



*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA  
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

REPERCUSIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA E INTRASEPTAL  
DE TESTOSTERONA SOBRE EL EFECTO ANTIDEPRESIVO  
DE FLUOXETINA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN PSICOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**M en C BLANDINA BERNAL MORALES**

JURADO DE EXAMEN DE GRADO  
DIRECTOR: DR. CARLOS M. CONTRERAS  
COMITÉ: DRA. SELENE CANSINO ORTIZ  
DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA  
DR. VÍCTOR M. ALCARAZ ROMERO  
DRA. LUCÍA A. MARTÍNEZ MOTA  
DRA. MARÍA A. CORSI CABRERA  
DR. J. ALONSO FERNÁNDEZ GUASTI

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

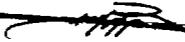
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Blandina Bernal

Morales

FECHA: 2 - febrero - 06

FIRMA: 

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos M. Contreras en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante el desarrollo de este trabajo, Blandina Bernal Morales recibió una beca (Reg. 124657) para estudios de Posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Adicionalmente, recibió apoyo (Num. de proyecto 308302) de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP-UNAM).

## **JURADO EVALUADOR**

**Dr. Carlos M. Contreras**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
e Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana.  
Xalapa, Veracruz, México.

**Dra. Selene Cansino**  
Facultad de Psicología, UNAM  
México, D.F.

**Dr. Miguel Pérez de la Mora**  
Instituto de Fisiología Celular, Biofísica y  
Neurociencias, UNAM.  
México, D.F.

**Dr. Víctor Alcaraz Romero**  
Dirección General de Investigaciones  
Universidad Veracruzana  
Xalapa, Veracruz, México.

**Dra. Lucía Martínez Mota**  
Instituto Mexicano de Psiquiatría  
México, D.F.

**Dra. María Corsi Cabrera**  
Facultad de Psicología, UNAM  
México, D.F.

**Dr. Alonso Fernández Guasti**  
Departamento de Farmacobiología,  
CINVESTAV, IPN  
México, D.F.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos M. Contreras por su valiosa dirección en el camino de la investigación,  
por ser maestro y amigo.

Al Comité Tutorial por su participación en la evaluación y el apoyo para continuar con  
la realización de este trabajo, por contribuir en mi formación profesional.

A la Lic. Lucía Peña y al Lic. Carlos Durán por su gran apoyo administrativo.

Al Dr. Carlomagno Sol Tlachi por la revisión de la redacción del trabajo.

A mis amigos, que dentro y fuera del laboratorio me dieron su apoyo.

## DEDICATORIAS

A mi madre, Amparo H. Morales Vásquez, por haberme dado la vida, por estar juntas.  
Dedico este trabajo como una muestra más de sus enseñanzas, del amor que nos  
tenemos y del amor que le tenemos a la vida.

A mi padre, José Luis Bernal Reyes, *in memoriam*.

A mis hermanos Gabi, Pepe y Miguel por el gran amor que nos une.

A mis sobrinos, a la tía Caty y al tío Toño, y a toda mi familia por su comprensión y  
apoyo.

A Cuicláhuac.

**REPERCUSIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA E  
INTRASEPTAL DE TESTOSTERONA SOBRE EL EFECTO  
ANTIDEPRESIVO DE FLUOXETINA**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	4
2.1 DEPRESIÓN.....	4
2.2 HIPÓTESIS QUÍMICAS DE LA DEPRESIÓN.....	5
2.3 DIMORFISMO SEXUAL EN LA DEPRESIÓN Y EL SUICIDIO.....	7
2.4 ESTEROIDES SEXUALES.....	7
2.4.1 Hormonas gonadales.....	7
2.4.2 Neuroesteroides.....	8
2.4.3 Mecanismo de acción de los esteroides en el sistema nervioso central.....	9
2.4.3.1 Receptores intracelulares.....	9
2.4.3.2 Receptores de membrana.....	9
2.4.4 Funciones identificadas de los esteroides sexuales.....	10
2.5 HORMONAS ESTEROIDALES Y CONDUCTA AFECTIVA.....	11
2.5.1 Deshidroepiandrosterona, estrógenos, progesterona.....	11
2.5.2 Testosterona.....	14
2.6 FLUOXETINA EN EL TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN.....	21
2.7 FLUOXETINA Y RIESGO DE SUICIDIO EN ADOLESCENTES.....	22
2.8 DESAFÍO FARMACOLÓGICO.....	23
2.9 APROXIMACIONES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA DEPRESIÓN.....	24
2.9.1 Modelos animales.....	24
2.9.1.1 Modelo animal para evaluar locomoción: prueba de actividad locomotriz.....	26
2.9.1.2 Modelo animal para evaluar motivación: prueba de nado forzado.....	27
2.9.2 Núcleo septal lateral, hormonas y depresión experimental.....	28
<b>3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	31
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	32
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>6. MÉTODO GENERAL</b> .....	33
6.1 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	33
6.2 SUJETOS EXPERIMENTALES.....	33
6.3 ORQUIDECTOMÍA.....	33
6.4 IMPLANTE INTRASEPTAL .....	34
6.5 MICROINYECCIÓN INTRASEPTAL .....	34
6.6 VERIFICACIÓN DEL IMPLANTE INTRASEPTAL.....	34
6.7 PRUEBAS CONDUCTUALES.....	35
6.7.1 Prepruebas conductuales.....	40
6.7.2 Actividad locomotriz.....	40
6.7.3 Nado forzado.....	40

6.8 CUANTIFICACIÓN DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA.....	36
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	37
<b>7. SERIES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>39</b>
7.1 TRATAMIENTO AGUDO	
7.1.1 Administración aguda sistémica de testosterona, fluoxetina y testosterona+fluoxetina.....	39
7.2 TRATAMIENTO CRÓNICO	
7.2.1 Administración crónica sistémica de testosterona, fluoxetina y testosterona+fluoxetina.....	42
7.3 TRATAMIENTO CRÓNICO Y DESAFÍO FARMACOLÓGICO	
7.3.1 Administración crónica sistémica de fluoxetina con desafío sistémico de testosterona.....	46
7.3.2 Administración crónica sistémica con refuerzo o desafío intraseptal de testosterona.....	50
7.4 CUANTIFICACIÓN DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA.....	55
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>

#### APENDICE

Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, <b>Bernal-Morales B.</b> The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. Journal of Psychopharmacology 2001; 15(4):231-236 .....	86
---	----

## RESUMEN

La incidencia de depresión es mayor en mujeres, pero el suicidio es más frecuente en hombres; por tanto, las hormonas gonadales han sido involucradas en la etiología de la depresión. Particularmente, la testosterona es responsable del dimorfismo sexual, no obstante, los estudios sobre la participación de la testosterona en el estado de ánimo son escasos y controvertidos. Este andrógeno y sus receptores se localizan en estructuras límbicas como el septum lateral, sitio de acción de sustancias antidepresivas. Sin embargo, se desconoce el efecto de la administración intraseptal o sistémica de testosterona sobre la respuesta a fármacos antidepresivos. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de testosterona sobre la desesperanza (inmovilidad) en un modelo de depresión experimental, así como su interacción con el antidepresivo fluoxetina y la participación del septum lateral. La administración aguda sistémica de testosterona, fluoxetina o fluoxetina+testosterona (10mg/kg), o la administración crónica de testosterona (1mg/rata/21días) y testosterona(1mg/rata)+fluoxetina(1mg/kg)/21días, carecieron de efecto sobre la inmovilidad en ratas forzadas a nadar; sin embargo, la administración crónica de fluoxetina (1mg/kg/21días), así como su administración crónica sistémica+administración intraseptal aguda de fluoxetina, disminuyó la inmovilidad en este paradigma. Se observó adicionalmente una interacción farmacológica consistente en el bloqueo del efecto anti-inmovilidad de fluoxetina después del desafío agudo sistémico o intraseptal con testosterona, sin afectar la locomoción. Se concluye que el desafío con testosterona repercute sobre el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina.

## ABSTRACT

Incidence of major depression is higher in women than men, but suicide is more frequent in men; therefore, gonadal hormones have been implicated in the ethiology of depression. Particularly, testosterone is responsible of sexual dimorphism; however, studies of the participation of testosterone on mood are scarce and unsustained. This hormone and its receptors are located in limbic structures such as the lateral septum, which is a target of antidepressant substances. However, the effects of the intraseptal or systemic administration of testosterone on the response to antidepressants have not been explored. The aim of this dissertation was to determine testosterone effects on despair (immobility) in an experimental model of depression and its interaction with the antidepressant fluoxetine and the participation of the lateral septum. The acute systemic administration of testosterone, fluoxetine or fluoxetine+testosterone (10mg/kg), or chronic administration of testosterone (1mg/rat/21days) and testosterone (1mg/rat)+fluoxetine(1mg/kg)/21days, lacked of effect on immobility in rats submitted to the forced swim test; however, the chronic administration of fluoxetine (1mg/kg/21days) as well as its chronic administration plus intraseptal acute administration of fluoxetine reduced immobility in this paradigm. In addition, a pharmacologic interaction consisted on the blockade of the anti-immobility effect of fluoxetine after the acute challenge of testosterone, systemic or intraseptal, without affecting locomotor activity. It is concluded that testosterone has repercussions on the anti-immobility effect of fluoxetine.

## 1. INTRODUCCION

La depresión es un trastorno sexualmente dimórfico ya que la prevalencia es dos o tres veces mayor en el sexo femenino comparado con el sexo masculino (Breslau *et al.*, 1995; American Psychiatric Association, 2000; Kessler *et al.*, 2003). Sin embargo, el suicidio es mayor en hombres tanto en adultos como en adolescentes (Pelkonen *et al.*, 1996) lo que sugiere una contribución de las hormonas gonadales en la neurobiología de la depresión y del suicidio.

Aun cuando se desconocen diversos aspectos de la fisiopatología de la depresión y la hipótesis clásica monoaminérgica dice que este trastorno es causado por una actividad insuficiente de las neuronas monoaminérgicas, no se le puede atribuir un papel exclusivo a las monoaminas en la depresión. También existe la hipótesis hormonal que propone que la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal ocurre en pacientes deprimidos e involucra a la hormona liberadora de corticotropina y los glucocorticoides liberados durante el estrés (Nemeroff, 1998). Estas alteraciones pueden ser revertidas con tratamiento antidepresivo, aunque a veces se presentan casos de depresión resistente en algunos pacientes con hiperactividad adrenal (Pearson-Murphy *et al.*, 1998).

La depresión asociada con las oscilaciones cíclicas de las hormonas ováricas está ampliamente documentada. La hipótesis del síndrome de abstinencia hormonal en mujeres vulnerables se basa en la observación de que la restitución hormonal produce mejoría del estado de ánimo (Bloch *et al.*, 2000; Hochberg *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2004), pero los estudios sobre los andrógenos en la conducta afectiva son escasos.

A la testosterona se le considera tradicionalmente la hormona reguladora de la agresión y la conducta sexual, sin embargo, se ha intentado encontrar correlatos entre la conducta afectiva y los niveles hormonales de testosterona. En situaciones de competencia, parece haber una relación positiva entre los niveles de testosterona y el triunfo, por ello se ha sugerido que la testosterona está asociada con el estado de ánimo en el género masculino. Durante el estrés, esta relación se invierte, debido a la supresión de la síntesis de testosterona mediada por los glucocorticoides a través de mecanismos no genómicos (Dong *et al.*, 2004). En ambos géneros, ocurren algunas

asociaciones entre la testosterona y la depresión, es decir, niveles anormalmente disminuidos o elevados se han asociado con este trastorno afectivo. La concentración salival y plasmática de testosterona empleada como marcador biológico de la depresión, implica asociaciones entre una variable bioquímica y una variable psiquiátrica que no denotan la relación causa-efecto, pero que pueden ser de utilidad. Los conocimientos sobre los efectos de los andrógenos en el trastorno depresivo aún son inconsistentes debido a la falta de estudios sistemáticos y controlados. En este sentido, el reto para avanzar en el estudio de los efectos psiquiátricos de la testosterona y otros andrógenos se limita ante las implicaciones éticas de probar dosis elevadas en voluntarios sanos y, en general, en seres humanos (Yates, 2000).

La fluoxetina es un antidepresivo eficaz que bloquea la recaptura de serotonina cerebral. En general, el establecimiento de los efectos terapéuticos requiere de semanas de tratamiento, pero su seguridad, mejor tolerancia y efectos colaterales menos severos que los tricíclicos, le confiere mayor eficacia clínica. A pesar de ello, a partir de la década de 1990 surgieron cuestionamientos acerca de la seguridad de este tipo de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina debido al riesgo elevado de suicidio en jóvenes bajo este tipo de tratamientos. La controversia se ha desatado debido a que al parecer los estudios necesarios no se han hecho públicos y no han podido ser documentados a profundidad. Actualmente, con base en una revisión de estudios controlados con placebo, la FDA ha solicitado a las compañías farmacéuticas incluir una advertencia en sus productos que alerten sobre un incremento de riesgo de suicidio en niños y adolescentes tratados con estos antidepresivos (FDA Public Health Advisory, 2004a; 2004b). En este sentido, resultan de utilidad las estrategias de desafío farmacológico que han sido empleadas en algunas investigaciones de la función serotoninérgica en la depresión (Price et al., 2004); por ejemplo, en la estimulación de un sistema de neurotransmisión a través de dosis únicas de un fármaco, para medir algunos efectos sobre las concentraciones plasmáticas hormonales, efectos neurofisiológicos, conductuales o clínicos (Gijsman et al., 2004). Los estudios de desafío farmacológico se han empleado en la clínica, pero también es posible utilizarlos en la investigación básica cuando se sospecha de ciertas interacciones que han sido

escasamente estudiadas, como en el caso de la relación entre la testosterona y la respuesta a fármacos antidepresivos.

En la psicopatología de la emoción, la falta de motivación se manifiesta por ausencia o disminución del comportamiento dirigido a metas. A nivel experimental, una de las características de la depresión como la disminución de la motivación, ha sido reproducida en el modelo de nado forzado. La prueba permite asumir que la inmovilidad desplegada por las ratas o los ratones refleja un estado de desesperanza, es decir, una falla de la persistencia en la conducta dirigida al escape. Así, es posible predecir la acción antidepresiva de diversas sustancias ya que los tratamientos antidepresivos como los tricíclicos, los antidepresivos atípicos, los inhibidores de la recaptura de serotonina y el electrochoque disminuyen la inmovilidad de los animales forzados a nadar (Danysz, 1988; Lucki y Wieland, 1990; Meerch-Mougeot *et al.*, 1993; López *et al.*, 1994, Rodríguez-Landa y Contreras, 2000). Una de las ventajas de la prueba de nado forzado es que permite detectar disminución de la inmovilidad ante el tratamiento con hormonas gonadales en ratas hembras (Rachman *et al.*, 1998; Martínez-Mota *et al.*, 1999). Por lo tanto, la utilidad de esta prueba se amplía para estudiar la fisiopatología de la depresión y posibles participaciones neuroendócrinas. Se ha sugerido que el dimorfismo sexual de la inmovilidad y de la respuesta antidepresiva implica un papel activo de la testosterona en la modulación del estado de ánimo y del componente motivacional. Por tal motivo, el presente trabajo exploró la posible interacción farmacológica de testosterona con fluoxetina y la participación del septum lateral en la modulación de la respuesta anti-inmovilidad.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 DEPRESIÓN**

La depresión es un trastorno biológicamente heterogéneo del cual se desconocen diversos aspectos de su fisiopatología. Una persona clínicamente deprimida puede experimentar una serie de síntomas que le dificultan actuar adecuadamente en su ambiente normal: anhedonia, desesperanza, falta de concentración, deterioro de otras habilidades cognitivas, ideas negativas acerca de sí mismo, abstención social y ruptura de conductas afiliativas. A lo anterior se añaden diversos cambios, por ejemplo, en los hábitos del sueño, en el apetito, en el peso corporal; en los ritmos biológicos y en la función hormonal, entre otros trastornos vegetativos (American Psychiatric Association, 2000; Gilbert y Allan, 1998).

A través de los años la depresión se ha considerado como: a) una reacción ante la pérdida de una persona u objeto importante; b) como consecuencia de la exposición a un nivel de estrés que excede la capacidad del individuo para enfrentarlo; o, c) como la expresión de una anomalía determinada genéticamente responsable de la alteración del estado de ánimo y la emoción (Kato, 2001).

