas após o início do tratamento.

## Objetivos

- A) Avaliar a relação entre a excreção de 6-sulfatoximelatonina nas primeiras 24 horas antes e após o início do tratamento com nortriptilina e a resposta clínica medida duas e oito semanas após.
- a. Relacionar a dosagem da excreção de 6-sulfatoximelatonina com resposta terapêutica positiva a nortriptilina, através da Hamilton para Depressão.

### Referências Bibliográficas

1. Shern, D.L. and H. Moran, *STAR\*D: helping to close the gap between science and practice*. Psychiatr Serv, 2009. **60**(11): p. 1458-9.
2. Markus, R., et al., *Acute increase in urinary 6-sulfatoxymelatonin after clomipramine, as a predictive measure for emotional improvement*. J Psychopharmacol, 2009.
3. Markus, R.P., et al., *The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources*. Neuroimmunomodulation, 2007. **14**(3-4): p. 126-33.
4. Simon, G.E., *Social and economic burden of mood disorders*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(3): p. 208-15.
5. Kessler, R.C., et al., *Sex and depression in the National Comorbidity Survey. II: Cohort effects*. J Affect Disord, 1994. **30**(1): p. 15-26.
6. Rost, K., et al., *Expenditures for the treatment of major depression*. Am J Psychiatry, 1998. **155**(7): p. 883-8.
7. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
8. Manji, H.K., W.C. Drevets, and D.S. Charney, *The cellular neurobiology of depression*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 541-7.
9. O'Connor, E.A., et al., *Screening for depression in adult patients in primary care settings: a systematic evidence review*. Ann Intern Med, 2009. **151**(11): p. 793-803.
10. Judd, L.L., P.J. Schettler, and H.S. Akiskal, *The prevalence, clinical relevance, and public health significance of subthreshold depressions*. Psychiatr Clin North Am, 2002. **25**(4): p. 685-98.
11. Judd, L.L., et al., *A prospective 12-year study of subsyndromal and syndromal depressive symptoms in unipolar major depressive disorders*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(8): p. 694-700.
12. Wanger, P. and L. Martin, *Algorithms for optimizing drug therapy*. BMC Med Inform Decis Mak, 2004. **4**: p. 10.
13. Erhardt, A., et al., *Association of polymorphisms in P2RX7 and CaMKKb with anxiety disorders*. J Affect Disord, 2007. **101**(1-3): p. 159-68.
14. Sen, S. and G. Sanacora, *Major depression: emerging therapeutics*. Mt Sinai J

- Med, 2008. **75**(3): p. 204-25.
15. Stahl, S.M., ed. *Essential Psychopharmacology*. ed. 2. Vol. 1. 2002, Cambridge University Press: Cambridge. 58-70.
  16. Miller, H.L., et al., *Noradrenergic function and clinical outcome in antidepressant pharmacotherapy*. *Neuropsychopharmacology*, 2001. **24**(6): p. 617-23.
  17. Lucki, I. and O.F. O'Leary, *Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs*. *J Clin Psychiatry*, 2004. **65 Suppl 4**: p. 11-24.
  18. Pariante, C.M., *Glucocorticoid receptor function in vitro in patients with major depression*. *Stress*, 2004. **7**(4): p. 209-19.
  19. Heim, C., et al., *The role of early adverse life events in the etiology of depression and posttraumatic stress disorder. Focus on corticotropin-releasing factor*. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. **821**: p. 194-207.
  20. Tzeng, D.S., et al., *MAOA gene polymorphisms and response to mirtazapine in major depression*. *Hum Psychopharmacol*, 2009. **24**(4): p. 293-300.
  21. Svenningsson, P., et al., *Alterations in 5-HT<sub>1B</sub> receptor function by p11 in depression-like states*. *Science*, 2006. **311**(5757): p. 77-80.
  22. Warner-Schmidt, J.L., et al., *Role of p11 in cellular and behavioral effects of 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation*. *J Neurosci*, 2009. **29**(6): p. 1937-46.
  23. Kaplan, B.J.S.H.I., ed. *Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry*. 1994, Williams & Wilkins: Baltimore.
  24. Greden, J.F., *The burden of disease for treatment-resistant depression*. *J Clin Psychiatry*, 2001. **62 Suppl 16**: p. 26-31.
  25. Malhi, G.S., et al., *Treatment-resistant depression: resistant to definition?* *Acta Psychiatr Scand*, 2005. **112**(4): p. 302-9.
  26. Horstmann, S., et al., *Polymorphisms in GRIK4, HTR2A, and FKBP5 Show Interactive Effects in Predicting Remission to Antidepressant Treatment*. *Neuropsychopharmacology*, 2009.
  27. Goldenberg, F., *[Sleep and biological rhythms in depression. Changes caused by antidepressants]*. *Neurophysiol Clin*, 1993. **23**(6): p. 487-515.
  28. Carvalho, L.A., et al., *Melatonin levels in drug-free patients with major depression from the southern hemisphere*. *Psychoneuroendocrinology*, 2006. **31**(6): p. 761-8.
  29. de Almeida-Paula, L.D., et al., *Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine*

- receptors by inhibiting calmodulin.* Eur J Pharmacol, 2005. **525**(1-3): p. 24-31.
30. Moller, M., O. Osgaard, and M. Gronbech-Jensen, *Influence of sympathectomy in humans on the rhythmicity of 6-sulphatoxymelatonin urinary excretion.* Mol Cell Endocrinol, 2006. **252**(1-2): p. 40-5.
  31. Zeitzer, J.M., et al., *Bilateral oculosympathetic paresis associated with loss of nocturnal melatonin secretion in patients with spinal cord injury.* J Spinal Cord Med, 2005. **28**(1): p. 55-9.
  32. Wetterberg, L., et al., *A multinational study of the relationships between nighttime urinary melatonin production, age, gender, body size, and latitude.* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 1999. **249**(5): p. 256-62.
  33. Labunets, I.F., *[Biologically active thymic factors and melatonin-producing pineal function in mice in aging].* Fiziol Zh, 2006. **52**(6): p. 57-62.
  34. Bergiannaki, J.D., et al., *Low and high melatonin excretors among healthy individuals.* J Pineal Res, 1995. **18**(3): p. 159-64.
  35. Reno, L.A., *Excreção de 6-sulfatoximelatonina em pacientes deprimidos sob diferentes tratamentos,* in *Departamento de Farmacologia.* 2004, Universidade de São Paulo: São Paulo.

**Artigo Submetido****6-Sulfatoximelatonin as a Predictor of Clinical Outcome in Depressive Patients Treated With Inhibitors of Monoamine Uptake**

Maria Paz Loayza Hidalgo<sup>1</sup>, Julio Carlos Pezzi<sup>2\*</sup>, Daiane Gil Franco<sup>3</sup>, Wolnei Caumo<sup>4</sup>, Giovana Dantas<sup>1</sup>, Iraci Lucena da Silva Torres<sup>4</sup>, Bernardo Detanico<sup>4</sup>, Ângelo Piato<sup>4</sup>, Regina P Markus<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Faculty of Medicine. Federal University of Rio Grande do Sul. <sup>2</sup>Postgraduate Program of Medical Sciences, Faculty of Medicine. Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400 - Bairro Santa Cecília 90035-003 - Porto Alegre, RS. <sup>3</sup>Laboratory of Chronopharmacology, Institute Bioscience, University of São Paulo, Rua do Matão, trav. 14, nº 321, Cidade Universitária, São Paulo - SP, CEP: 05508-090. <sup>4</sup>Department of Pharmacology, Institute of Basic Sciences of Health, Federal University of Rio Grande do Sul, Av Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre - RS.