Debido a que las alteraciones psicomotoras son parte de las características de la depresión, es importante revisar algunos aspectos anatomofisiológicos. Las estructuras motoras involucradas en el procesamiento motor son las cortezas pre-motora y motora, el tracto corticoespinal, el tallo cerebral, el tálamo, los ganglios basales y el cerebelo, entre otras. Tradicionalmente, los sistemas límbico y motor han sido considerados como entidades separadas, sin concordancia estructural o funcional; sin embargo, la interfase entre motivación y acción establece que el significado funcional y los mecanismos de integración límbico-motora son un punto importante para el estudio de conductas motivadas. Las estructuras mencionadas se interconectan con el núcleo accumbens, y los circuitos neuroquímicos involucrados son capaces de modular al sistema sensoriomotor del organismo para obtener actividades de aproximación y búsqueda dirigidas hacia eventos novedosos, especialmente si están relacionados con recompensa. En la depresión se presentan alteraciones psicomotoras como la agitación, caracterizada por el movimiento de manos (por ejemplo jalar o estirar la piel, la ropa u otros objetos), en el caso contrario se observa letargo, con su característica

lentitud de discurso, de pensamientos y de movimientos corporales (American Psychiatric Association, 2000).

Asociado a los síntomas afectivos, psicomotores, cognoscitivos y vegetativos que caracterizan a la depresión, también se suman alteraciones de la motivación como el desasosiego, la falta de objetivos, la apatía, la evasión, la disminución de la alimentación, de la conducta sexual y de la conducta maternal, los cuales representan una falta de motivación ante las actividades que normalmente un individuo puede realizar. En la psicopatología de la emoción, la ausencia o disminución de la motivación se manifiesta por disminución del comportamiento dirigido a metas. Se observa ausencia de productividad, de esfuerzo, de iniciativa o perseverancia, de interés por aprender cosas nuevas y de interés en la propia salud, disminución de la socialización y recreación, del tiempo dedicado a actividades de interés y dependencia hacia otros para la realización de actividades. Este conjunto de signos revela que la motivación está alterada en la depresión, lo que se relaciona estrechamente con las alteraciones afectivas, cognoscitivas y vegetativas que caracterizan a este trastorno.

## 2.2 HIPÓTESIS QUÍMICAS DE LA DEPRESIÓN

La hipótesis clásica monoaminérgica asume que la depresión es causada por una actividad insuficiente de las neuronas monoaminérgicas. Esto significaría que la baja disponibilidad de las monoaminas noradrenalina y serotonina causan depresión en personas vulnerables (Schildkraut, 1965). Esta hipótesis se ha apoyado en las siguientes observaciones clínicas: a) la reserpina -potente agente hipotensor- es un depletor monoaminérgico que reduce la cantidad de neurotransmisor liberado desde los botones terminales y puede producir depresión (Sachar y Baron, 1979); b) la tendencia suicida en la depresión está relacionada con una disminución en líquido cefalorraquídeo de los niveles de ácido 5-hidroxiindolacético, que es un metabolito de la serotonina producido cuando ésta es biotransformada por la enzima monoaminoxidasa (Träskmann *et al.*, 1981; Roy *et al.*, 1989); c) la disminución de triptófano -aminoácido precursor de serotonina- causa recaída en la mayoría de los pacientes deprimidos tratados con antidepresivos (Delgado *et al.*, 1990) y, d) el tratamiento con inhibidores de la recaptura de serotonina se usa con éxito en el

tratamiento de la depresión (Rossi *et al.*, 2004). Dicha hipótesis establece que las alteraciones del trastorno depresivo se deben a la disminución de la neurotransmisión serotoninérgica y la noradrenérgica, aunque también se ha implicado al ácido gamaaminobutírico (GABA), el glutamato y la dopamina (Dailly *et al.*, 2004; Kendell *et al.*, 2005).

Para explicar la depresión y la acción de los medicamentos antidepresivos, también existe la hipótesis hormonal que se sustenta en la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Nemeroff, 1998) e involucra a una serie de factores asociados al estrés como la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), los glucocorticoides, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la proteína que se enlaza al elemento de respuesta al AMPc (CREB), entre otros (Páez *et al.*, 2003). De manera cotidiana, cuando una amenaza real o aparente es detectada, el hipotálamo amplifica la producción de hormona liberadora de corticotropinas que induce la secreción hipofisiaria de la hormona adrenocorticotrópica la cual causa la liberación de cortisol en la glándula adrenal. Estos cambios preparan al cuerpo para luchar o huir y disminuyen la ingesta y la actividad sexual. En pacientes deprimidos ocurre hiperactividad de este eje (Goodyer *et al.*, 2000; 2001) y puede estar asociada con hipertrofia de las glándulas suprarrenales y de la hipófisis, con alteraciones en las neuronas hipotalámicas que producen la CRH, con el aumento de niveles de cortisol, y con la elevación de las concentraciones de CRH en el líquido cefalorraquídeo. Estos cambios, se revierten con el tratamiento antidepresivo. Sin embargo, en algunos casos la depresión en estos pacientes con hiperactividad adrenal es resistente a los antidepresivos (Pearson-Murphy *et al.*, 1998), por lo que queda claro que la depresión es un trastorno multifactorial que no se puede atribuir a un sustrato biológico específico y único.

Las manifestaciones clínicas de depresión asociadas con las fluctuaciones cíclicas de las hormonas ováricas están ampliamente documentadas en el género femenino. La hipótesis que cada vez está tomando mayor consistencia es que el síndrome de abstinencia hormonal en mujeres vulnerables desencadena el trastorno depresivo (Hochberg *et al.*, 2003) y en consecuencia, las mujeres que padecen síndrome premenstrual, depresión postparto y menopausia alivian los síntomas

depresivos con tratamiento de restitución hormonal (Bloch *et al.*, 2000; Blum *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2004). De esta forma, el funcionamiento hormonal (gonadal y/o adrenal) debe ser considerado como otro factor que influye en la depresión.

### 2.3 DIMORFISMO SEXUAL EN LA DEPRESIÓN Y EL SUICIDIO

Los trastornos afectivos revisten la característica de expresarse con dimorfismo sexual. Así, dentro de los trastornos del estado de ánimo (American Psychiatric Association, 2000), la depresión es considerada un trastorno psiquiátrico sexualmente dimórfico ya que la prevalencia es dos o tres veces mayor en el sexo femenino comparado con el sexo masculino (Breslau *et al.*, 1995; American Psychiatric Association, 2000; Kessler *et al.*, 2003). En cambio, el suicidio -considerado como la complicación más severa de la depresión- es mayor en hombres tanto en adultos como en adolescentes (Pelkonen *et al.*, 1996). En México, en el año 2001 los intentos de suicidio en hombres representaron un 40% y en mujeres un 60%, pero el suicidio consumado es más frecuente en hombres (82%) que en mujeres (18%). Esto sugiere una contribución de las hormonas gonadales en la neurobiología de la depresión y del suicidio (INEGI, 2002).

### 2.4 ESTEROIDES SEXUALES

#### 2.4.1 Hormonas gonadales

Las hormonas gonadales son compuestos esteroides cuya estructura química consiste en un sistema anular tetracíclico, con grupos funcionales distintos unidos en diversos sitios de los cuatro anillos que las distingue de otros compuestos con actividad biológica. Las hormonas gonadales se llaman así por ser sintetizadas en las gónadas (ovarios y testículos), las cuales son órganos bifuncionales debido a que producen células germinales y hormonas (sexuales). En general, las hormonas esteroides están ampliamente distribuidas en plantas y animales, y la ubicación de los diferentes grupos funcionales hace posible su amplia diversidad de funciones. En los vertebrados, los esteroides están conformados no sólo por las hormonas sexuales, sino también por los esteroides, los ácidos biliares y las hormonas de la corteza adrenal. El esteroide más común es el colesterol. Se encuentra en casi todos los tejidos incluyendo el cerebro, es

el precursor de todas las hormonas esteroidales y puede ser sintetizado *de novo* o derivado del plasma a través de endocitosis de lipoproteínas de baja densidad. Así, las hormonas gonadales se sintetizan a partir del colesterol en los ovarios y en los testículos y son responsables de los caracteres sexuales secundarios y de la conducta sexual. En las hembras se sintetizan mayoritariamente la progesterona y los estrógenos; en los machos, la testosterona y sus compuestos derivados. Las hormonas gonadales son producidas y liberadas por los ovarios y los testículos en respuesta a niveles plasmáticos apropiados de hormonas gonadotrópicas hipofisarias (FSH y LH). Su síntesis y liberación son reguladas a través de un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido entre el hipotálamo y la hipófisis anterior. Aunque comúnmente a la progesterona y al estradiol se les denomina hormonas femeninas (ováricas) y a la testosterona hormona masculina (testicular), también ocurre la producción de testosterona en el ovario, y de progesterona y estradiol en el testículo, debido a que comparten la misma vía sintética tanto a nivel periférico como central (Zurrow *et al.*, 1964; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999).

#### 2.4.2 Neuroesteroides.

La existencia de la síntesis local de esteroides por el cerebro ha llevado a acuñar el término neuroesteroide y a hacer la distinción entre neuroesteroide y esteroides neuroactivos. Neuroesteroide es aquel esteroide que se sintetiza en el sistema nervioso a partir de colesterol y que actúa localmente, incluso independientemente de la extirpación de las gónadas y las glándulas suprarrenales. Un esteroide neuroactivo es aquel esteroide que actúa sobre el sistema nervioso (Corpechot *et al.*, 1981; Corpechot *et al.*, 1983; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999; Stoffel-Wagner, 2001). La presencia de enzimas sintéticas o modificadoras de esteroides hace del tejido nervioso un tejido esteroideogénico. Se acepta que las principales células esteroideogénicas en el sistema nervioso central son los oligodendrocitos, los astrocitos y las neuronas (Zwain y Yen, 1999). La capacidad en la esteroideogénesis cerebral sugiere una contribución tripartita de los tres tipos celulares que provee de neuroesteroides al tejido nervioso (Veiga *et al.*, 2004).

### 2.4.3 Mecanismos de acción de los esteroides en el sistema nervioso.

#### 2.4.3.1 Receptores intracelulares.

Las acciones de las hormonas sexuales en el sistema nervioso ocurre a través de su interacción con sus receptores intracelulares: el receptor de progesterona, los receptores de estrógenos y el receptor de andrógenos. Estos receptores son factores nucleares de transcripción, es decir, proteínas que se unen al ADN y así, regulan la transcripción de genes específicos. De esta manera, las hormonas sexuales aumentan o disminuyen la síntesis de proteínas.

#### 2.4.3.2 Receptores de membrana

Además de los receptores intracelulares, existen receptores esteroidales en la membrana celular (Kelly y Levin, 2001; Simoncini y Genazzani, 2003). La membrana celular posee sitios de unión para varios esteroides, entre ellos la progesterona, la vitamina D, la testosterona, la dehidroepiandrosterona y los estrógenos. Los efectos que desencadenan se han llamado "no transcripcionales", ya que la unión del esteroide con su receptor no provoca una modificación directa en la expresión génica, sino que supone una respuesta celular más rápida que parece involucrar la intervención de otros receptores de membrana y vías de señalización intracelular. No obstante, no debe descartarse un efecto a largo plazo ya que al incrementar la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y regular las cinasas, varía la expresión de determinados genes. Por tanto, los efectos de un esteroide son de intervalo amplio y abarcan efectos genómicos y no genómicos que muchas veces pueden ser mecanismos complementarios en la respuesta celular a un esteroide (Veiga *et al.*, 2004).

Los esteroides modulan alostéricamente los receptores ionotrópicos y los transportadores de neurotransmisores. La modulación alostérica, al igual que la interacción del esteroide con receptores de membrana específicos, genera inicialmente respuestas independientes de la síntesis de ARN o de proteínas, por lo que sus efectos entran también en la categoría de "no transcripcionales". Uno de los primeros efectos rápidos producidos por los esteroides en el sistema nervioso es la regulación de corrientes iónicas a través de la membrana celular. Este fenómeno se determina por la interacción de los esteroides con receptores para neurotransmisores. Casi la totalidad de los receptores ionotrópicos conocidos modifican su función en presencia de los

esteroides. Este es el caso de la modulación alostérica de los receptores GABA<sub>A</sub>. Por ejemplo, la alopregnanolona es un modulador positivo de los receptores GABA<sub>A</sub>, ya que aumenta el flujo de Cl<sup>-</sup> al producir un incremento en la frecuencia y/o duración de apertura de este canal iónico. También se ha descrito la modulación alostérica, producida por esteroides, de otros receptores ionotrópicos, como son los 5-HT<sub>3</sub>, los del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), los del ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), los de kainato, glicina y los nicotínicos. La modulación alostérica de los receptores para neurotransmisores genera respuestas con latencias de milisegundos a segundos, lo que constituye acciones rápidas de los esteroides. Por último, cabe mencionar que los esteroides también pueden ejercer sus efectos en las células nerviosas sin interactuar con receptores, por ejemplo, el estradiol posee propiedades antioxidantes (Veiga *et al.*, 2004).

#### 2.4.4 Funciones indentificadas de los esteroides sexuales

Una de las principales funciones de los esteroides sexuales es precisamente ejercer efectos organizadores y activadores sobre los genitales y los caracteres sexuales secundarios. Naturalmente, estos efectos influyen en la conducta mediante su acción directa en el sistema nervioso central, determinando la conducta sexual. Sin embargo, el cerebro es capaz de sintetizar esteroides y de metabolizarlos en derivados que pueden funcionar como potentes neuromoduladores de la conducta no reproductiva. Por ejemplo, las enzimas del cerebro sintetizan progesterona y la biotransforman para formar sus derivados reducidos, dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona (alopregnanolona). La alopregnanolona modula la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> y es un potente ansiolítico y antidepresivo (Morrow *et al.*, 1987; Bitran *et al.*, 1991). Esta molécula aumenta la eficacia antidepresiva de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, mientras que el tratamiento con estos antidepresivos aumenta los niveles de alopregnanolona en el cerebro (Uzunov *et al.*, 1996; Nechmad *et al.*, 2003). Entre otros mecanismos neuroprotectores de los esteroides, se ha observado un incremento local de los niveles de pregnenolona y progesterona después de un traumatismo en el cerebro y la médula espinal. También se incrementa la actividad de aromatasas con la consecuente síntesis aumentada de estradiol, cuya inhibición produce neurodegeneración, lo que sugiere que la

esteroidogénesis es un mecanismo que el tejido nervioso utiliza para enfrentar condiciones neurodegenerativas (García-Ovejero *et al.*, 2005)

Fisiológicamente, la testosterona tiene la función de estimular la síntesis de eritropoyetina (hormona que induce la producción de eritrocitos) en los riñones, lo cual contribuye a que el hematocrito de varones sea mayor (47%) que en las mujeres (42%). Adicionalmente, los andrógenos producen efectos adversos sobre la función cardiovascular produciendo hipertensión y alteraciones del ritmo cardíaco (Cavasin *et al.*, 2003). Respecto a la regulación de las emociones, la conducta agresiva ha sido estudiada ampliamente y se conoce que está controlada por circuitos neurales estimulados por andrógenos. En este sentido, la testosterona tiene función organizadora y activadora de agresión desplegada entre machos, entre hembras y en la conducta maternal.

## 2.5 HORMONAS ESTEROIDALES Y CONDUCTA AFECTIVA

Los esteroides desempeñan un papel importante en múltiples procesos neurales (Schumacher *et al.*, 2003), por lo que la alteración en sus niveles plasmáticos podría estar asociada con la etiología de algunas enfermedades psiquiátricas, como los trastornos afectivos.

### 2.5.1 Deshidroepiandrosterona, estrógenos, progesterona.

La deshidroepiandrosterona, hormona adrenal que también es un neuroesteroide, se ha ensayado como una alternativa de terapia hormonal antidepresiva. En un estudio controlado doble ciego, se demostró que la administración de esta hormona por seis semanas disminuyó la depresión en hombres y mujeres (Schmidt *et al.*, 2005). A pesar de éste y otros hallazgos similares, la terapia con deshidroepiandrosterona es controvertida debido a la limitada disponibilidad de ensayos clínicos controlados y reportes epidemiológicos. En ensayos clínicos se ha investigado el potencial terapéutico de este andrógeno y se han obtenido resultados inconsistentes. La disminución de deshidroepiandrosterona con la edad ha sido correlacionada con una serie de alteraciones de la salud. Los estudios farmacocinéticos y clínicos controlados sugieren que dosis orales de 30-50 mg de deshidroepiandrosterona conducen a valores fisiológicos normales de testosterona,

pero sólo se observa en mujeres. Tales incrementos en pacientes con insuficiencia adrenal se asocian con la mejoría de la función sexual, la autoestima, el estado de ánimo y la disminución de la fatiga. Por tanto, mientras que la terapia de reemplazo con deshidroepiandrosterona es efectiva en pacientes con disfunción adrenal, en otras enfermedades, incluyendo la depresión y los síntomas perimenopáusicos, no se han encontrado hallazgos consistentes (Cameron y Braunstein, 2005).

En la revisión de Epperson *et al.* (1999) se destaca que los estrógenos conjugados revierten la depresión en pacientes posmenopáusicas resistentes a antidepresivos (Klaiber *et al.*, 1979). Adicionalmente, las mujeres con más años de menopausia y niveles de estradiol elevados debidos al tratamiento, tuvieron más disforia con la combinación de estrógenos y progestinas, comparadas con aquellas con menopausia reciente y niveles más bajos de estradiol (Klaiber *et al.*, 1997). Sin embargo, ambos grupos mejoraron su estado de ánimo cuando los estrógenos se administraron como tratamiento único. No ha habido réplicas publicadas de estos estudios en mujeres con depresión mayor no asociada con cambios endócrinos drásticos y no se ha podido demostrar la superioridad del tratamiento con estrógenos sobre el placebo para aumentar la respuesta antidepresiva con imipramina en mujeres deprimidas. En cambio, se demostró el efecto de los estrógenos para precipitar manía en un caso de depresión mayor recurrente, la manía desapareció al suspender el tratamiento con estrógenos (Oppenheim, 1984). A pesar de la evidencia de que los estrógenos puedan ser efectivos en el tratamiento de depresión no relacionada específicamente con la función reproductiva en mujeres, todo el trabajo se ha realizado para el tratamiento de los trastornos afectivos asociados con la fase lútea del ciclo menstrual, el puerperio o la menopausia. La depresión moderada en la perimenopausia disminuye con la terapia con estrógenos pero no sucede lo mismo con la depresión severa en la posmenopausia (Ripley *et al.*, 1940). Además, hay evidencias crecientes de que la asociación de antidepresivos, como la fluoxetina, con estrógenos es de mayor utilidad para el tratamiento de la depresión en la menopausia, comparado con el tratamiento único con estrógenos (Schneider *et al.*, 1997).

En el caso de la progesterona, los resultados en el tratamiento del síndrome premenstrual (SPM) son controversiales. Uno de los problemas ha sido la exclusión de

mujeres con trastornos psiquiátricos comórbidos, lo que es necesario para el adecuado diagnóstico de SPM. También la medida de los síntomas físicos y psicológicos varía, ya que en algunos estudios se han empleado escalas no validadas. Aunque en algunos casos, se ha encontrado la disminución de síntomas del SPM como los sentimientos de culpa, baja autoestima, ansiedad, tensión, cambios del estado de ánimo, irritabilidad, ha sido omitido el uso de escalas clínicas para evaluar el puntaje total de manera confiable. Cada uno de estos estudios puede ser criticado por no usar entrevistas clínicas estructuradas para determinar antecedentes de depresión, los cuales son un factor determinante, ya que hay evidencia de una función GABAérgica diferencial en mujeres con historia de depresión mayor comparada con aquellas que no la tienen. Esto es, los niveles plasmáticos de GABA incrementaron a partir de la mitad de la fase folicular a la fase tardía de la fase lútea en mujeres control. Las mujeres con SPM e historia de depresión mayor tuvieron bajos niveles plasmáticos de GABA en ambas fases. En mujeres con SPM pero no depresión mayor, los niveles de GABA disminuyeron desde la fase asintomática folicular a la fase lútea tardía sintomática (Halbreich *et al.*, 1996). A diferencia de los estudios que intentan explorar el potencial antidepressivo de la progesterona en el SPM, sólo hay un reporte con el tratamiento de progesterona para la depresión posparto en el que se investigaron a mujeres con tratamiento de progesterona durante dos meses después del parto (Dalton, 1989). Las pacientes tratadas tuvieron una recurrencia del 7% comparado con el 67% en 21 mujeres que no recibieron progesterona, sin efectos adversos. Sin embargo, estos hallazgos no han sido confirmados por estudios controlados (Epperson *et al.*, 1999).

También, se ha especulado que la administración de hormonas gonadales puede causar depresión. Del 10 al 40% de mujeres que usan anticonceptivos orales desarrolla síntomas moderados de depresión (Kane, 1976), pero se ha observado que la adición de medroxiprogesterona al tratamiento transdermal con estrógenos no produce efectos adversos físicos o psicológicos comparado con placebo (Kirkham *et al.*, 1991). Por el contrario, en un estudio aleatorizado, se encontraron más efectos adversos sobre el estado de ánimo cuando las pacientes fueron tratadas con anticonceptivos orales combinados, mientras que las que recibieron sólo progesterona reportaron mejoría del estado de ánimo (Graham *et al.*, 1995). Aunque estos casos no

evidencian el papel de la progesterona, hay un reporte de dos mujeres que desarrollaron desórdenes psiquiátricos severos secundarios al uso de la progestina levonorgestrel. Ambas pacientes tuvieron síntomas depresivos con ataques de pánico durante los dos meses de tratamiento con levonorgestrel, los cuales desaparecieron con la suspensión del tratamiento. En otro caso, un grupo de mujeres posmenopáusicas que recibieron progestágenos en los últimos 11 días de un ciclo de administración con estrógenos durante 28 días, experimentaron cambios negativos del estado de ánimo durante los primeros tres días en que recibieron los progestágenos, hallazgos que han sido confirmados por otros autores (Epperson *et al.*, 1999).

### 2.5.2 Testosterona

Cabe notar el contraste entre la abundante literatura acerca de las hormonas ováricas con la escasa información de la acción de los andrógenos sobre la conducta afectiva. En general, la testosterona ha sido considerada como la hormona reguladora de la agresión y la conducta sexual, pero algunos hallazgos sugieren que también promueve mejoría del estado de ánimo (McCaul *et al.*, 1992). En las investigaciones al respecto, se ha pretendido encontrar correlatos entre la conducta afectiva y los niveles hormonales de testosterona. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de testosterona son elevados en sujetos que han alcanzado el triunfo en encuentros deportivos comparado con los competidores perdedores (Mazur y Lamb, 1980); además, se ha observado una elevación anticipada de la testosterona ante un evento de competencia (Booth *et al.*, 1989), al parecer como precursora de la motivación para luchar. Por ello, se ha sugerido que el nivel plasmático de la testosterona está asociado con el estado de ánimo en el género masculino y se observa que el papel de la testosterona es más complejo que el concebido tradicionalmente como modulador de conducta reproductiva.

En relación con el estrés, considerado como un factor causal de ansiedad y depresión, el nivel plasmático de la testosterona disminuye en el caso de situaciones estresantes en médicos residentes, empleados, deportistas o en el estrés postraumático (Chatterton y Dooley, 1999; Kaergaard *et al.*, 2000; Mulchahey *et al.*, 2001; Spivak *et al.*, 2003), mientras que otros autores muestran que la testosterona plasmática en voluntarios sanos se correlaciona positivamente con diferentes tipos de estrés, somático, físico o psicosomático (Christiansen *et al.*, 1985; Obminski *et al.*,

1997). Se sugiere que la disminución rápida de la testosterona plasmática en el estrés se debe a la supresión de la síntesis de testosterona mediada por los glucocorticoides en el humano (por corticosterona en ratas) a través de mecanismos no genómicos en los cuales hay disminución de la producción de AMPc citoplasmático y por lo tanto, se trata de un efecto inhibitorio directo de los corticoides sobre las células de Leydig (Dong *et al.*, 2004). Por ello, cuando el organismo se prepara para enfrentar el estrés, se inhiben conductas irrelevantes en ese contexto, como la reproductiva. En este sentido, Davies y colaboradores (1992) proponen que la disminución de testosterona se puede asociar con cuadros de ansiedad que anteceden a la depresión en hombres y mujeres con disfunción sexual, incluso, con la alteración de la función gonadal asociada con infecciones por VIH (Hengge, 2003) y otras condiciones médicas.

Se ha insistido en la determinación de la concentración salival y plasmática de testosterona como marcador biológico de la depresión (Davies *et al.*, 1992; Stalenheim *et al.*, 1998; Schweiger *et al.*, 1999) y, aunque se trata de asociaciones entre una variable bioquímica y una variable psiquiátrica que no denotan la relación causa-efecto, pueden ser de cierta utilidad. Los conocimientos sobre los efectos de los andrógenos en el trastorno depresivo aún son inconsistentes. La falta de consistencia en los estudios se podría deber a diferencias en los grupos de pacientes, diferencias individuales, el método para medir la concentración de testosterona, los niveles de cortisol (los cuales interfieren con los niveles de testosterona), el uso concomitante de medicamentos y la falta de estudios controlados (Stembach, 1998).

En la mujer ocurren algunas asociaciones entre la testosterona y la depresión, por ejemplo, los niveles de testosterona están elevados en mujeres con depresión mayor (Baischer *et al.*, 1995). Por su parte, Rohr (2002) propuso un modelo de alteraciones orgánicas cuando los niveles de estradiol y los de testosterona están fuera de los niveles normales (ver la figura 1A). Esto es, los niveles plasmáticos suprafisiológicos de testosterona en mujeres jóvenes se han relacionado con depresión, entre otras enfermedades, mientras que la combinación de bajos niveles de estradiol y elevados niveles de testosterona en mujeres bulímicas suele relacionarse con depresión y agresividad (Rohr, 2002). En el periodo post-parto se mostró que los niveles de testosterona se correlacionan positivamente con depresión e ira

(Hohlagschwandtner *et al.*, 2001). Durante el climaterio la participación de la testosterona en la depresión es desconocida, pero existen algunos estudios que han reportado mejoría en el estado de ánimo cuando se administra testosterona en asociación con estradiol y progesterona en mujeres climatéricas o con menopausia quirúrgica (Brincat *et al.*, 1984; Sherwin y Gelfand, 1985; Simon, 2001). Por otro lado, la depresión asociada con la conducta criminal en mujeres ha sido también relacionada con testosterona plasmática elevada (Cashdan, 1995; Dabbs y Hargrove, 1996). Además, se ha propuesto que la elevación de los andrógenos es responsable de los cambios emocionales y el alto riesgo de depresión en mujeres adolescentes (Angold *et al.*, 1999). No obstante, también existen reportes donde no se encontró relación entre los niveles de testosterona y la sintomatología afectiva a lo largo del ciclo menstrual (Dougherty *et al.*, 1997) e incluso se han reportado niveles plasmáticos significativamente bajos en mujeres con síndrome premenstrual (Bloch *et al.*, 1998). En síntesis, existen contradicciones en la suposición de que los niveles de testosterona ejercen efectos deletéreos sobre la conducta afectiva, sin perder de vista que puede haber alguna importancia biológica.

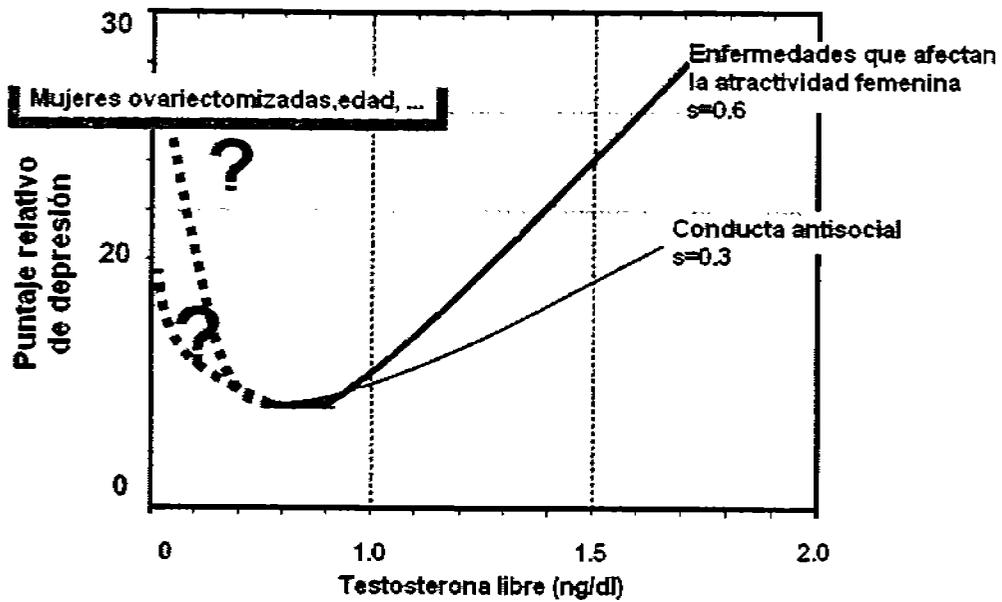
En el caso del hombre, algunos sujetos con depresión severa tienen alterada la función gonadal, reflejada por una disminución de la concentración de testosterona plasmática. Esto es particularmente observado en sujetos menores de 55 años (Schweiger *et al.*, 1999). Si la depresión es originada por estrés, entonces los niveles disminuidos de testosterona se explicarían por la interacción con las sustancias endógenas que se liberan durante el estrés. En pacientes geriátricos no se ha encontrado una relación entre la depresión y los niveles bajos de testosterona (T'sjoen *et al.*, 2005). En un estudio retrospectivo no se encontró relación entre los niveles bajos de testosterona (<3 ng/ml) con la depresión, pero sí con una disminución de la función física, por lo que los autores concluyen que se necesitan estudios prospectivos con muestras mayores para confirmar estos hallazgos (Shores *et al.*, 2004).

Booth *et al.* (1999) revisaron la posibilidad de que la testosterona esté relacionada con la depresión y, de ser así, cuál sería el modelo que mejor explicaría esta relación en el género masculino. Sus datos revelaron una relación parabólica. Por un lado, en hombres cuyos niveles de testosterona están por debajo del promedio

normal, hay una relación directa con la depresión; por el otro, los hombres con testosterona elevada tienen mayor probabilidad de desarrollar conductas de riesgo por la impulsividad que los caracteriza y también de desarrollar conductas antisociales. En estas personas el fracaso incrementa la posibilidad de padecer depresión (ver la figura 1B). Estos autores proponen que la testosterona tiene un papel social, afirman que los hombres con elevados niveles de testosterona tienen menos probabilidad de estar deprimidos siempre y cuando se encuentren socialmente integrados, por ejemplo, a través del matrimonio o del empleo, pero no consideran si en esta última asociación los niveles elevados de testosterona son causa o efecto de la integración social. Con base en lo anterior, es posible que la testosterona participe de alguna manera en el estado de ánimo.

A diferencia de la mujer en la que alrededor de los 40 años de edad el envejecimiento ovárico y agotamiento de los óvulos da lugar a la menopausia (última menstruación), en el hombre prácticamente no ocurre una transición equivalente en las alteraciones de los niveles hormonales y las características de los espermatozoides. Se presupone que con el envejecimiento ocurrirá la andropausia (Stembach, 1998); pero, la diferencia es que los hombres en la vejez (alrededor de los 70 años de edad), no experimentan la suspensión rápida y total de la función de las células de Leydig o de los túbulos seminíferos. El descenso en la función de las células de Leydig comienza aproximadamente a los 40 años con el consecuente descenso en las concentraciones plasmáticas de la testosterona que usualmente se acompaña de aumento moderado en la concentración plasmática de gonadotropinas. Lo usual es que las gonadotropinas se mantengan en el límite superior del rango normal del adulto joven, aún en presencia de hipotestosteronemias totales menores de 7.0 nmol/L (200 ng/dl), que catalogan al hombre de cualquier edad como hipogonádico. No se sabe si estos cambios son universales o si son más prevalentes en algunas poblaciones, lo que si es notorio es una alta variabilidad posiblemente dependiente de enfermedades concomitantes y medicaciones.