**\*Correspondence address:**

Julio Carlos Pezzi

Laboratório de Cronobiologia - HCPA

Ramiro Barcelos 2350 – sala 2200

CEP 90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: julio.pezzi@uol.com.br

**Running title:** 6-Sulfatoximelatonin as a predictor of depression treatment

## SUMMARY

Clinical response to antidepressant is related to increased noradrenergic neurotransmission; therefore, it is important to explore the activity of noradrenergic system. Pineal gland production of melatonin is well suited to serve this purpose. The aim of this study was to establish the value of the aMT6 urinary concentration as a predictor of the therapeutic response to noradrenaline uptake inhibition in depressive patients.

This study was conducted in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre in the south of Brazil. Twenty-two female depressive patients aged between 18 and 60 years old were selected. Depressive symptoms were assessed by the Hamilton Depression Scale before and two and eight weeks after treatment. Urine samples were collected one day before and 24 h after the start of nortriptyline (25 mg, 21h00). Comparisons of the means were conducted using paired or independent student "t" tests. Size effect was calculated to analyze the variation between aMT6s excretion at nighttime before and after nortriptyline. The correlations were analyzed by Spearman's Rank Coefficient of Correlation. MANOVA and Bonferroni tests were used to identify differences between size effect groups at each time point. Statistical significance was set at  $P = 0.05$ . aMT6s excretion was higher between midnight and 06h00 a.m. ( $F = 4.04$ ;  $P = 0.01$ ). A positive correlation was observed between aMT6s excretion before and after nortriptyline ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.01$ ), but not between aMT6s excretion before drug administration and fractional increase ( $r = -0.33$ ;  $P = 0.88$ ). An interaction between the size effect of treatment and depressive symptoms was detected ( $F = 185.92$ ;  $P = 0.04$ ). Both groups experienced reduced depressive symptoms ( $F = 4.63$ ;  $P < 0.01$ ). A large size effect identified subjects who responded to the antidepressant treatment in two weeks, and



these subjects presented higher levels of clinical improvement in symptoms throughout the time period evaluated compared to patients in the low size effect group. Since melatonin production is directly related to sympathetic outflow, our results reinforce the hypothesis that aMT6s excretion is a predictor of clinical outcome.

**Key words:** depression, tricyclic antidepressant, melatonin, 6-sulfatoxymelatonin (aMT6s), size effect.

## INTRODUCTION

Depression is a prevalent disorder that is debilitating and potentially fatal. This disease is multifactorial and most likely reflects an adaptation to changes in monoaminergic neurotransmission. The pathophysiology of depression is a complex process involving chronic changes in monoaminergic (noradrenaline, serotonin and dopamine) neurotransmission (Lucki and O'Leary, 2004). The pharmacological effects of most antidepressants are linked to changes in serotonin and/or noradrenaline, which occur over a short time interval. The main mechanism of action is the block of neuronal monoamine uptake. Clinical positive effects occur at a much slower rate. They are generally recognized after two weeks of continuous administration, and the recommendation for physicians is to treat patients for at least six to eight weeks. After four weeks at the maximum dose, failure of the treatment can be established. If treatment failure is determined, a different antidepressant is prescribed (Raymond et al., 2009; Scott et al., 2009). A pharmacological difference does not necessarily produce clinical differences (Fava et al., 2003; Rush et al., 2004; Nierenberg et al., 2009). Immediate pharmacological and long-lasting clinical effects are considered to be linked, as clinical effects represent adaptive changes to the increase in neurotransmission (Lucki and O'Leary, 2004).

Based on the observation that the clinical response is related to increased noradrenergic activity in the brain, the careful exploration of physiological gauge of overall noradrenergic function that integrates presynaptic and postsynaptic events, including those events that can be applied to clinical studies is critical (Golden and Potter, 1986). Pineal gland production of melatonin is, in many ways, well suited to serve this purpose. Pineal melatonin synthesis is a direct result of sympathetic output. Darkness

sequentially stimulates the hypothalamic suprachiasmatic and paraventricular nuclei, which, via a polysynaptic pathway, activates the intermediolateral column of the medulla. This region then projects to the superior cervical ganglia, triggering sympathetic output (Simmoneaux and Ribelayga, 2003). Melatonin output is a direct function of  $\beta$ -adrenergic stimulation. Activation of  $\beta$ -adrenoceptors triggers the cyclic AMP-protein kinase A (PKA) pathway, which in humans, phosphorylates the key enzyme in melatonin synthesis (aryl-alkyl N-acetyltransferase (AA-NAT)), impairing its degradation by the proteasome (Simonneaux and Ribelayga, 2003). AA-NAT converts serotonin into N-acetylserotonin, which is methylated by the constitutively expressed enzyme, hydroxy-indole-O-methyltransferase (HIOMT), to melatonin. Noradrenaline uptake inhibition results in an increase in the nocturnal plasma melatonin surge (Markus et al., 2009), which can be followed in clinical research by measuring the excretion of aMT6s, which is highly correlated with plasma melatonin (Graham, et al., 1998; Cook, et al., 2000, Markus et al., 2009). The increase in the efficiency of norepinephrine neurotransmission through the blocking of neuronal uptake is an acute process (Avellar and Markus, 1990, 1993). On the other hand, a long-lasting increase of neurotransmitter availability in the synaptic cleft causes an imbalance in neuron and glia functionality, leading to several long-lasting compensatory changes in the number and affinity of receptors expressed in the plasma membrane as well as changes in the activity of enzymes and transporters linked to neurotransmitter metabolism (Sapena, et al., 1994; Gould and Manji, 2002; Avissar and Schreiber, 2006). Therefore, we hypothesized that the amount of aMT6s excreted in the urine could be considered as a monitor of pineal activity and as a predictor of long-term changes, which are responsible for the clinical outcome.

Recently, we showed that although antidepressant and placebo treatments

reduce depression, urinary excretion of aMT6s is significantly increased in the first treatment (Carvalho et al., 2009). These data suggest that changes in melatonin are not linked to the reduction of the depressive condition but to antidepressant pharmacological action. In fact, pineal melatonin synthesis has been suggested as an index of noradrenergic activity (Miller, et al., 2001; Palazidou, et al., 1992). Therefore, the ratio between daytime and nighttime production of melatonin may be a marker of sympathetic activity in healthy subjects (Miller, et al., 2001; Markus et al., 2009).

Taking into account these previous reports and the necessity of quickly identifying the responders to antidepressants, the objective of this study was to establish the value of the urinary concentration of aMT6 as a predictor of the therapeutic response to nortriptyline, an antidepressant that blocks noradrenaline uptake in depressive patients.