A)



B)

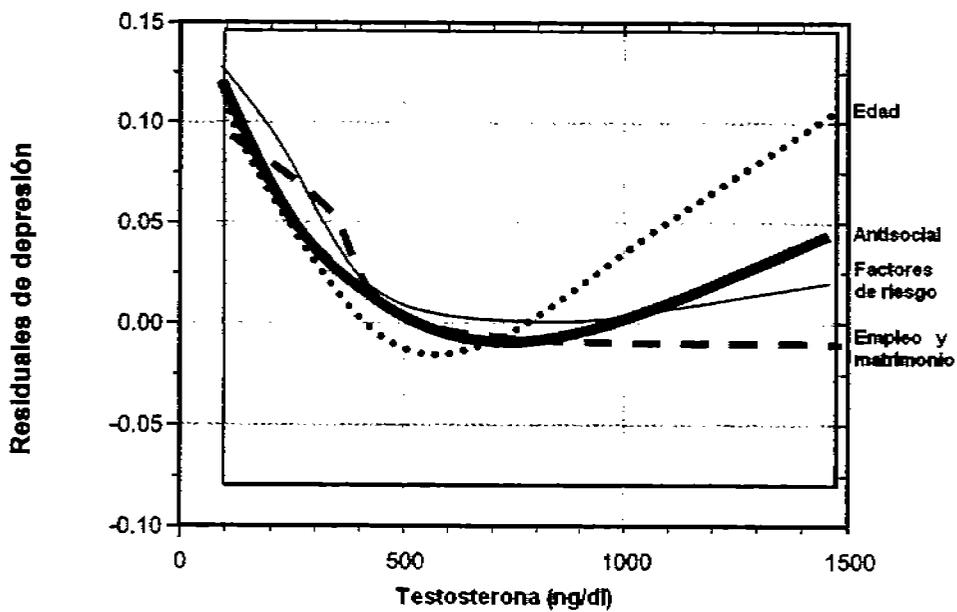


Figura 1. Testosterona y depresión en mujeres (A) y hombres (B). Se muestra la correlación de los niveles plasmáticos de testosterona con la depresión en un modelo de curva parabólica propuesto por Rohr, 2002 y Booth et al., 1999. (Traducido de Rohr, 2002).

La andropausia se caracteriza por el declive gradual de algunos otros aspectos fisiológicos del hombre: la capacidad de concentración y la memoria disminuyen, hay pérdida de fuerza muscular; se produce un incremento de la grasa y cambia la distribución de la misma en el cuerpo; la masa ósea se reduce y puede aparecer la osteoporosis, disminuyen la potencia y el interés sexual, se altera el ritmo de sueño, se registran cambios de carácter y, notablemente, surgen cuadros de depresión de mayor o menor severidad (Novák *et al.*, 2002).

La andropausia no se caracteriza por síntomas psicológicos específicos, pero éstos pueden asociarse con síntomas depresivos que no se consideran como patológicos (Delhez *et al.*, 2003). De cualquier manera, la disfunción testicular con la consecuente disminución de testosterona plasmática en hombres a partir de los 40 años de edad, puede constituir un vínculo entre un estado de salud pobre y la sensación de bienestar (Feldman *et al.*, 2002), lo cual sugiere una correlación negativa entre el grado de depresión y los niveles de testosterona en el género masculino. Es importante resaltar algunos aspectos que podrían ser subestimados, tales como la reducción en la ingesta de alimentos y la pérdida de peso, los cuales frecuentemente acompañan a la depresión y a la disminución de los niveles de testosterona. En este sentido, es de esperarse que en situaciones de déficit hormonal que cursan con depresión como en la vejez, la disfunción gonadal, el hipogonadismo o en la depresión resistente a antidepresivos, la terapia de reemplazo hormonal con andrógenos en el hombre sea antidepresiva como ya ha sido demostrado en algunos estudios (Morrison, 1997; Stembach, 1998; Seidman y Rabkin, 1998).

Cabe mencionar un reporte histórico de 1889, en el que se intentó demostrar los efectos rejuvenecedores de la testosterona. Se trata del neurólogo y fisiólogo Charles E. Brown-Séquard quien a los 72 años de edad, experimentó y reportó dramáticos efectos rejuvenecedores después de la auto-administración de extractos testiculares de perros y cobayos. Este reporte tuvo como consecuencia el amplio consumo de estos extractos en Europa y el norte de América por varias décadas. Sin embargo, en un estudio realizado para determinar si los extractos (preparados de acuerdo a los métodos de Brown-Séquard) contenían cantidades biológicamente relevantes de testosterona, se demostró solamente un potente efecto placebo. Las concentraciones

de testosterona fueron cuatro órdenes de magnitud inferiores a las requeridas para producir un efecto biológico, debido a que con extractos acuosos no es posible obtener cantidades suficientes de testosterona porque se trata de una hormona liposoluble (Cussons *et al.*, 2002). Actualmente se dispone de presentaciones farmacéuticas de testosterona que aseguran el incremento de los niveles circulantes en el organismo para tratar el hipogonadismo, la osteoporosis por deficiencia de andrógenos, el hipopituitarismo y la infertilidad por trastornos de la espermatogénesis, pero debe advertirse sobre los riesgos que conlleva todo tratamiento con testosterona, como priapismo, azoospermia, oligospermia, ictericia, carcinoma prostático, retención hídrica y de electrolitos y aumento de peso.

Por otro lado, los esteroides anabólicos (metiltestosterona, nandrolona, oxandrolona, trenbolona, entre otros) son andrógenos sintéticos que, comparados con la testosterona, tienen mayor actividad anabólica (promotora del crecimiento) que androgénica (masculinizante). Los riesgos y beneficios afectivos derivados del abuso de compuestos anabólicos para aumentar la capacidad muscular o para propósitos estéticos también han sido explorados. En caso de abuso, las acciones de estos anabólicos se han asociado con ansiedad, paranoia, depresión, tendencia suicida, impulsividad, hostilidad, agresión y manía (Pope y Katz, 1988; Perry *et al.*, 1990, Yates *et al.*, 1992; Su *et al.*, 1993; Galligani *et al.*, 1996; Pope y Katz, 1994; Pope *et al.*, 2000). En este sentido, el reto para avanzar en el estudio de los efectos psiquiátricos de la testosterona y otros andrógenos se limita ante las implicaciones éticas de probar dosis elevadas en voluntarios sanos y, en general, en seres humanos. Al parecer conforme se utilizan dosis cada vez más altas, la relación riesgo/beneficio se vuelve más negativa (Yates, 2000); es decir, los efectos secundarios y/o adversos: hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata, apnea del sueño, retención hídrica con empeoramiento de la hipertensión arterial cuando ella exista, policitemia y ginecomastia, pueden predominar sobre los efectos anabólicos y androgénicos deseados. El estudiar grupos de alto riesgo, tales como aquellos con estado de ánimo pre-mórbido o desórdenes de la conducta, también implica serios problemas bioéticos.

## 2.6 FLUOXETINA EN EL TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN

La fluoxetina es un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina muy utilizado como antidepresivo. Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina son frecuentemente prescritos; bloquean inmediatamente la recaptura de serotonina (5-HT) aunque el establecimiento de los efectos terapéuticos requiere de semanas de tratamiento. Este retraso es el resultado de mecanismos adaptativos presinápticos y postsinápticos secundarios a la inhibición de la recaptura, como ocurre con otros antidepresivos inhibidores de la recaptura de serotonina y noradrenalina (ISRN) o los clásicos antidepresivos tricíclicos y aun los IMAO. La clorimipramina, es uno de los mejores antidepresivos, aunque la presencia de sus múltiples efectos colaterales es una seria limitante de su uso. De hecho, el éxito de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina descansa en su seguridad, mejor tolerancia y efectos colaterales menos severos que los tricíclicos, lo que provee confianza y mejora la calidad de vida del paciente deprimido.

Tal vez, el receptor serotoninérgico más relacionado con efectos antidepresivos de los inhibidores de la recaptura de serotonina ha sido el 5-HT<sub>1A</sub>. A pesar de las evidencias experimentales, muchos de los agonistas selectivos al receptor 5-HT<sub>1A</sub> desarrollados últimamente, han fallado para demostrar eficacia clínica. Los antidepresivos actuales poseen dos problemas principales: una eficacia menor que la óptima y un lento establecimiento de la acción. Así, los fármacos ejercen su acción farmacológica inicial en horas, pero requieren de semanas de administración antes de que ocurra la mejoría clínica. En una alta proporción de pacientes, el tratamiento debe mantenerse por años para evitar de manera adecuada las recaídas y las recurrencias. Como ya se dijo, el retraso inicial en la acción clínica resulta de mecanismos neurobiológicos adaptativos secundarios a la activación del sitio farmacológico inicial. Esto incluye cambios presinápticos en neuronas monoaminérgicas y postsinápticos en áreas corticolímbicas, posiblemente involucrando alteración de la expresión genética, que restaura la función de los circuitos cerebrales alterados en la depresión mayor. Por tanto, es claro que estamos aún lejos del antidepresivo ideal, esto es, con un sitio de unión directo y bien definido (un receptor post-sináptico o mensajero intracelular) y con alta efectividad y rapidez del establecimiento de las acciones (Celada *et al.*, 2004).

## 2.7 FLUOXETINA Y RIESGO DE SUICIDIO EN ADOLESCENTES

En 1991, la FDA sostuvo una reunión pública para discutir las preocupaciones extendidas acerca de que la fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina recientemente lanzado al mercado en aquel entonces, causaba suicidios. Docenas de personas relataron sus experiencias personales que describían tales conductas en familiares y amigos poco después de haber iniciado el tratamiento con fluoxetina para tratar la depresión. Después, se realizó un meta-análisis de estudios clínicos doble-ciego realizados por la compañía Eli-Lilly y se concluyó que la fluoxetina no está asociada con el riesgo de suicidio (Beasley *et al.*, 1991). Cuestionamientos más recientes acerca de la seguridad de otro inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina como la paroxetina, han subrayado el posible riesgo elevado de suicidio en jóvenes. En el Reino Unido, se realizó un reporte de un grupo experto sobre inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina que describió la continua preocupación sobre el tema. Inicialmente se advirtió que con todos los antidepresivos, los pensamientos suicidas ocurren antes de que se establezca el efecto clínico del tratamiento antidepresivo. También se refirió a ensayos clínicos conducidos por la compañía que produce paroxetina, los cuales aparentemente orillaron a concluir que la paroxetina estaba contraindicada en pacientes menores de 18 años con depresión mayor. La controversia se ha desatado debido a que al parecer estos estudios no se han hecho públicos y no han podido ser documentados a profundidad. A pesar de esto, la FDA informó en 2003 que existe una incertidumbre continua sobre la relación de los antidepresivos y el suicidio en jóvenes y exhorta a analizar información adicional y discutir públicamente la información disponible.

Un estudio reciente de casos y controles realizado en el Reino Unido concluyó que el riesgo de conducta suicida después de iniciar tratamiento antidepresivo es similar entre los que consumen amitriptilina, fluoxetina y paroxetina comparado con los pacientes tratados con el antidepresivo tricíclico dotiepina. El riesgo de suicidio incrementa en el primer mes de tratamiento antidepresivo, especialmente durante los primeros nueve días, pero basados en la limitada información existente, los autores concluyen que no hay diferencia sustancial en el efecto de los cuatro antidepresivos en pacientes de 10 a 19 años (Jick *et al.*, 2004).

Actualmente, con base en una revisión de diversos estudios controlados con placebo, la FDA ha solicitado a las compañías que producen antidepresivos incluir una advertencia en las etiquetas de sus productos que alerten sobre un incremento de riesgo de suicidio (ideación e intento suicida) en niños y adolescentes que estén siendo tratados con estos agentes y que incluyan información adicional acerca de los resultados de estudios pediátricos.

## 2.8 DESAFÍO FARMACOLÓGICO

El término desafío farmacológico involucra administrar una sustancia de prueba bajo condiciones controladas para elucidar algunos aspectos de la función biológica o conductual en el organismo en estudio. Se basa en la concepción de que las anomalías funcionales reales pueden no ser evidentes en un estado basal debido a la acción de mecanismos compensatorios. Bajo tales circunstancias, la perturbación farmacológica de un sistema específico puede revelar información acerca de la integridad funcional del mismo sistema y de otros que lo modulan. Los usos de esta estrategia son: a) generación y prueba de hipótesis en relación a la patofisiología del trastorno, b) determinación de los efectos y mecanismos de acción de los tratamientos, c) identificación de subtipos diagnósticos fisiopatológicamente distintos y d) aplicaciones clínicas como: pruebas diagnósticas, predictor de la respuesta al tratamiento, medios para determinar la eficacia del tratamiento y predictor de recaída (Price *et al.*, 2004).

En estudios de trastornos neuropsiquiátricos, una investigación ideal de desafío debe contemplar un mecanismo de acción que esté bien caracterizado a nivel preclínico, ser farmacológicamente selectivo para el sistema en estudio, no tener metabolitos activos e inducir respuestas sensibles, confiables y accesibles a la medición clínica, y, por último, ser un reflejo de la función cerebral. La seguridad y la conveniencia son cualidades deseables. La dosificación, la vía de administración, las condiciones ambientales de la situación de prueba y las características del investigador-observador, son factores adicionales que deben estandarizarse, debido a que pueden contribuir a respuestas no deseadas e inesperadas (Price *et al.*, 2004).

En la práctica, pocas investigaciones de desafío farmacológico reúnen todos los criterios. A pesar de esto, el paradigma de desafío farmacológico goza de cierta popularidad entre investigadores. Algunos procesos neurobiológicos clínicamente relevantes son difíciles de estudiar en pacientes *in vivo*, y el potencial que posee el paradigma para aclarar la patofisiología es aún extenso. Este potencial ha sido aprovechado en las investigaciones de la función serotoninérgica en la depresión (Price *et al.*, 2004); por ejemplo, existen pruebas de desafío farmacológico que consisten en la estimulación de un sistema de neurotransmisión a través de una dosis única de un fármaco, lo que permite medir algunos efectos como la concentración plasmática de algunas hormonas o algunos efectos neurofisiológicos, conductuales o clínicos (Gijssman *et al.*, 2004).

Los estudios de desafío farmacológico se han empleado en la clínica, pero también es posible utilizarlos en la investigación básica, por ello, utilizar esta herramienta de investigación puede resultar de utilidad cuando se sospecha de ciertas interacciones que han sido escasamente estudiadas, como en el caso de la relación entre la testosterona y la respuesta antidepresiva a inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina.

## 2.9 APROXIMACIONES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA DEPRESIÓN

### 2.9.1 Modelos animales

Es posible reproducir varias de las manifestaciones clínicas de la depresión en modelos animales, los cuales funcionan como pruebas en el desarrollo de programas experimentales de este trastorno, como símiles para investigar aspectos de la neurobiología de la depresión y como modelos experimentales que permiten estudiar las acciones de fármacos antidepresivos (Willner, 1994). La característica común de los modelos de depresión es que las alteraciones conductuales inducidas pueden revertirse con los tratamientos antidepresivos (ver tabla 1). McKinney y Bunney (1969) establecieron los criterios de validez que debe satisfacer un modelo animal: 1) similitud en los factores que inducen las alteraciones de la conducta; 2) semejanza entre las alteraciones conductuales humanas, con aquellas producidas experimentalmente en el

animal de laboratorio; 3) objetividad en la detección de los cambios conductuales realizada por observadores independientes en diferentes laboratorios; 4) reproducibilidad de los mecanismos neurobiológicos que acompañan al padecimiento humano; 5) reversibilidad de las alteraciones conductuales inducidas mediante el tratamiento clínico correspondiente al padecimiento en estudio y, 6) disponibilidad de referencias controles sobre las especies en estudio (Yamada y Takahashi, 1991). Con ello, se han propuesto varios tipos de modelos animales para estudiar algunos trastornos psiquiátricos que cuentan con la propiedad de validez, término que expresa el grado de precisión con el cual la prueba mide las variables evaluadas.

Tabla 1. Modelos utilizados en ratas/ratones, sensibles a los efectos de los agentes antidepresivos<sup>a</sup>

Modelo animal	Facilidad de uso	Confiabilidad	Especificidad	Comentarios
Prueba de nado forzado	Elevada	Elevada	Elevada <sup>b</sup>	Sensible a tratamiento antidepresivo agudo, no es confiable para detectar ISRSs.
Prueba de nado forzado modificada	Elevada	Elevada	Elevada <sup>b</sup>	Sensible a tratamiento antidepresivo agudo, distingue a los antidepresivos de diferentes clases, incluyendo ISRSs.
Prueba de suspensión del rabo	Elevada	Elevada	Elevada <sup>b</sup>	Sensible a tratamiento antidepresivo agudo; ciertas cepas escalan su rabo.
Bulbectomía olfatoria	Mediana	Elevada	Elevada	Los efectos conductuales sólo son evidentes después del tratamiento crónico; el mecanismo de acción está pobremente estudiado.
Desesperanza aprendida	Mediana	Mediana	Elevada	Sensible a tratamientos antidepresivos de corta duración, existen restricciones éticas en algunos países.
DRL-72	Mediana	Mediana	Mediana	Sensible a tratamientos antidepresivos de corta duración.
Clonimipramina neonatal	Mediana	Mediana	¿?	Sólo se han probado pruebas limitadas de antidepresivos.
Estrés prenatal	Mediana	¿?	¿?	Sólo se han probado pruebas limitadas de antidepresivos.
Estrés crónico ligero	Baja	Baja	Elevada	La confiabilidad ha sido repetidamente cuestionada, los efectos conductuales sólo son evidentes después del tratamiento crónico.
Intruso-residente	Baja	¿?	Mediana	Los efectos conductuales sólo son evidentes después del tratamiento crónico, requiere mas validación en otros laboratorios.
Cambios inducidos por el retiro de fármacos en AEI	Baja	Elevada	Mediana	Requiere más validación; no se pueden asumir diferencias entre cepas fácilmente.

<sup>a</sup>Abreviaturas: DRL-72, *differential reinforcement of low-rate 72 second schedule*; AEI, autoestimulación intracraneal; ISRS, inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina.  
<sup>b</sup>Los estimulantes pueden ser evaluados con estudios complementarios de actividad locomotriz.  
<sup>c</sup>La clonimipramina es un inhibidor no selectivo de la recaptura de serotonina.

Los modelos animales de depresión fueron desarrollados originalmente basados en las consecuencias conductuales del estrés (desesperanza aprendida, suspensión del rabo, estrés ligero crónico, nado forzado), de algunos fármacos (reserpina, apomorfina, clonidina) y de lesiones (bulbectomía olfatoria) (Willner y Muscat, 1991; Porsolt *et al.*, 1991) sin olvidar los modelos que emplean animales con alteraciones genéticas en la expresión de una proteína (*knockout*) ya sea un receptor, un transportador, una enzima o una proteína transdutora de señales, los cuales exhiben diferentes tipos de respuesta depresiva o antidepresiva (Cryan *et al.*, 2002).

#### 2.9.1.1 Modelo animal para evaluar locomoción: prueba de actividad locomotriz.

En investigación básica, las pruebas de locomoción espontánea se han utilizado para medir los niveles de actividad en los animales. La prueba en campo abierto es útil en diversos estudios cuya finalidad es evaluar la respuesta conductual ante manipulaciones tan diversas como la estimulación de la nocicepción (para evaluar actividad espontánea después de la prueba de formalina, ahora éticamente impracticable), la respuesta ante el estrés (para evaluar emocionalidad, defecación, exploración) y la contribución de las hormonas gonadales en el dimorfismo sexual de la locomoción (Slob *et al.*, 1986; Paré, 1994; Aloisi *et al.*, 2003), entre otros. La mayoría de los experimentos que emplean la prueba de nado forzado para medir la desesperanza conductual y explorar efectos antidepresivos de los fármacos, se complementan con la prueba de actividad locomotriz espontánea (Contreras *et al.*, 2001; Hirani *et al.*, 2002; Skuza y Rogóż, 2003; Stoffel y Craft, 2004; Chaki *et al.*, 2004; Kuteeva *et al.*, 2005). La prueba en campo abierto valora exploración y locomoción y ocasionalmente se usa la prueba del "rotarod" para complementarla con la evaluación de la coordinación motriz. La secuencia experimental de realizar prueba de locomoción en campo abierto antes de nado forzado tiene la finalidad de determinar si los cambios en la inmovilidad observada en el nado se deben a algún efecto en la actividad motriz. Así, se pueden citar algunos ejemplos, al evaluar el efecto del antagonista al factor liberador de corticotropinas (R278995/CRA0450) o a melanocortina, los cuales demostraron ser antidepresivos y ansiolíticos, y no se observaron cambios en la actividad locomotriz (Chaki *et al.*, 2003; 2004), como tampoco en el caso del modelo

experimental de depresión postparto ante el retiro de las hormonas ováricas (Stoffel y Craft, 2004) o en ratones transgénicos que sobre-expresan el neuropéptido galanina los cuales son susceptibles al estrés y a la desesperanza conductual (Kuteeva *et al.*, 2005).

#### 2.9.1.2 Modelo animal para evaluar motivación: prueba de nado forzado.

El amplio espectro de alteraciones que caracteriza a la depresión dificulta el modelaje del trastorno en el laboratorio. De hecho, los pensamientos recurrentes de muerte o suicidio, o la culpa excesiva, son hasta hoy imposibles de modelar en animales de laboratorio; sin embargo, otra de las características de la depresión como la disminución de la motivación, ha sido reproducida en el modelo de desesperanza aprendida, de estrés prenatal, de estrés crónico ligero y la prueba de nado forzado.

El nado forzado, propuesto por Porsolt *et al.* (1977), es un modelo útil para estudiar el curso de la desesperanza conductual inducida por el nado sin escapatoria. La prueba implica la medición de la conducta de inmovilidad que adopta la rata o el ratón después de nadar vigorosamente en un espacio restringido. Se asume que dicha inmovilidad refleja un estado de desesperanza, es decir, una falla de la persistencia en la conducta dirigida al escape. La inmovilidad aumenta en respuesta a un estresor incontrolable o cuando los animales son sujetos a modelos de depresión endógena (Yates *et al.*, 1991; Velázquez-Moctezuma y Díaz-Ruiz, 1992; Marván *et al.*, 1997). La prueba de nado forzado también permite predecir la acción antidepresiva de diversas sustancias ya que los tratamientos antidepresivos como los tricíclicos, los atípicos, los inhibidores de la recaptura de serotonina y el electrochoque disminuyen la inmovilidad de los animales forzados a nadar (Danysz, 1988; Lucki y Wieland, 1990; Meerch-Mougeot *et al.*, 1993; López *et al.*, 1994, Rodríguez-Landa y Contreras, 2000). Por lo tanto, la disminución de la inmovilidad se interpreta como un incremento en la motivación para escapar (Borsini y Meli, 1988; Willner y Muscat, 1991; Contreras *et al.*, 2001) sin que ocurra un aumento en la actividad locomotriz del animal (Brand y Slob, 1988; Bitran *et al.*, 1993). Las ventajas de la prueba de nado forzado son su simplicidad, su rapidez y confiabilidad. Adicionalmente, el modelo de nado forzado resulta ser sensible al aumento fisiológico de progesterona y estradiol (Contreras *et al.*,

1998), así como a la administración exógena de estas hormonas en ratas hembras (Rachman *et al.*, 1998; Martínez-Mota *et al.*, 1999; Estrada-Camarena *et al.*, 2003). En ambos casos disminuye la inmovilidad, un efecto semejante al producido por los antidepresivos. Por tanto, la utilidad de esta prueba se amplía para estudiar la fisiopatología de la depresión y posibles participaciones neuroendócrinas.

El dimorfismo sexual en conductas no reproductivas (atribuido a la acción de las hormonas) ha sido observado en modelos animales de depresión. Por ejemplo, en la prueba de nado forzado los machos Wistar despliegan mayor tiempo de inmovilidad que las hembras, lo que se interpreta como menor motivación de los machos con respecto a las hembras por buscar salida al problema sin solución que representa la prueba (Alonso *et al.*, 1991; Contreras *et al.*, 1995). Por otro lado, en un estudio realizado con ratones adultos, se reportó que la testosterona ejerció efectos parecidos al antidepresivo desmetilimipramina al disminuir la inmovilidad en la prueba de nado forzado, en tanto que la orquidectomía produce el efecto contrario (Bernardi *et al.*, 1989). Sin embargo, si la orquidectomía se practica en etapa puberal, disminuye la inmovilidad evaluada en la etapa adulta, mientras que la restitución con testosterona sólo revierte el efecto de la orquidectomía. Estos últimos hallazgos sugieren efectos activacionales de la testosterona en respuestas específicas al estrés para dar origen al dimorfismo sexual en la ejecución de la prueba de nado forzado (Bernal-Morales, observaciones no publicadas). Recientemente, se reportó el efecto de la testosterona por sí sola, en su ausencia (orquidectomía) y sobre las acciones de algunos antidepresivos en la prueba de nado forzado. Se observó que la orquidectomía bloquea el efecto antidepresivo de la desmetilimipramina, la clorimipramina y la fluoxetina y que la administración de testosterona restaura el efecto antidepresivo solamente de desmetilimipramina (Martínez-Mota y Fernández-Guasti, 2004). Sin embargo, aún son pocos y no concluyentes los estudios que se han reportado acerca de la testosterona y la neurobiología de la depresión.

#### 2.9.2 Núcleo septal lateral, hormonas y depresión experimental.

La manipulación de estructuras cerebrales del sistema límbico también permite evaluar su participación en la respuesta hormonal y antidepresiva. Entre las estructuras cerebrales que están involucradas en la emoción y la motivación, se encuentran el área

preóptica medial, el hipotálamo lateral, el área tegmental ventral, el núcleo accumbens, la corteza prefrontal y temporal, el cíngulo, el caudado-putamen, la amígdala, el hipocampo y el área septal. Los núcleos septales se dividen en áreas medial, lateral y posterior de acuerdo a sus características citoarquitectónicas, siendo la región lateral la más grande que, a su vez, se divide porciones dorsal, intermedia y ventral. El área septal también está implicada en procesos relacionados con funciones cognoscitivas, en la emoción, así como en la regulación de funciones autonómicas y estados afectivos (Jakab y Leranth, 1995; Sheehan *et al.*, 2004). Los núcleos septales laterales son susceptibles al fenómeno de la autoestimulación intracraneal (Olds y Milner, 1954) y también se les considera una estructura reguladora de las respuestas al estrés y al placer, ya que su actividad neuronal disminuye cuando el animal es sometido a situaciones aversivas como el nado forzado (Contreras *et al.*, 2004), pero aumenta cuando el estímulo aversivo condicionante es retirado (Yadin *et al.*, 1993; Yadin y Thomas, 1981).

La neuroquímica del septum comprende una gran variedad de sustancias que coexisten en las distintas áreas de estos núcleos. Recibe entre otras, fibras aferentes del principal reservorio de serotonina, el núcleo dorsal del rafe. Adicionalmente, los núcleos septales laterales contienen neuronas que concentran hormonas esteroidales, receptores y la enzima aromatasa encargada de convertir a la testosterona en estradiol (Pfaff, 1968; Jakab *et al.*, 1994; Wood y Newman, 1999). La localización de receptores a andrógenos en áreas extrahipotálamicas como el septum lateral, entre otras (McGinnis *et al.*, 2002; Kritzer, 2004; Sheng *et al.*, 2004; Tabori *et al.*, 2005), sugiere que la acción de los andrógenos no se limita a la actividad reproductiva, sino que también interviene en la motivación y emocionalidad. Por ejemplo, el efecto ansiolítico de testosterona está mediado por el receptor a andrógenos ya que la administración de flutamida, una antagonista del receptor a andrógenos, bloquea la reducción del tiempo de enterramiento defensivo (Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2005).

A partir de algunos estudios realizados por nuestro grupo, hemos propuesto que los núcleos septales laterales son sitios de acción antidepresiva ya que la tasa de disparo neuronal incrementa después de la aplicación de terapias antidepresivas tanto farmacológicas como no farmacológicas (Contreras *et al.*, 1989; 1990; 1993a; 1993b).

Además, su actividad neuronal varía de acuerdo al ciclo estral de la rata, ocurre la mayor tasa de disparo en la fase reproductiva con concentraciones elevadas de progesterona y estradiol (Contreras *et al.*, 2000). Específicamente, la administración intraseptal de progesterona disminuye la inmovilidad en la prueba de nado forzado, sugiriendo una acción similar a la de las terapias antidepresivas en esta prueba (Estrada-Camarena *et al.*, 2002). Adicionalmente, hemos encontrado que el metabolito de la progesterona, la alopregnanolona, administrada intraseptalmente ejerce un efecto anti-inmovilidad, por lo que estos hallazgos, en conjunto, corroboran la participación de los núcleos septales laterales como sitio de acción hormonal que modulan aspectos no reproductivos de la conducta.

Finalmente, la testosterona como esteroide neuroactivo puede actuar a través de los múltiples mecanismos de acción conocidos para los neuroesteroides y abarcar efectos genómicos y no genómicos. La ubicación de los receptores a andrógenos en estructuras del sistema límbico sugiere la modulación de conductas no reproductivas por parte de la hormona. Por ello, en este proyecto se abordó el estudio de los efectos de testosterona y fluoxetina sobre la desesperanza en el nado forzado, en diferentes condiciones. En una primera aproximación experimental se determinó el efecto que la testosterona y la fluoxetina producen al ser administradas sistémicamente por separado de manera crónica o aguda para conocer la acción farmacológica una vez que atraviezan la barrera hematoencefálica. Adicionalmente, se estudió la interacción de fluoxetina con la testosterona en el nado forzado pues se ha reportado el aparente antagonismo entre el sistema de neurotransmisión serotoninérgico y la testosterona.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tanto en investigación clínica como básica, la información del efecto de la testosterona sobre el estado de ánimo es escasa y contrasta con el número de publicaciones sobre el efecto tipo antidepresivo del estradiol, de la progesterona y de los neuroesteroides. Los receptores a estas hormonas se localizan, además de áreas relacionadas con la reproducción, en neuronas del núcleo septal lateral, junto con las enzimas que intervienen en su metabolismo; por ello, se ha considerado a este núcleo como un sitio blanco de la acción hormonal. Se ha demostrado que se trata de un sitio de acción antidepresiva, ya que la administración sistémica de una dosis de fluoxetina que disminuye la inmovilidad en el nado forzado (1 mg/kg), incrementa a su vez la frecuencia de disparo neuronal (Contreras *et al.*, 2001). Asimismo, la administración intraseptal de progesterona y estradiol también produce efectos tipo antidepresivo en el nado forzado (Estrada-Camarena *et al.*, 2002); sin embargo, no se ha explorado suficientemente el efecto de la administración sistémica o intraseptal de testosterona sobre conductas no reproductivas que implican motivación y afrontamiento al estrés. El dimorfismo sexual en la prevalencia de la depresión y la mayor respuesta al tratamiento antidepresivo por parte del sexo femenino comparado con el masculino, sugiere un papel activo de la testosterona en la modulación del estado de ánimo y en la respuesta a inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Por tal motivo, el presente trabajo exploró el efecto de la testosterona administrada por vía sistémica, o localmente en el núcleo septal lateral, en presencia o ausencia del antidepresivo fluoxetina sobre un modelo experimental de depresión en rata para así poder determinar la posible interacción de ambas sustancias.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Explorar en la rata las acciones de la testosterona y su posible interacción con la fluoxetina en un modelo animal útil para determinar propiedades farmacológicas antidepresivas (nado forzado), así como la participación del núcleo septal lateral en dichos efectos.

### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 4.1.1 Determinar el efecto de la administración sistémica, aguda o crónica, de testosterona sobre la inmovilidad en la prueba de nado forzado.
- 4.1.2 Determinar la interacción farmacológica de la testosterona con la fluoxetina tras la administración de ambas sustancias por vía sistémica.
- 4.1.3 Determinar la participación del núcleo septal lateral en las acciones de la testosterona y su interacción con la fluoxetina.

## **5. HIPÓTESIS**

- La testosterona modifica la inmovilidad de la rata en la prueba de nado forzado.
- La testosterona modifica el efecto antidepresivo de fluoxetina.
- El núcleo septal lateral es un sitio blanco de la acción de la testosterona y de la fluoxetina.

## 6. METODO GENERAL

Los experimentos se diseñaron para explorar, en la prueba de nado forzado, el efecto de la administración sistémica única o simultánea de testosterona y fluoxetina, así como el efecto del tratamiento crónico sistémico con la administración aguda intraseptal de la hormona y el antidepresivo.

### 6.1 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Para el experimento de desafío, en el que la testosterona requirió ser microinyectada en el núcleo septal lateral, se utilizó testosterona base (donación de la compañía Schering) disuelta en una solución de  $\gamma$ -ciclodextrina (Sigma) al 2% (vehículo de testosterona). Para la administración de testosterona por vía sistémica (subcutánea, sc), la hormona se disolvió en aceite de maíz.

La fluoxetina adquirida comercialmente (Prozac®) fue administrada por vía sistémica (vía oral, vo) en forma de una suspensión acuosa. Para su administración intraseptal, la fluoxetina (clorhidrato de fluoxetina, Sigma) y se disolvió en una solución salina isotónica (NaCl al 0.9%) estéril (vehículo de fluoxetina).