## **METHODS**

### *Subjects*

The study protocol was approved by the Ethics Committee at the institution in which the work was carried out and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants signed an informed consent form. The investigation was a longitudinal study. It was performed in the city of Porto Alegre, which is located in the extreme south of Brazil (30° 05' South and 51° 10' West).

Twenty-two female patients aged between 18 and 60 years were selected using the Self Report Questionnaire (SRQ) on basic health units. Only female patients were recruited for the study because depression is more prevalent among women (Camozzato et al, 2007). In addition, a previous report showed a neuroendocrine effect of the antidepressant mirtazapine only among depressed women (Horstmann et al., 2009). The volunteers in the current study were referred for an additional assessment in the psychiatric outpatient ambulatory of the Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA) where two independent psychiatric Structured Clinical Interviews for DSM-IV (SCID) were conducted to confirm the diagnosis of depression. None of the patients performed shift work or traveled transmeridionally during the month preceding the study. Exclusion criteria were the use of beta-blockers, diuretics or any psychotropic drug before the study, severe psychiatric co-morbidity, as well as the standard exclusion criteria for clinical trials: pregnancy, chronic clinical disorder, and alcohol or illicit drug abuse. None of the patients were in the menstrual period.

In the first evaluation, the outpatients completed the SCID and Hamilton Depression Scale (HAM-D) and received information concerning the urine collection as well as the treatment with nortriptyline. The second evaluation was conducted two

weeks after treatment. In this evaluation, the patients completed the HAM-D, and a blood sample was collected to measure serum nortriptyline dosage and renal function. During the third interview, which occurred eight weeks after treatment, only the HAM-D was administered. The data were collected by two research assistants who were blinded to the objective of the study and trained in advance in order to avoid biases in measurement. Respondents completed the assessments individually, following standardized instructions.

### *Depression evaluation*

The main outcome was depressive symptoms as assessed by the Hamilton Depression Scale (HAM-D) (Hamilton, 1960) at three time points: before the administration of medication and two and eight weeks after the start of treatment. This scale contains 21 questions, with the final score ranging from 0 to 62 points. Patients with HAM-D scores of 11–17 were classified as having mild depression, 18–25 as moderate and those with a score higher than 25 as in a severe depressive episode (Paykel, 1999).

### *Antidepressant administration*

Nortriptyline was administered at night (25 mg, 21h00) after the first urine collection, which was collected at 06h00 of the same day. On the third day of treatment, the subjects were instructed to increase the dose up to 75 mg, taking into account the clinical criteria. The plasma concentration of nortriptyline after eight weeks of treatment was  $72.83 \pm 3.48$  ng/mL (mean  $\pm$  standard error of the mean, SEM), varying from 50 – 150 ng/mL, which is the therapeutic window for nortriptyline. Therefore, all patients received a proper amount of medication. No other drug with psychopharmacological

effects was used during this study.

### *Urine collection*

Urine samples were collected on two occasions, one day before and one day after the start of treatment with nortriptyline, in accordance with a previously described protocol (Carvalho et al., 2006, 2009). To ensure compliance, patients were carefully instructed in urine collection during a personal session with a psychiatrist in which they received written guidance. Additionally, on the day of urine collection, the psychiatrist explicitly asked about compliance and discussed the completeness of urine collection in detail.

Subjects were instructed to void their bladders upon rising in the morning and to collect all of their urine during the next 24 h, including the complete sample produced the next morning. Subjects were not required to void their bladder at exact times, but were instructed to record the date and time of the voiding so that the samples from each patient could later be grouped into specific periods. Each urine void was collected in a different vial (25mL plastic containers), and all vials were collected at from the patients' homes in the morning and delivered to the laboratory. Once in the laboratory, the urine was treated on the same day as follows. First, an aliquot was obtained from each container. The volume of the aliquot was proportional to the volume of the urine produced in the specific voiding. The aliquots from each patient were then pooled together according to the time of voiding: morning (06:00-12:00), afternoon (12:00-18:00), evening (18:00-24:00) and night (24:00-06:00). Aliquots of urine were poured into a plastic bottle, centrifuged (2000 X g, 5 min) and the supernatant stored at -80°C until assayed. The subject was excluded if any sample was reported to contain incomplete micturition. The collection procedures were the same for both days (before

and after the start of treatment).

#### *Determination of 6-sulphatoxymelatonin*

aMT6s concentration in the samples (divided into four periods as described above) was determined by enzyme immunoassay (Bulhmann ELISA kit Alpco Ltd, Windham, New Hampshire, USA) using a microtitre plate reader (450 nm, Micronal B-380), as described previously (Carvalho et al., 2006). The assay had a sensitivity of 0.35 ng/mL. Inter-assay variability was 7.3% for aMT6s levels above 3.5 ng/mL. The creatinine concentration was analyzed at the Clinical Analysis Laboratory, FCF-USP by the Jaffé method and was taken as the reference for the aMT6s concentration (Klante, et al., 1997). Values are expressed as micrograms of aMT6s per milligram of creatinine. The total amount of aMT6s excreted in 24 h for each patient was estimated by the sum of the concentrations determined in the 6 h interval.

#### *Statistical analyses*

Data were expressed as means  $\pm$  SEM and were transformed in order to obtain variation between excretion during the nighttime before and after drug administration, the fractional increase (after-before/ (after+before)) and the parameter known as size effect. The size effect represents the extent of change identified on the mean of this urinary metabolite, which facilitates direct comparisons of the levels of this metabolite between different subjects (Cohen, 1988). Size effect was calculated by dividing the mean change in urinary aMT6s (after-before) by the standard deviation at baseline (before). Therefore, a size effect is an expression of changes on the basis of standard deviation, meaning that an size effect of 1.0 represents a change of one sample standard deviation (Cohen 1988). This statistical approach divided the sample into two



groups: the subjects that presented lower values for size effect (equal to or lower than the median) were labeled as later responders, and those who presented values higher than the median size effect were the earlier responders.

The data and the parameters calculated were tested by Spearman's Rank Coefficient of Correlation. One-way or repeated measures analysis of variance (MANOVA) and post hoc multiple comparisons by the Bonferroni test were used to identify differences between groups at each time point. For all analyses, statistical significance was set at  $P = 0.05$ , two-tailed. When only two means were compared, data were tested by paired or independent student "t" tests.

In MANOVA, the size effect groups (earlier and later responders) were entered as a covariant and the three independent depressive symptom evaluations (HAM-D) were entered as factors. Data were analyzed using SPSS version 16.0 (SPSS, Chicago, IL).

## RESULTS

The characteristics of the sample are presented in Table 1. Comparison of the two groups (earlier and later responders) by t-test independent sample revealed no differences in age, scholarship, baseline HAM-D or plasmatic levels of nortriptyline (Table 1).