### 6.2 SUJETOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas macho Wistar adultas de 250-400 g, que se mantuvieron en cajas translúcidas de 44 x 33 x 20 cm, en un bioterio de estancia con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h (luz encendida a las 7:00 AM) y temperatura ambiente de 24°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). El acceso al agua y alimento fue *ad libitum*. Los experimentos se realizaron entre 10:00 y 14:00 h.

### 6.3 ORQUIDECTOMÍA

La orquidectomía se realizó por aproximación ventral y bajo anestesia con éter etílico. La recuperación post-operatoria de los animales se verificó diariamente y dos semanas después de la operación se procedió a administrar intraseptalmente las sustancias de estudio o bien a iniciar el tratamiento crónico sistémico para los estudios de interacción. El criterio de esperar dos semanas después de la orquidectomía para realizar los experimentos se basó en que el nivel plasmático de testosterona se reduce

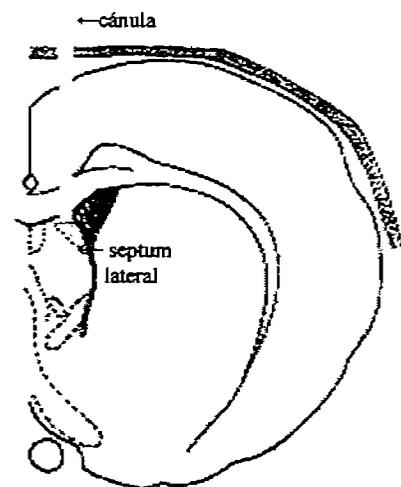
un mínimo después de este tiempo, impidiendo a los animales desplegar conductas reguladas por el andrógeno, como la conducta sexual (Beach y Holz-Tucker, 1949).

#### 6.4 IMPLANTE INTRASEPTAL

Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico y, mediante cirugía estereotáxica, se colocó una cánula guía de acero inoxidable de 22 Ga de calibre y 10 mm de longitud (elaborada con una aguja hipodérmica de 0.70 mm de diámetro) que se hizo descender 3.5 mm por debajo de la corteza cerebral para llegar al núcleo septal lateral (AP=0.2 mm, L=0.5 mm), de acuerdo a las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). La cánula guía se fijó al cráneo con acrílico dental y la administración del fármaco se realizó a través de una cánula inyectora, cuatro días después del implante.

#### 6.5 MICROINYECCIÓN INTRASEPTAL

Para ello, se utilizó una cánula inyectora de 30 Ga de calibre (elaborada con una aguja hipodérmica, 0.3 mm diámetro) conectada a una jeringa Hamilton a través de un tubo flexible de polietileno de 0.5 mm de diámetro. Para realizar la inyección, la cánula inyectora se introdujo a la cánula guía implantada en la rata, sobresaliendo 1 mm fuera de la cánula guía. La testosterona, fluoxetina y sus vehículos se inyectaron en un volumen de 1  $\mu$ l en la región lateral del núcleo septal a una velocidad de 0.1  $\mu$ l/min) por medio de una bomba programable de infusión (KdScientific). El procedimiento de microinyección se realizó de acuerdo con las observaciones para realizar microinyección cerebral (Peterson, 1998).



#### 6.6 VERIFICACIÓN DEL IMPLANTE INTRASEPTAL

Para verificar la ubicación del implante, al término de cada experimento en el que se utilizó la microinyección intraseptal, los animales fueron sobrealterados con pentobarbital sódico y perfundidos por vía intracardíaca con una solución salina al 0.9% y formol al 20%. Posteriormente, se inyectó 1  $\mu$ l del colorante azul de metileno

(0.1µm/min) para marcar el sitio de la inyección al final de ella. Se retiraron las cánulas guía y los cerebros fueron extraídos y mantenidos en formol al 20% hasta el momento del análisis histológico. Para él, se realizaron cortes transversales de 600µ de grosor que permitieron visualizar la trayectoria de la cánula guía y la marca del colorante a simple vista. Se ubicó el plano cerebral correspondiente de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982) y en el análisis estadístico sólo fueron incluidas aquellas ratas con un implante correcto en el septum lateral.

## 6.7 PRUEBAS CONDUCTUALES

Las ratas se sometieron a las pruebas conductuales de acuerdo al diseño experimental escogido. El procedimiento general de las pruebas conductuales se describe a continuación.

### 6.7.1 Prepruebas conductuales.

Veinticuatro horas antes de la primera sesión del registro de la actividad locomotriz y del nado forzado, se realizaron sesiones de preprueba de actividad locomotriz (5 min) y nado forzado (15 min). El objetivo de la preprueba fue familiarizar a las ratas con la caja de actividad locomotriz y desarrollar desesperanza en el caso del nado forzado (Porsolt et al., 1977).

### 6.7.2 Actividad locomotriz.

La prueba de actividad locomotriz se realizó colocando a la rata en una caja de acrílico (44 x 33 cm de base x 20 cm de altura) con el piso dividido en 12 cuadros (11 x 11 cm). Durante esta prueba, se evaluó el número de cuadros que cruzó el animal durante un tiempo de 5 minutos. Esta prueba se utilizó para descartar algún componente de hipoactividad o hiperactividad generalizada en el animal que pudiera influir en el nado forzado.

### 6.7.3 Nado forzado.

La prueba de nado forzado se realizó inmediatamente después de la prueba de actividad locomotriz y consistió en colocar al animal en un estanque rectangular (50 x

44 cm de base x 60 cm de altura) conteniendo agua a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  a una altura de 21-23 cm aproximadamente. Durante la prueba se midió la inmovilidad (desesperanza conductual). La inmovilidad se define como la postura que adopta la rata cuando flota y/o despliega movimientos mínimos que no le permiten desplazarse, y cuando toca con alguna(s) de sus extremidades posteriores el piso del estanque manteniendo la narina por arriba de la superficie del agua. Las variables de inmovilidad evaluadas durante los 5 min que duró la prueba fueron: la latencia a la primera inmovilidad y la duración total de la inmovilidad. La latencia a la primera inmovilidad es el tiempo transcurrido desde que la rata es introducida al estanque hasta que despliega el primer periodo de inmovilidad y se interpreta como la magnitud del primer esfuerzo que el animal realiza para resolver la situación de apremio que el nado representa. La duración de la inmovilidad es la suma de los tiempos que ocupan las inmovilidades durante toda la prueba. La duración de la inmovilidad se interpreta como un indicador de la intensidad de la desesperanza de las ratas sometidas al nado forzado.

## 6.8 CUANTIFICACIÓN DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA

Con la finalidad de conocer las concentraciones plasmáticas de testosterona que se alcanzaron en las ratas que recibieron el tratamiento crónico sistémico de testosterona, fluoxetina o ambos, se cuantificó el nivel plasmático de la hormona. Para ello, se formó un grupo control (n=6) de ratas intactas y un grupo de ratas orquidectomizadas (n=6) que recibieron vehículo por vía oral y subcutánea (0.2ml/día). Un tercer grupo estuvo formado por ratas orquidectomizadas que recibieron vehículo oral más testosterona (1mg/rata/s.c./día, n=6). Otro grupo se formó con ratas orquidectomizadas que recibieron fluoxetina oral (1mg/kg/día) más vehículo s.c. (n=5) y un quinto grupo que recibió testosterona (1mg/rata/s.c./día) más fluoxetina (1mg/kg/v.o./día, n=5). Los tratamientos se administraron durante 21 días. Una hora después de la administración de las sustancias en el último día de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con éter etílico y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca. La sangre se centrifugó por 10 min a 3500 rpm para separar los sueros y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Para realizar las determinaciones de

las concentraciones de testosterona, se concentraron las muestras tomadas de animales de cada grupo y se cuantificaron por triplicado.

La determinación cuantitativa de testosterona plasmática se realizó por medio de inmunoabsorción (EIA, Biokwitech® México) utilizando un inmunoensayo enzimático de competencia con peroxidasa. En él, la testosterona presente en el suero y un conjugado de enzima-testosterona del kit de reactivos, compiten por los sitios de unión de un anticuerpo de testosterona inmovilizado en la superficie del micropozo de prueba. La cantidad del conjugado que se fija en la superficie del micropozo decrece en proporción de la concentración de testosterona presente en el suero. Un sustrato reactivo revelador del color, indica, de acuerdo a su intensidad, la cantidad del conjugado de enzima y testosterona es inversamente proporcional a la cantidad de testosterona presente en el suero.

El procedimiento consistió en agregar a 10µl del concentrado de sueros por grupo, 100µl de conjugado testosterona-peroxidasa y 50µ de anticuerpo de conejo anti-testosterona. Se mezcló durante 30 seg e incubó a 37°C por 90 min. Los pozos se lavaron 5 veces con agua destilada o desionizada. Se agregó el reactivo de color, se mezcló e incubó 20 min. La reacción se paró agregando 50µl de solución de Paro. Se agitó suavemente por 30 min y las absorbancias se leyeron en un microlector a 450 nm. Las concentraciones de las muestras se determinaron por medio de una curva estándar.

## 6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de las pruebas conductuales fueron normalizados con la finalidad de disminuir la heterogeneidad de los resultados. Para ello, se tomó como referencia de 100% al valor del grupo control y se calcularon los porcentajes correspondientes en el resto de los grupos. Una vez normalizados los datos, se sometieron al análisis de varianza que se indica en cada diseño experimental y se practicaron pruebas *post hoc* cuando las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar de los porcentajes de cada variable, considerando siempre a los valores del control como 100%.

Los resultados se analizaron con pruebas estadísticas paramétricas debido a que son pruebas más potentes que las no paramétricas. Con ello se asegura una mayor sensibilidad para detectar un efecto real de la variable independiente. Estadísticamente, la potencia de las pruebas paramétricas es la probabilidad de que los resultados de un experimento permitan rechazar la hipótesis nula cuando es falsa (Zolman, 1993), es decir, cuando la variable independiente tiene un efecto real y, por tanto, el análisis de los resultados es más riguroso y evita el sesgo de detectar cambios debidos al azar.

## 7. SERIES EXPERIMENTALES

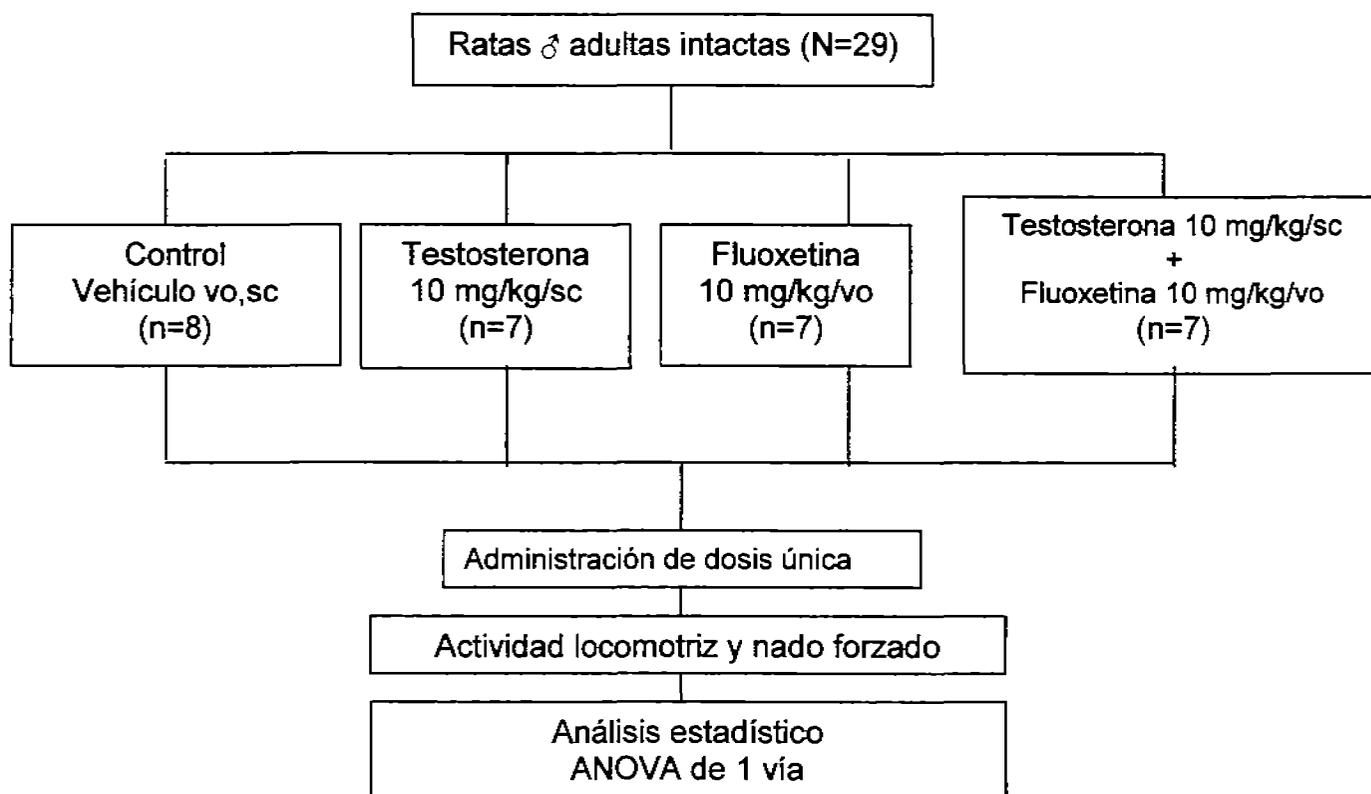
### 7.1 TRATAMIENTO AGUDO

#### 7.1.1 Administración aguda sistémica de testosterona, fluoxetina y testosterona+fluoxetina.

##### *Objetivo particular*

Explorar el efecto de la administración de testosterona y fluoxetina sobre la actividad locomotriz y la inmovilidad en la prueba de nado forzado.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL



### Grupos y procedimiento experimental

Se formaron 4 grupos de ratas para tratamiento agudo: el grupo control recibió vehículo de fluoxetina vía oral (vo) más vehículo de testosterona vía subcutánea (sc) simultáneamente; el grupo fluoxetina recibió la dosis de 10 mg/kg/vo; el grupo testosterona recibió la dosis de 10 mg/kg/sc y un cuarto grupo que recibió fluoxetina (10 mg/kg/vo) más testosterona (10 mg/kg/sc). Una hora después de estas administraciones agudas las ratas se sometieron a las pruebas de actividad locomotriz y nado forzado.

Los resultados se sometieron al ANOVA de 1 vía para grupos independientes y Dunnett como *post hoc*.

### Resultados. Tratamiento agudo.

**Actividad locomotriz.** Mientras que la testosterona careció de efecto, la administración aguda sistémica de 10 mg/kg de fluoxetina produjo menor número de cuadros cruzados por las ratas al ser comparado con el grupo control [ $F_{3, 25} = 4.10$ ,  $p < 0.01$ ]. En el grupo de la combinación de testosterona+fluoxetina la disminución de los cuadros no alcanzó la significancia estadística (ver la figura 2).