The mean excretion of aMT6s expressed per mg of creatinine presented a daily rhythm with higher excretion between midnight and 06h00 a.m. (Figure 1). One-way analysis of variance showed that this effect was significant ( $F= 4.04$ ;  $P= 0.01$ ). The post hoc Bonferroni test for the multiple comparison test indicated that all groups were significantly different ( $P< 0.05$ ) from 24h00-06h00. One-way analysis of variance indicated a significant difference among aMT6s urine concentrations one day after the treatment in the four groups ( $F= 2.89$ ;  $P= 0.004$ ). The increase in dispersion of the data for the 24h00-06h00 interval strongly suggests an increase in sample heterogeneity, indicating that patients respond in different manners to nortriptyline treatment.

Spearman's Rank Coefficient of Correlation showed a positive correlation between the aMT6s excretion before and after nortriptyline administration in the 24h00-06h00 interval ( $r= 0.76$ ;  $P= 0.01$ , Figure 2). There was no correlation between aMT6s excretion before drug administration and its fractional increase ( $r= -0.33$ ;  $P= 0.88$ , Figure 3).

Repeated measures analysis of variance (MANOVA) revealed an interaction between the size effect of treatment and the HAM-D measures ( $F= 185.92$ ;  $P= 0.04$ ). Both groups experienced a reduction in depressive symptoms ( $F= 4.63$ ;  $P< 0.01$ ). However, subjects identified as earlier responders (before two weeks of antidepressant treatment) presented higher levels of clinical improvement in symptoms throughout the time period as compared to late responders (Figure 4).

## DISCUSSION

In the current study, we showed that 1-day nortriptyline increased the excretion of the major melatonin urinary metabolite (aMT6s) in depressive patients who have not previously received medication. The 24-h urinary excretion increases in aMT6s agree with previous results obtained with other antidepressants in depressive patients (Carvalho et al., 2009) and healthy subjects (Markus et al., 2009). The total treatment-induced change in 24-h urinary excretion of aMT6s is due to the increase in the 24h00-06h00 interval, indicating an enhancement in the production of pineal melatonin.

Taking into account that pineal melatonin synthesis is directly controlled by the activation of  $\beta$ -adrenoceptors (Simonneaux and Ribelayga, 2003) and that nortriptyline blocks noradrenaline uptake (Huezo-Diaz et al., 2009), this increase in nocturnal melatonin is most likely due to the expression of the pharmacological effects of nortriptyline. Accordingly, antidepressants that reduce whole-body norepinephrine turnover enhance aMT6s excretion by increasing pineal melatonin output (Golden, et al., 1988). In fact, clinical effects were often observed between 2 to 8 weeks and are the result of a neurological adaptation to an increased noradrenaline concentration in the synaptic cleft (Avellar and Markus, 1990).

In a previous study, the increase in aMT6s excretion one day after clomipramine administration was shown to be predictive of mood improvement in healthy subjects (Markus et al., 2009). In the present paper, this hypothesis was tested in depressive patients by evaluating the relationship between an antidepressant size effect and clinical improvement. Therefore, our expectation was that patients with no change in aMT6s excretion would present no improvement in depressive symptoms. One limitation of the present study is that all of the 22 patients had a positive clinical outcome. However, as will be discussed later, we selected earlier and later responders

according to aMT6s excretion, and this statistical evaluation supported the previous hypothesis.

In the current study, we improved the homogeneity of the sample, as compared to our previous studies (Markus et al., 2009; Carvalho et al., 2009). In order to avoid selection bias, we included only women, with no co-morbidity, who had not been previously treated for a depressive episode. Two independent psychiatrists evaluated the patients, and the nortriptyline plasma concentration was followed, allowing the confirmation of patients' compliance. Scholarship level is an important variable because it is a potential confounding factor for answering scale questions. Therefore, this variable was controlled for strictly.

In this paper, we observed an increase in variance in the amount of aMT6s excreted between 24h00 and 06h00 one day after treatment when compared to the day before treatment. This result was taken as an indication that patients responded to the medication in two different manners. We observed a clear interaction between early responders and a larger size effect in aMT6s excretion before and after nortriptyline. As previously observed in healthy persons (Markus et al., 2009), we also found a positive correlation between size effect in aMT6s excretion and the timing of clinical outcome. Patients that improved in two weeks showed a greater increase in the amount of aMT6s excreted than those having a positive outcome only after a continuous eight-week treatment. The increase in aMT6s excretion was not related to baseline levels of it, indicating that this is a result of the antidepressant pharmacological effect, which occurs via the blockage of noradrenaline uptake. Since melatonin production is directly related to sympathetic outflow, our results strongly indicate that the size effect of the excretion of aMT6s estimates sympathetic neurotransmission activity. Therefore, our data reinforce the hypothesis that the size effect of aMT6s excretion is a predictor of clinical

outcome. It is important to emphasize that this predictive therapeutic test was established by the increase in output of aMT6s excretion after the first dose of antidepressant. The current findings may advance clinical approaches in therapy selection, taking into account the individual neurobiological system of each patient.

Our goal was to evaluate whether this pharmacological output could be the basis for the clinical output that is observed two weeks after the start of treatment. The guidelines for depression treatment suggest that if there is no clinical improvement in two to four weeks, the treatment should be changed. Therefore, having a biochemical marker that is predictive of clinical output is important for psychiatric practice.

**Funding Source:** FAPESP to RPM; CNPq to MPH, FIPE-HCPA, PRPq-USP; RPM, senior fellowship, CNPq; GD, pos-doc fellow CAPES; JPC, fellow of Associação de Psiquiatria do Rio Grande do Sul; DGF, master fellow FAPESP.

## REFERENCES

Avellar MC, Kobashi YL, Markus RP. Age-related changes in neuronal uptake of noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 1990, 341:295-300.

Avellar MC, Markus RP. Age-related changes in norepinephrine release and its modulation by presynaptic alpha-2 adrenoceptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 1993, 267: 38–44.

Avissar S, Schreiber G. The involvement of G proteins and regulators of receptor-G protein coupling in pathophysiology, diagnosis and treatment of mood disorders. *Clin Chim Acta*, 2006, 336:37-47.

Camozzato AL, Hidalgo MP, Souza S, Chaves ML. Association among items from the self-report version of the Hamilton Depression Scale (Carroll Rating Scale) and respondents' sex. *Psychol Rep.* 2007, 101(1):291-301

Carvalho L, Gorenstein C, Moreno R, Pariante C, Markus RP. Effect of antidepressants on melatonin metabolite in depressed patients. *J Psychopharmacol.* 2009, 23(3):315-21.

Carvalho LA, Gorenstein C, Moreno RA, Markus RP. Melatonin levels in drug-free patients with major depression from the southern hemisphere. *Psychoneuroendocrinology* 2006, 31:761–768.

Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed. Hillsdale, NJ: Erlbaum, 1988.

Cook, MR, Graham, C, Kavet, R, Stevens, RG, Davis, S, Kheifets, L. Morning urinary assessment of nocturnal melatonin secretion in older women. *J Pineal Res* 2000, 28:41–47.

Fava M, Rush AJ, Trivedi MH, Nierenberg AA, Thase ME, Sackeim HA, Quitkin FM, Wisniewski S, Lavori PW, Rosenbaum JF, Kupfer DJ). Background and rationale for the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR\*D) study. *Psychiatric Clinics of North America* 2003, 26:457–494.

Golden RN, Markey SP, Risby ED, Rudorfer MV, Cowdr, RW, Potte, WZ Antidepressants reduce whole-body norepinephrine turnover while enhancing 6-hydroxymelatonin output. *Arch Gen Psychiatry* 1988, 45:150–154.

Golden RN, Potter WZ Neurochemical and neuroendocrine dysregulation in affective disorders. *Psychiatr Clin North Am* 1986, 9(2):313-327.

Gould TD, Manji HK. Signaling pathways in the pathophysiology of mood disorders. *J Psychosom Res* 2002, 53:687-697.

Hamilton M. A rating scale for depression. *J. Neurol.Neurosurg. Psychiatry* 1960, 23: 56–62.

Horstmann S, Dose T, Lucae S, Kloiber S, Menke A, Hennings J, Spieler D, Uhr M, Holsboer F, Ising M. Suppressive effect of mirtazapine on the HPA system in acutely depressed women seems to be transient and not related to antidepressant action. *Psychoneuropharmacology* 2009, 34:238-248.

Huezo-Diaz P, Uher R, Smith R, Rietschel M, Henigsberg N, Marusic A, Mors O, Maier W, Hauser J, Souery D, Placentino A, Zobel A, Larsen ER, Czerski PM, Gupta B, Hoda F, Perroud N, Farmer A, Craig I, Aitchison KJ, McGuffin P. Moderation of antidepressant response by the serotonin transporter gene. *Br J Psychiatry* 2009, 195(1):30-38.

Klante G, Brinshwitz T, Secci K, Wollnik F, Steinlechner S. Creatinine is an appropriate reference for urinary 5-hydroxytryptophan of laboratory animals and humans. *J. Pineal Res.* 1997, 23:191–197.

Lam RW, Kennedy SH, Grigoriadis S, McIntyre RS, Milev R, Ramasubbu R, Parikh SV, Patten SB, Ravindran AV. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT). Clinical guidelines for the management of major depressive disorder in adults. III. *J Affect Disord* 2009, 117(Supl 1):S1-S2.

Lucki I, O'Leary OF. Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. *J Clin Psychiatry* 2004, 65:11-24.

Markus RP, Franco DG, Carvalho LA, Gentil VL, Gorenstein C. Acute increase in urinary 5-sulfatoxytryptophan after clomipramine, as a predictive measure for emotional



improvement. *J Psychopharmacol*, 2009. Epub ahead of print.

Miller HL, Ekstrom RD, Mason GA, Lydiard RB, Golden RN. Noradrenergic Function and Clinical Outcome in Antidepressant Pharmacotherapy. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 24:617-623.

Nierenberg AA, Husain MM., Trivedi MH., Fava M, Warden D, Wisniewski SR, Miyahara S, Rush AJ. Residual symptoms after remission of major depressive disorder with citalopram and risk of relapse: a STAR\*D report. *Psychol Med*. 2009, 22:1-10.

Palazidou E, Papadopoulos A, Ratcliff H, Dawling S, Checkley SA. Noradrenaline uptake inhibition increases melatonin secretion, a measure of noradrenergic neurotransmission, in depressed patients. *Psychol Med* 1992, 22:309-315.

Patten SB, Kennedy SH, Lam RW, O'Donovan C, Filteau MJ, Parikh SV, Ravindran AV. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT). Clinical Guidelines for the Management of Major Depressive Disorder in Adults. I. Classification, Burden and Principles of Management. *J Affect Disord* 2009, 117(Supl 1):S5-S14

Paykel ES. The hamilton scales. In: Bech, P., Coppen, A. (Eds). *The Hamilton Scales*. Springer, New York. 1999.

Rush AJ, Fava M, Wisniewski SR, Lavori PW, Trivedi MH, Sackeim HA, Thase ME, Nierenberg AA, Quitkin FM, Kashner TM, Kupfer DJ, Rosenbaum JF, Alpert J, Stewart JW, McGrath PJ, Biggs MM, Shores-Wilson K, Lebowitz BD, Ritz L, Niederehe G

(2004). Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR\*D): rationale and design. *Control Clin Trials* 25:119–142

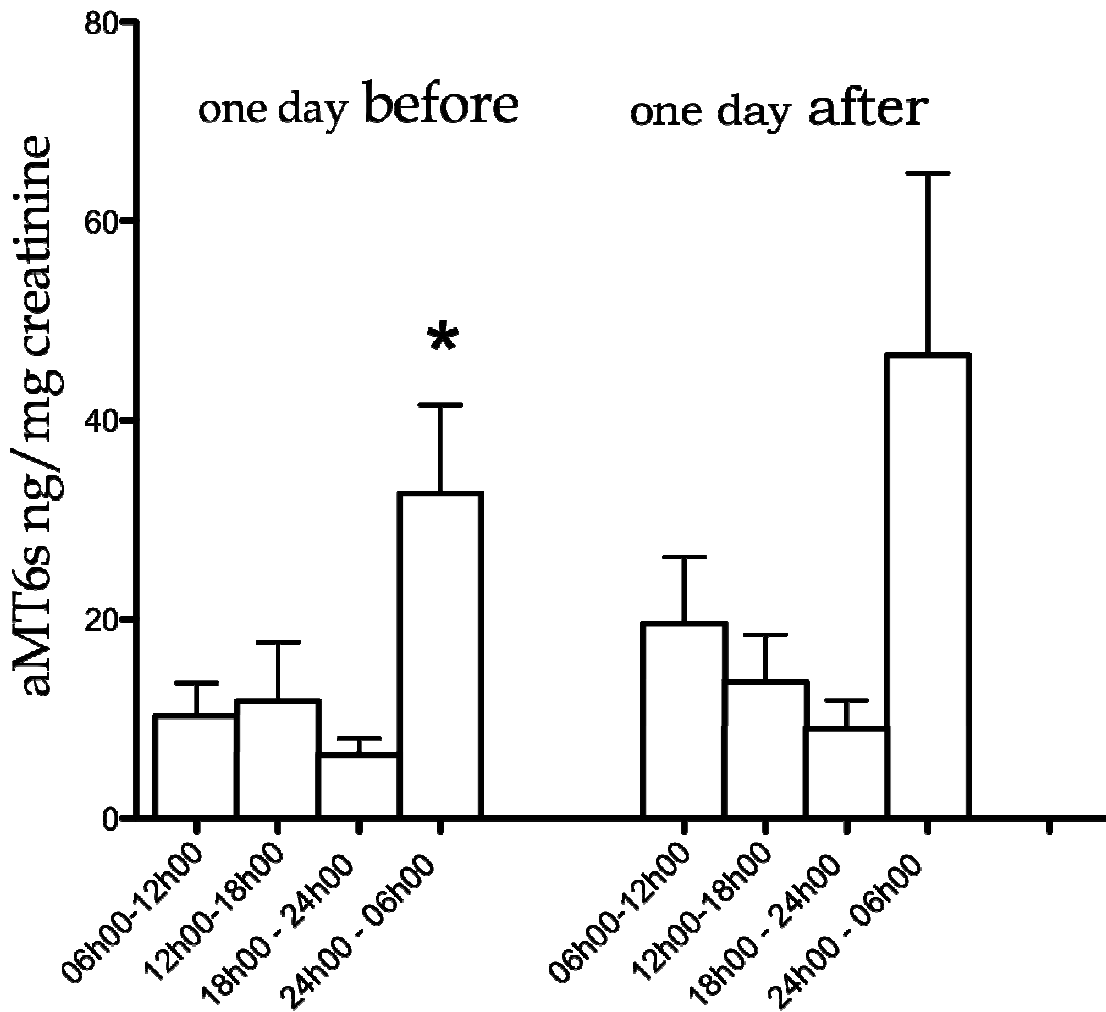
Sapena R, Morin D, Zini R, Tillement JP. Cyclic AMP and inositol phosphate accumulations in rat brain cortical slices following chronic citalopram or desipramine administration. *Drugs Exp Clin Res* 1994, 20:93-102.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacol Rev* 2003, 55:325-395.