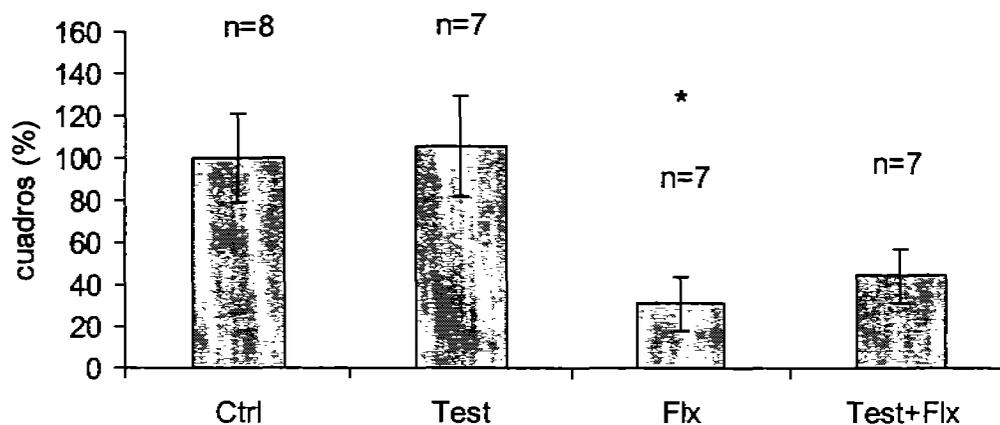
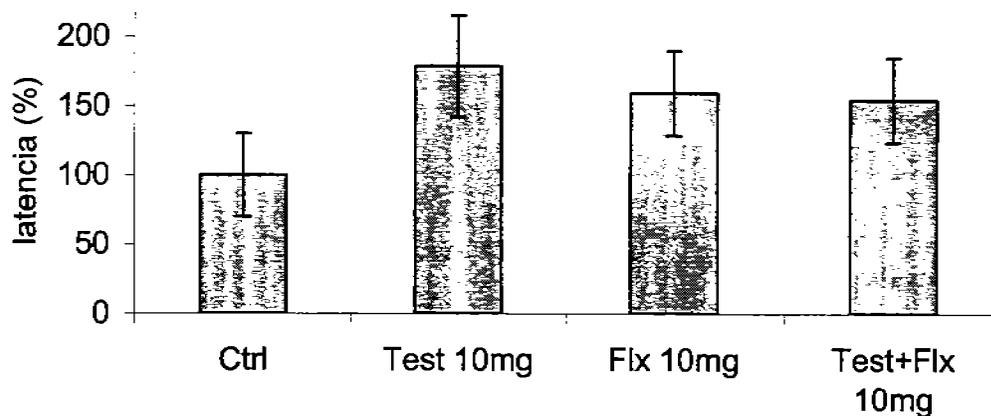


Figura 2. Actividad locomotriz (número de cuadros cruzados) de ratas que recibieron administración aguda de testosterona (Test, 10 mg/kg), fluoxetina (Flx, 10 mg/kg) o ambos (Test+Flx, 10 mg/kg). La fluoxetina produjo menor locomoción en los animales (\*Dunnett,  $p < 0.05$ ).

*Nado forzado.* La administración aguda sistémica de testosterona y/o fluoxetina (10 mg/kg) no tuvo efecto sobre el nado forzado (latencia:  $F_{3, 25}=1.17$ ,  $p=0.33$ : NS;; duración:  $F_{3, 25}=2.48$ ,  $p=0.08$ : NS; ver la figura 3).

a)



b)

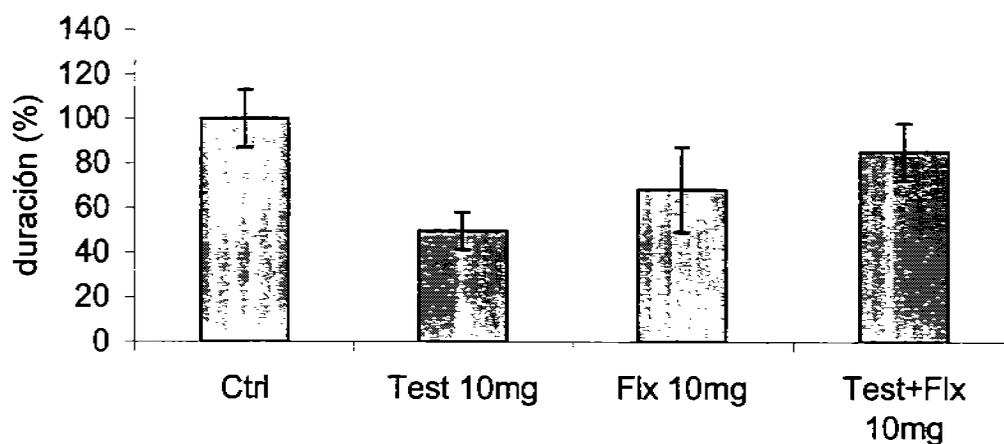


Figura 3. Latencia a la inmovilidad (a) y duración total de la inmovilidad (b) evaluados en la prueba de nado forzado de ratas macho intactas que recibieron tratamiento agudo de testosterona (10mg/kg), fluoxetina (10mg/kg) o ambas. No se observaron diferencias significativas.

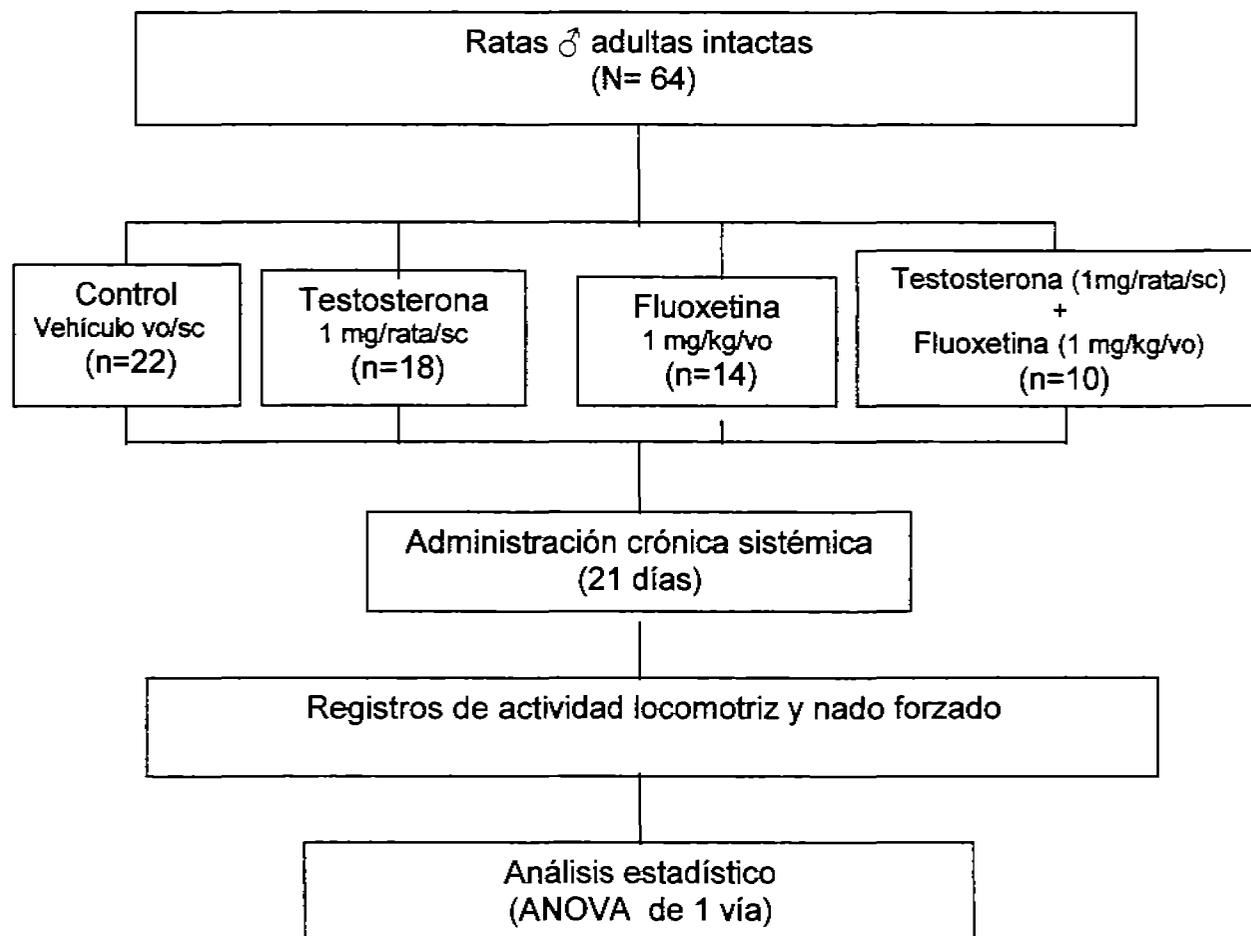
## 7.2 TRATAMIENTO CRÓNICO

7.2.1 Administración crónica sistémica de testosterona, fluoxetina y testosterona+fluoxetina.

### *Objetivo particular*

Explorar el efecto de la administración conjunta y crónica de testosterona con fluoxetina sobre la actividad locomotriz y la inmovilidad en la prueba de nado forzado.

### DISEÑO EXPERIMENTAL



### Grupos y procedimiento experimental.

Un grupo de 64 ratas macho adultas se dividió en 4 grupos: el grupo control (ctrl, n=22), el grupo de testosterona crónica (test-21, n=18), el grupo fluoxetina crónica (flx-21, n=14) y el grupo fluoxetina con testosterona crónica (flx-tes-21, n=10). El grupo Ctrl recibió vehículo de fluoxetina (0.2ml/vo/rata) y vehículo de testosterona (0.2ml/sc/rata). El grupo testosterona recibió la administración de la hormona (1mg/rata/sc/día/21 días). El grupo fluoxetina recibió fluoxetina (1mg/kg/vo/día/21 días). El grupo fluoxetina+testosterona recibió la co-administración crónica sistémica de fluoxetina+testosterona durante 21 días. Una hora después de la última administración, los animales se sometieron a la prueba de actividad locomotriz y nado forzado.

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un ANOVA de 1 vía para grupos independientes y la prueba de Dunnett fue utilizada como *post hoc*.

### Resultados. Tratamiento crónico.

**Actividad locomotriz.** La administración de la décima parte de la dosis del tratamiento agudo sistémico de fluoxetina (1 mg/kg) o testosterona (1 mg/rata) crónica durante 21 días por sí sola no modificó el número de cuadros cruzados. En cambio, la administración conjunta de fluoxetina y testosterona durante 21 días disminuyó la locomoción ( $F_{3, 60} = 7.25, p < 0.0003$ ) en comparación con el grupo control (ver la figura 4).

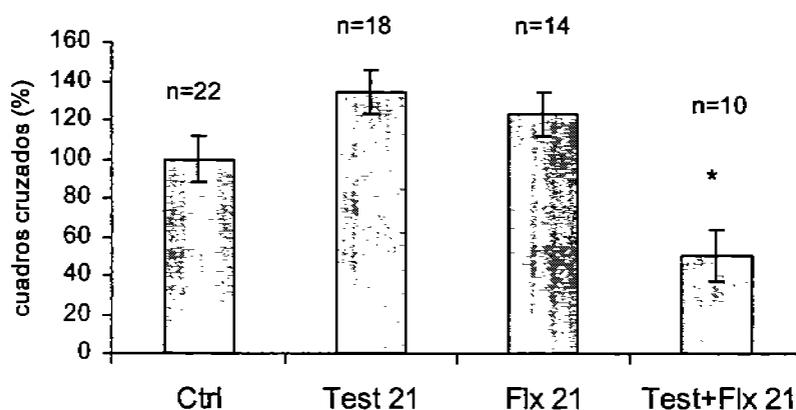


Figura 4. Actividad locomotriz (número de cuadros cruzados) en campo abierto de ratas recibieron tratamiento sistémico crónico (21 días) de testosterona (Test 21) o de fluoxetina (Flx 21) o ambos (Flx+Test 21). La co-administración crónica de testosterona+fluoxetina disminuyó el número de cuadros cruzados en comparación con el grupo control (\*Dunnett,  $p < 0.0003$ ).

*Nado forzado.* El ANOVA de 1 vía muestra que la administración de testosterona, fluoxetina, o ambas, durante 21 días modificó significativamente la latencia a la primera inmovilidad [ $F_{3, 60} = 2.93, p < 0.04$ ]; sin embargo, la diferencia en la latencia no se observa en la comparación contra el grupo control con la prueba *post hoc* de Dunnett, sino al compararse la administración crónica de testosterona contra la administración conjunta crónica de fluoxetina+testosterona según la prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls, ver la figura 5.

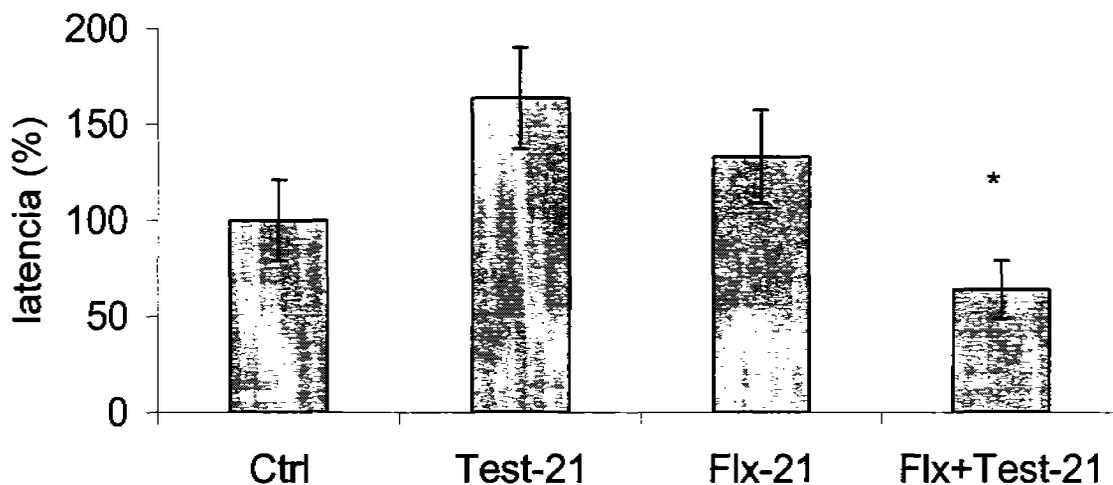


Figura 5. Latencia a la primera inmovilidad con tratamiento crónico de testosterona y/o fluoxetina. \* $p < 0.05$ , Student-Newman-Keuls vs testosterona.

Al analizar la duración de la inmovilidad el ANOVA de 1 vía mostró diferencias significativas ( $F_{3, 60} = 5.09, p < 0.003$ ). La administración crónica de fluoxetina redujo significativamente la duración de la inmovilidad, pero los valores de la duración fueron semejantes al control cuando se administró simultáneamente testosterona y fluoxetina de manera crónica, es decir, se canceló el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina (ver la figura 6).

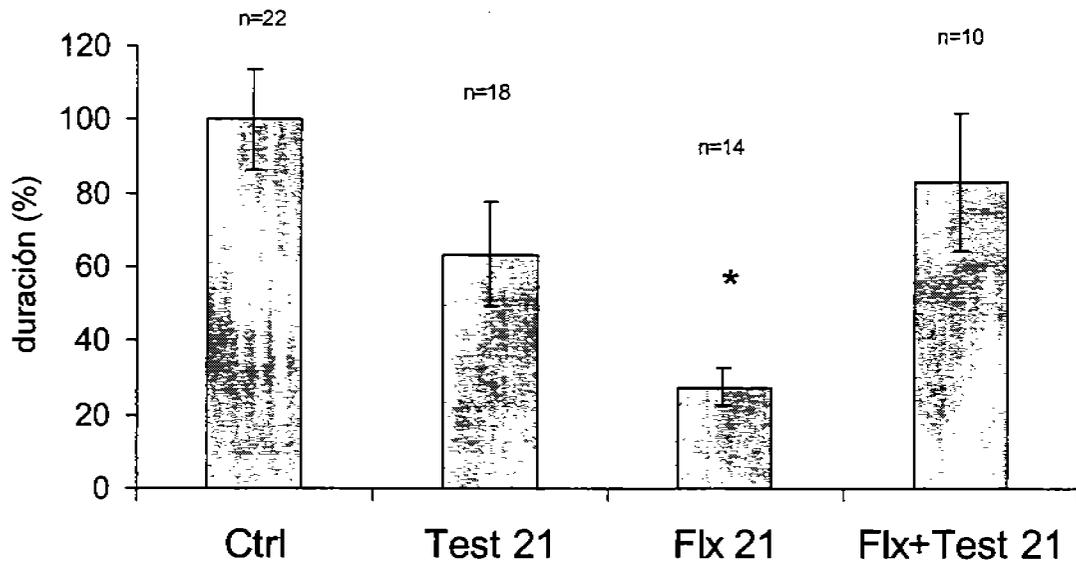


Figura 6. Duración de la inmovilidad en ratas forzadas a nadar que recibieron tratamiento crónico sistémico de testosterona (Test 21), de fluoxetina (Flx 21) o ambos (Flx+Test 21). La administración conjunta de fluoxetina+testosterona por 21 días revirtió el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina crónica. \* Dunnett,  $p < 0.05$ .

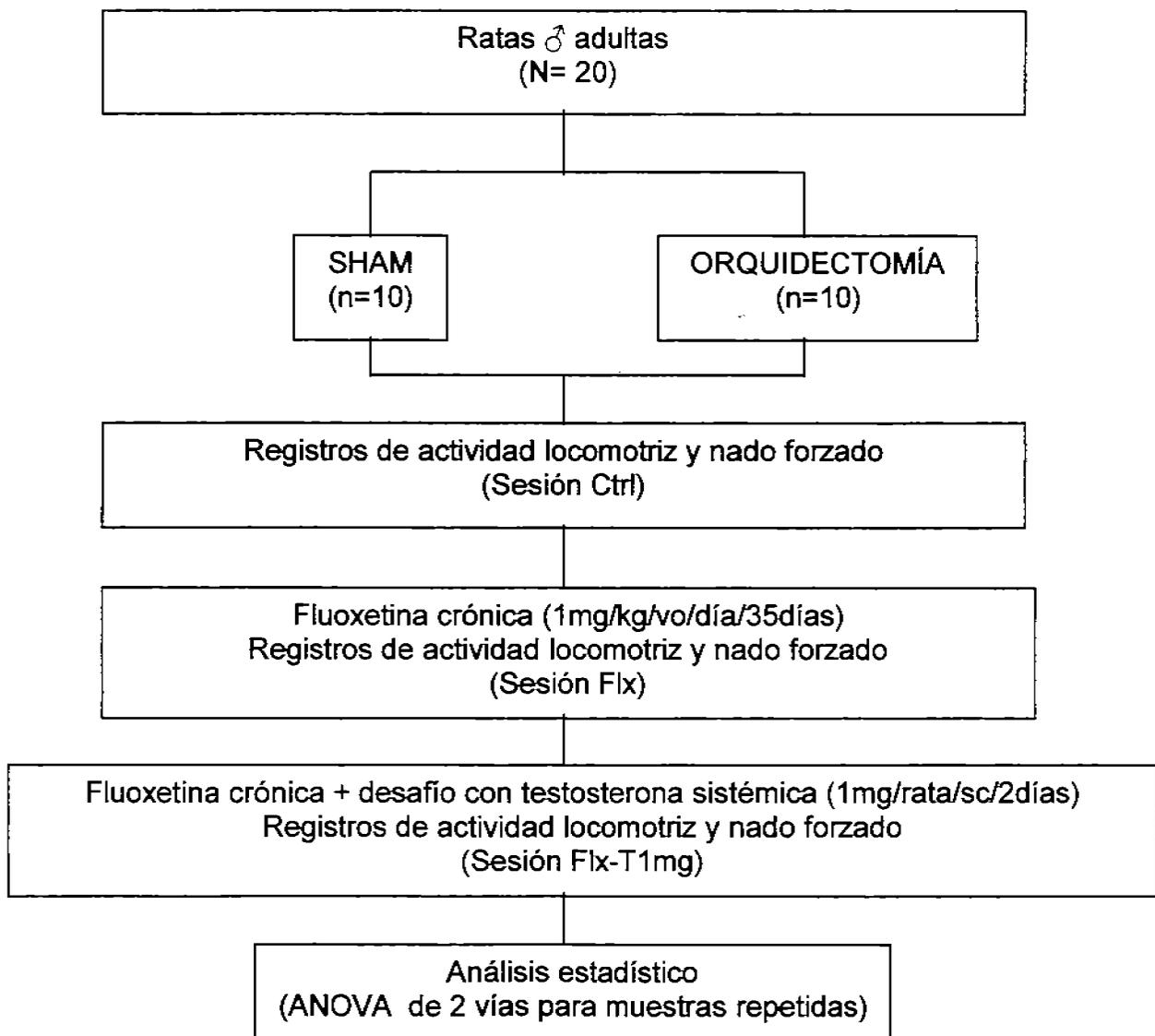
## 7.3 TRATAMIENTO CRÓNICO Y DESAFÍO FARMACOLÓGICO

### 7.3.1 Administración crónica sistémica de fluoxetina con desafío sistémico de testosterona.

#### *Objetivo particular*

Evaluar el efecto de la administración aguda sistémica de testosterona en animales intactos y orquidectomizados tratados crónicamente con fluoxetina (desafío sistémico de testosterona).

#### DISEÑO EXPERIMENTAL



### *Grupos y procedimiento experimental.*

Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar con peso promedio de 350 g. Las ratas se asignaron a dos grupos: un grupo sham orquidectomía (n=10) y un grupo orquidectomizado (n=10). Los grupos se sometieron a la prueba de actividad locomotriz y nado forzado el primer día del experimento (sesión Ctrl). Inmediatamente después, los dos grupos recibieron la administración sistémica oral de 1 mg/kg/día de fluoxetina durante 35 días. La duración de este tratamiento se debió a que con 21 días no se observó el efecto anti-inmovilidad en ambos grupos, por lo que el tratamiento se prolongó para asegurar el establecimiento del efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina. En el día 35 de la administración, los dos grupos se sometieron a la prueba de actividad locomotriz y nado forzado (sesión Flx). El día 36 se continuó con la administración de fluoxetina y se administró 1 mg de testosterona/rata por vía subcutánea simultáneamente. Veinticuatro horas después se administró la fluoxetina y la testosterona nuevamente y los animales se sometieron a la prueba de actividad locomotriz y nado forzado una hora después de la administración (sesión Flx-T1mg).

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de una ANOVA de 2 vías para muestras repetidas, considerando la *orquidectomía* (factor 1, con dos niveles), el *tratamiento farmacológico* (factor 2, con tres niveles) y la interacción *orquidectomía x tratamiento farmacológico*. Se utilizó la prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls.

### *Resultados. Tratamiento crónico y desafío sistémico.*

*Actividad locomotriz.* En el tratamiento sistémico crónico de fluoxetina con el desafío sistémico de testosterona, el ANOVA de 2 vías para muestras repetidas demostró que no hay diferencias significativas en el número de cuadros cruzados asociadas con la orquidectomía, los tratamientos farmacológicos ni con la interacción de factores [Orquidectomía:  $F_{1,9} = 0.004$ ,  $p = 0.94$ , NS; Tratamiento farmacológico:  $F_{2,18} = 0.93$ ,  $p = 0.41$ , NS; Orquidectomía x Tratamiento farmacológico:  $F_{2,18} = 0.16$ ;  $p = 0.85$ , NS. Por tanto, los resultados de los grupos orquidectomía y sham se presentan juntos, ver la figura 7.

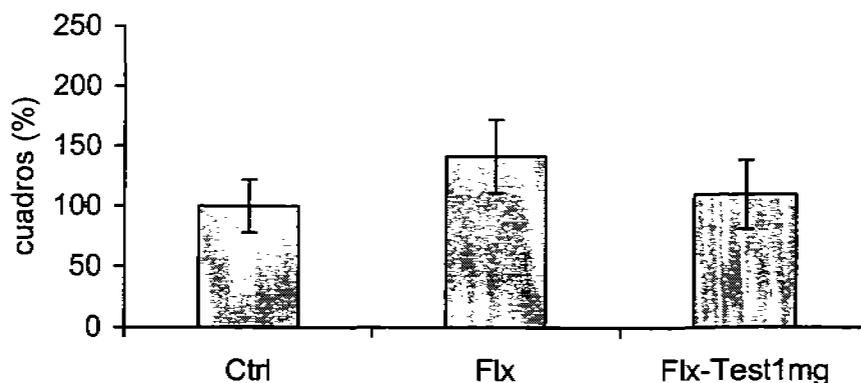


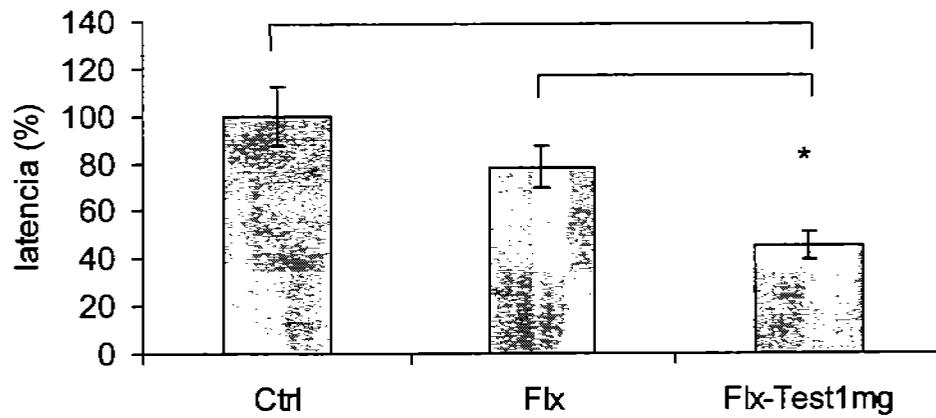
Figura 7. Actividad locomotriz (número de cuadros cruzados) en campo abierto de ratas (n=20) que recibieron el desafío de 1mg de testosterona de manera aguda (Flx+Test1mg) ante la administración crónica de fluoxetina (Flx). No hubo diferencias significativas. Las barras corresponden a los grupos sham y orquitectomizados juntos debido a que no hubo diferencias entre ellos.

*Nado forzado.* El ANOVA de dos vías para muestras repetidas mostró que no hay diferencias entre el grupo sham ( $83.0 \pm 8.2\%$ ) y orquitectomizado ( $66.0 \pm 9.0\%$ ) en la latencia a la primera inmovilidad ( $F_{1, 9} = 1.57$ ;  $p = 0.24$ : NS). Sin embargo, el análisis del factor tratamiento mostró que el desafío con testosterona al final del tratamiento crónico con fluoxetina disminuyó significativamente la latencia con respecto al control y al tratamiento con fluoxetina ( $F_{2, 18} = 13.77$ ;  $p < 0.0002$ ). La interacción de los factores cirugía con tratamiento farmacológico no fue significativa ( $F_{2, 18} = 0.71$ ;  $p = 0.50$ : NS), ver la figura 8a.

En cuanto a la duración de la inmovilidad, no se observaron diferencias entre el grupo sham ( $83.9 \pm 8.0\%$ ) y el orquitectomizado ( $85.9 \pm 7.0\%$ ) [ $F_{1, 9} = 0.01$ ;  $p = 0.90$ , NS]. Al analizar los efectos del tratamiento farmacológico, se observó que la fluoxetina administrada crónicamente disminuyó significativamente la duración de la inmovilidad [ $F_{2, 18} = 6.15$ ;  $p < 0.009$ ] mientras que el desafío con testosterona restableció los valores del control. La interacción de los factores no fue significativa [ $F_{2, 18} = 2.38$ ;  $p = 0.12$ : NS], ver la figura 8b.

Debido a que no hubo diferencias debidas a la orquitectomía, los datos sham y orquitectomía se representan juntos.

a)



b)

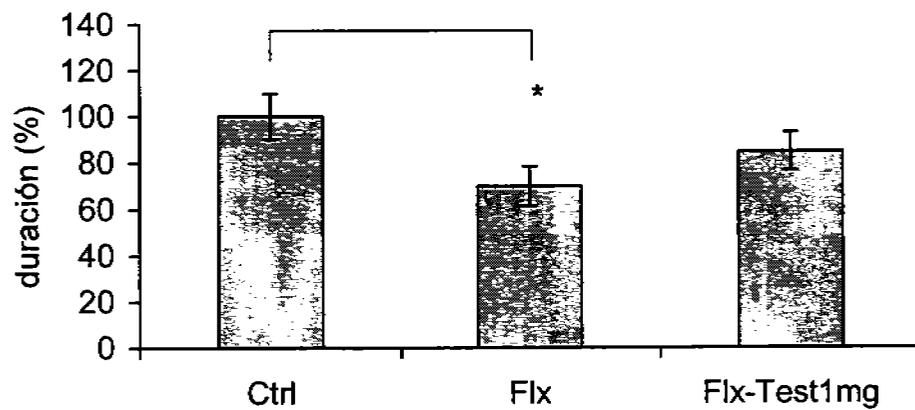
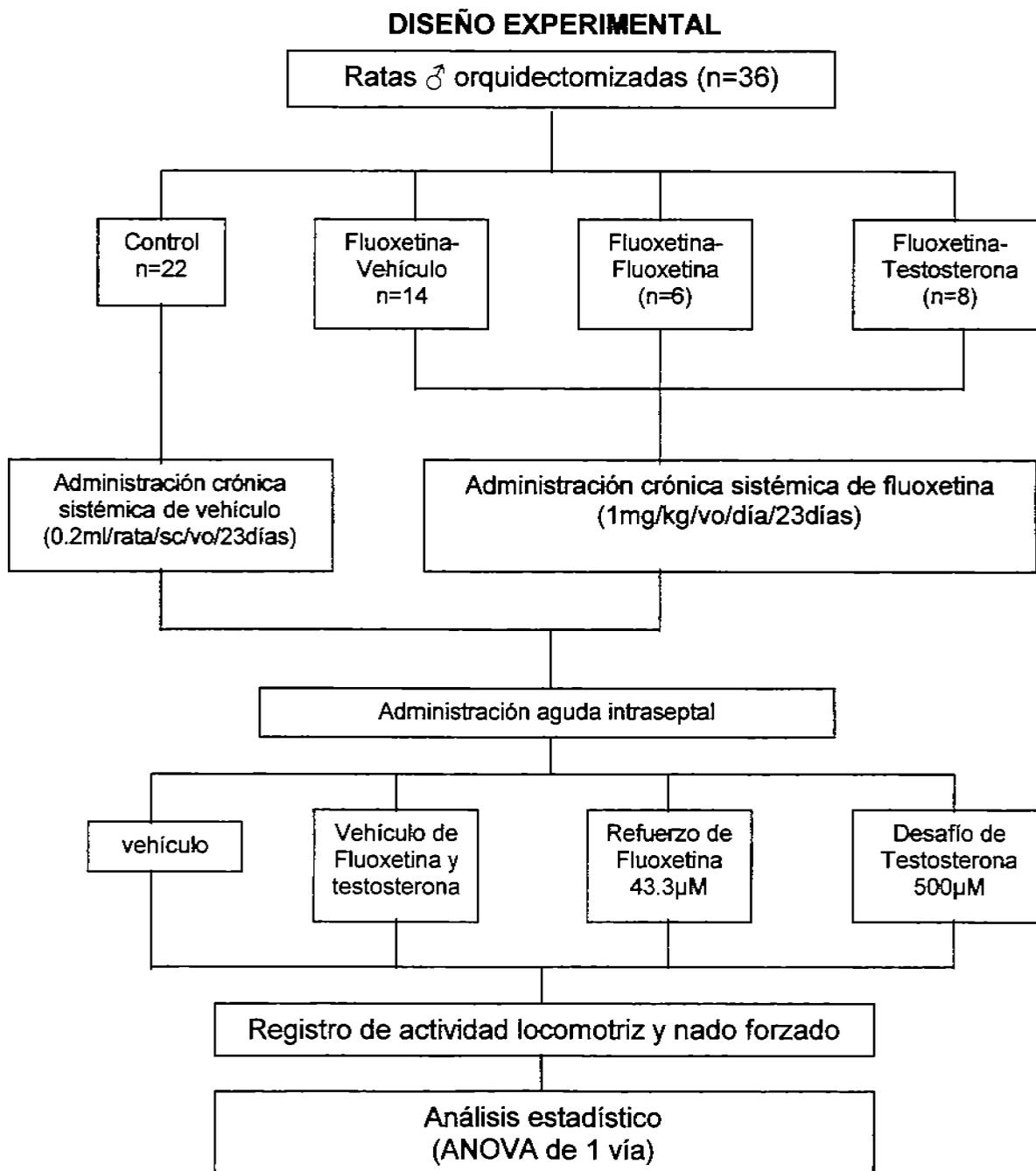


Figura 8. Nado forzado de ratas que recibieron tratamiento crónico sistémico de fluoxetina con testosterona aguda sistémica (n=20). El desafío con testosterona impidió el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina. a) Latencia a la primera inmovilidad, b) duración de la inmovilidad. Las barras corresponden a los grupos sham y orquidectomía juntos. \*Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ .

### 7.3.2: Administración crónica sistémica de fluoxetina con refuerzo o desafío intraseptal de testosterona.

#### Objetivo particular

Evaluar la posible interacción de la testosterona con la fluoxetina en la prueba de nado forzado, combinando tratamiento crónico sistémico de fluoxetina con la administración intraseptal de testosterona (desafío intraseptal de testosterona).



### *Grupos y procedimiento experimental.*

Se utilizaron 36 ratas macho adultas orquidectomizadas que fueron asignadas a dos grupos: el grupo control (n=22) y el grupo que recibió fluoxetina sistémica crónica (n=14).

El grupo control se formó de ratas que recibieron tratamiento crónico sistémico de vehículo de testosterona (0.2 ml de aceite de maíz, s.c., 16 días, n= 15) o vehículo