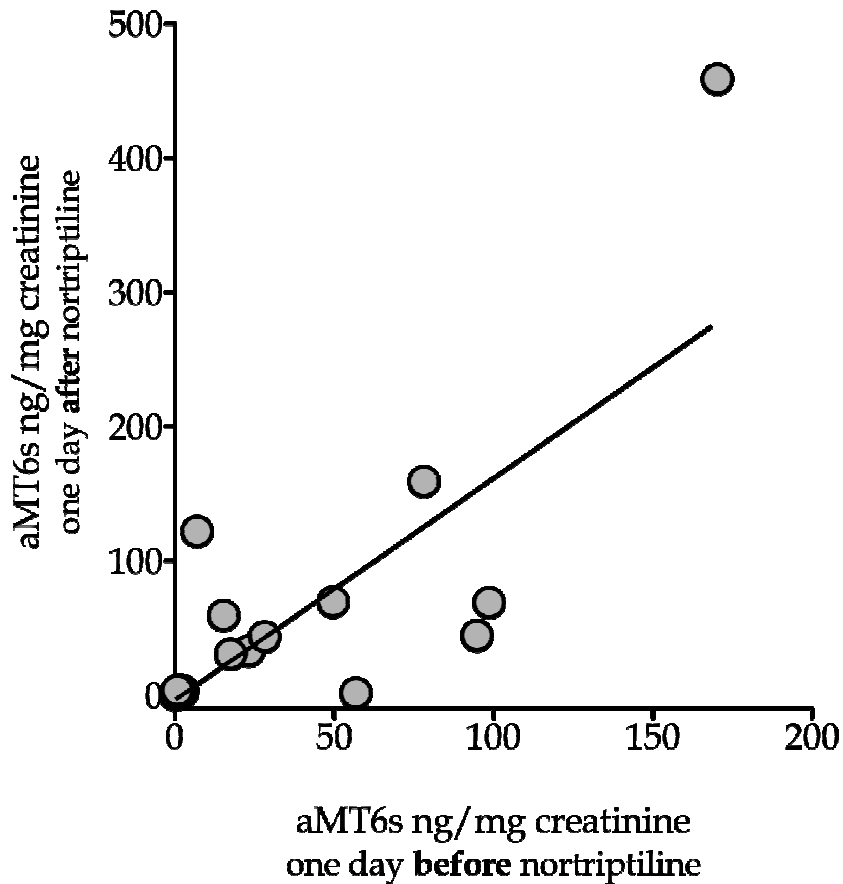
**Table 1. Patients' characteristics and depressive symptoms at baseline. Values are presented as means ( $\pm$ SEM).**

<b>Variables</b>	<b>All samples (N=22)</b>	<b>Earlier responders (N=11)</b>	<b>Later responders (n= 11)</b>	<b>P</b>
Age (years) †	41 $\pm$ 2.7	39.45 $\pm$ 3.87	42.41 $\pm$ 4.24	0.60
Formal education (years) †	10.17 $\pm$ 0.73	10.09 $\pm$ 0.96	10.63 $\pm$ 1.17	0.72
Hamilton Depression Scale at baseline	23.95 $\pm$ 1.05	24.45 $\pm$ 1.76	23.50 $\pm$ 1.36	0.78
Plasmatic levels of nortriptyline (ng/mL)	72.83 $\pm$ 3.48	72.73 $\pm$ 4.07	72.73 $\pm$ 6.27	1.0

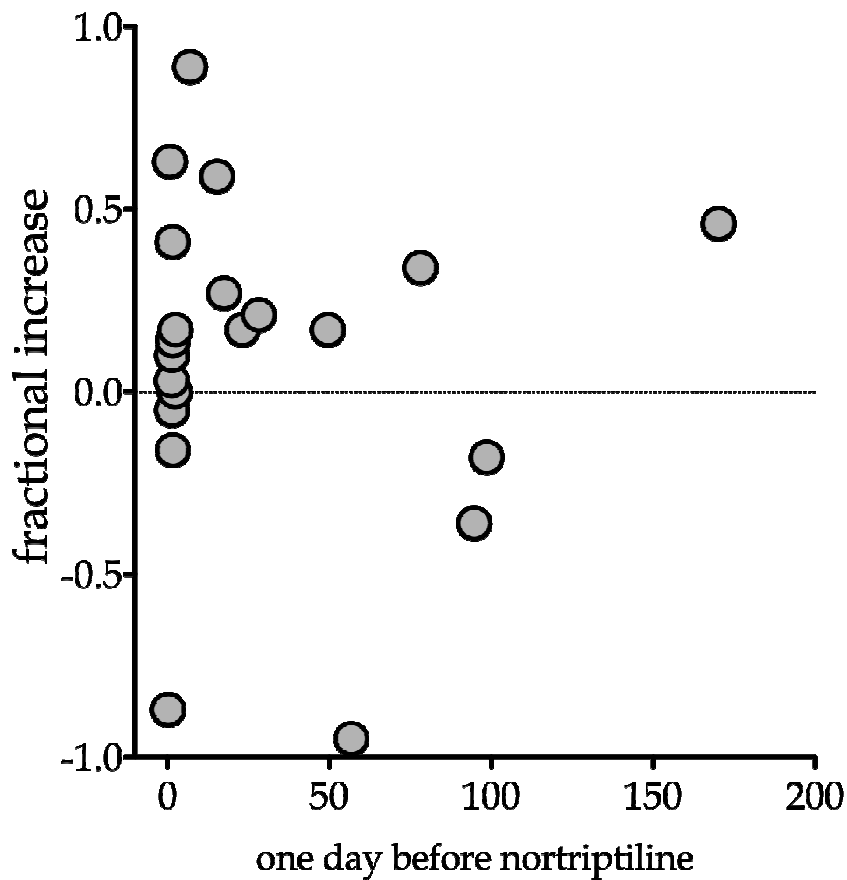
Figure 1



**Figure 1** – Urinary aMT6s excretion profile (ng/mg creatinine) one day before and one day after treatment with nortriptyline, divided by 6h intervals (06h00-12h00, 12h00 – 18h00, 18h00- 24h00, 24h00-06h00), in 22 depressed patients. Data are presented as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  compared to the other three groups.

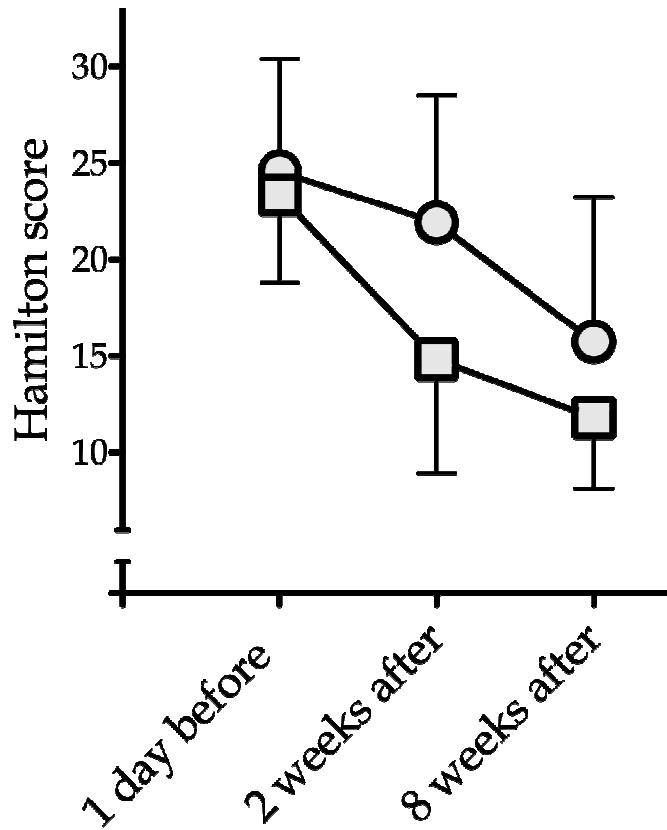
**Figure 2**

**Figure 2** – Correlation between the excretion of aMT6s (ng/mg creatinine) before and after treatment with nortriptyline. The amount of aMT6s excreted between 24h00 and 06h00 one day before and one day after treatment, plotted for each patient (n =22). Data show each individual value. The Spearman's correlation rank is  $r = 0.76$   $P < 0.01$ , and the significant linear regression is  $y = 1.6x - 3.8$ .

**Figure 3**

**Figure 3** - Correlation between the excretion of aMT6s (ng/mg creatinine) before treatment with nortriptyline versus the fractional increase in excretion one day after the treatment. The lack of correlation indicates that there is no influence of the previous amount of pineal melatonin production in the fractional increase induced by blocking neuronal uptake. Data are shown as individual relationships (n = 22). Spearman's correlation rank –  $r = -0.03$ ;  $p = 0.89$ .

Figure 4



**Figure 4** – Hamilton scores divided according to earlier and later responders obtained one day before and two and eight weeks after nortriptyline administration. Earlier and later responders were selected according to the 50 percentile for size effect. The data were tested by MANOVA and demonstrated an interaction between the Hamilton score and the size effect. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. The sample included 11 earlier and 11 later responders.

## Considerações Gerais

Foram avaliadas 22 mulheres em episódio depressivo moderado (HAM-D  $23.95 \pm 1.05$ ), com média de 41 anos de idade ( $\pm 2.7$ ). O estudo mostrou que após o primeiro dia de tratamento com nortriptilina há um aumento na excreção urinária de 6-sulfatoximelatonina (aMT6s) em pacientes com transtorno de humor depressivo, sem tratamento psicofarmacológico prévio. Foi observado um aumento da excreção de melatonina ocorrido nas primeiras 24 horas após a instituição do tratamento com nortriptilina, significativamente maior no período da madrugada (00h00-06h00).

Em um estudo prévio (Markus, 2009), onde se analisou a excreção de aMT6s antes e depois da administração de clomipramina, foi demonstrado que o aumento do metabólito ocorreu apenas no primeiro dia de tratamento (não se sustentando nas avaliações da segunda e oitava semanas), corroborando que provavelmente exista uma resposta adaptativa à função da pineal. Além disso, observaram que o aumento da aMT6s foi significativo apenas no grupo que evidenciou resposta à medicação, sugerindo que o bloqueio da recaptção é preditivo de melhora de sintomas emocionais.

Levando-se em conta que a melatonina sintetizada na glândula pineal é diretamente controlada pela ativação de beta-adrenoreceptores e que a nortriptilina bloqueia a recaptção da noradrenalina, esse aumento da melatonina noturna no período da noite é a expressão provável da ação farmacológica da nortriptilina. Além disso, os efeitos clínicos foram observados após 2-8 semanas, sugerindo ser resultado da adaptação neuronal para aumentar a concentração de noradrenalina na fenda sináptica.

Dessa forma, infere-se que o aumento da secreção de aMT6s no primeiro dia



após o início do tratamento com nortriptilina figura como um possível fator preditivo da eficácia terapêutica do antidepressivo. Tal inferência deve ser encarada considerando algumas limitações do estudo. O tamanho da amostra é relativamente pequeno, abrindo possibilidades para possíveis erros tipo II e a impossibilidade de se montar um modelo de regressão robusto para testar a hipótese de predição. Isso faz dessa pesquisa um estudo exploratório, porém crucial para futuras investigações dessa hipótese.

Por fim, as perspectivas futuras a intenção do estudo foi avaliar como a resposta farmacológica poderia ser a base para um desfecho clínico que somente pode ser observado duas semanas após o início do tratamento para depressão. Os protocolos atuais para tratamento da depressão sugerem que somente após duas semanas de tratamento a droga possa ser considerada ineficaz, podendo assim ser substituída. Entretanto, tendo um marcador bioquímico, de fácil acesso, é uma importante conquista para a prática psiquiátrica.

## Anexos

1. Figura 1A: Eixo Pineal
2. Figura 2A: Cascata Formação Melatonina
3. Carta de Aprovação do Projeto de Pesquisa no GPPG-HCPA

Figura 1A: Eixo Pineal

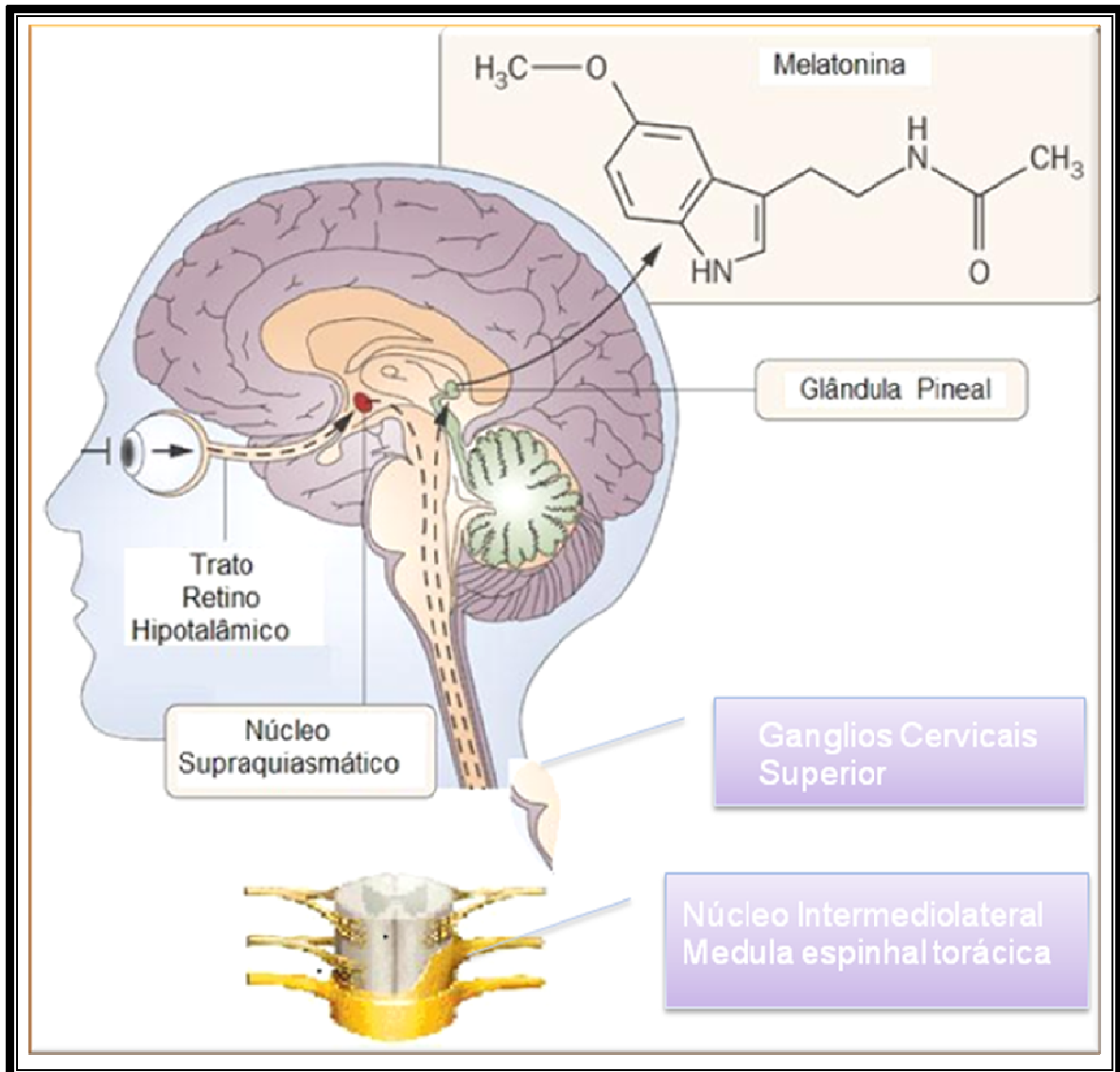


Figura 1: Eixo do estímulo para a formação de melatonina

Figura 2A: Cascata Formação Melatonina

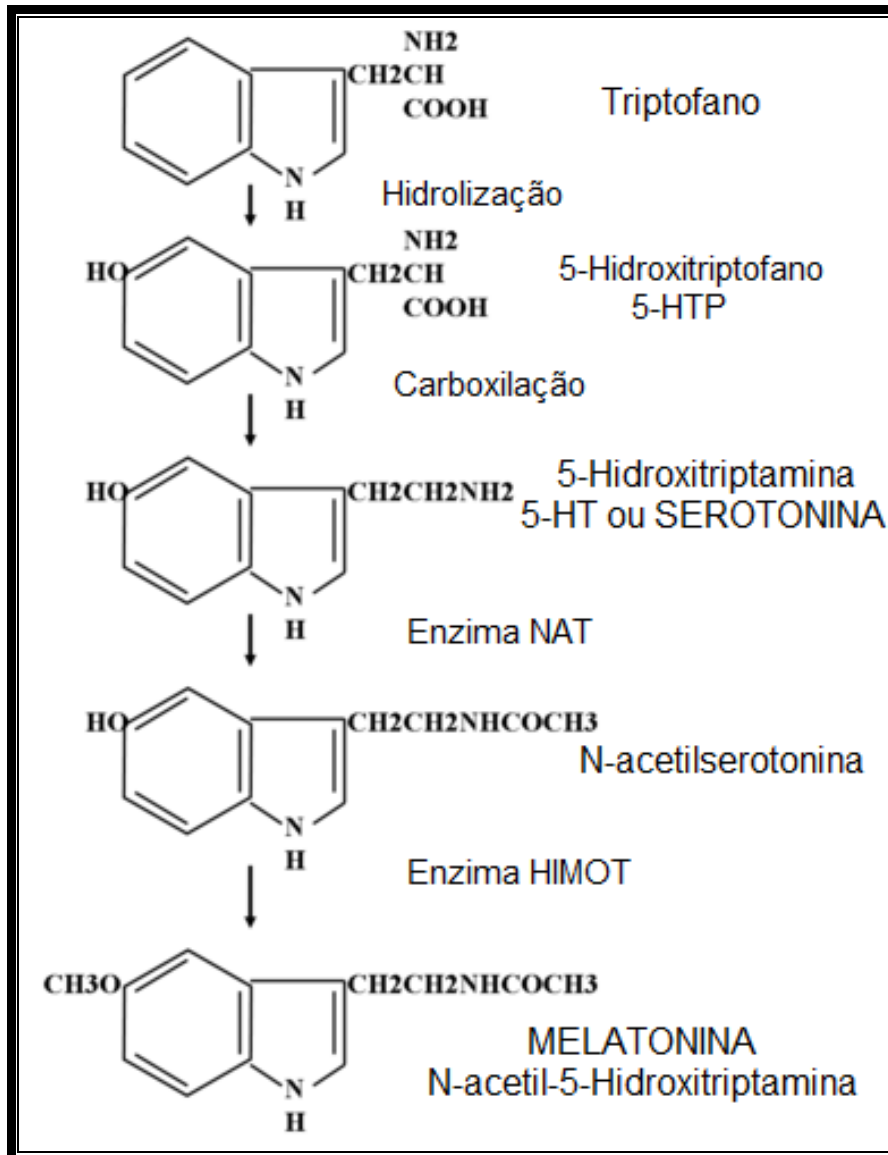


Figura 2: Cascata da Formação da melatonina a partir do triptofano

## Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 07-158

**Versão do Projeto:** 01/06/2007

**Versão do TCLE:** 01/06/2007

**Pesquisadores:**

MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO

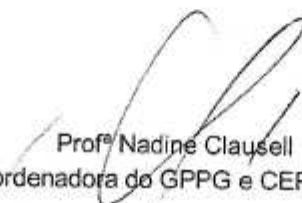
WOLNEI CAUMO

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

**Título:** PREDIÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE ANTIDEPRESSIVO- DOSAGEM URINÁRIA DE 6-SULFATOXIMELATONINA 24 HORAS APÓS INÍCIO DA TERAPÊUTICA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 05 de junho de 2007.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA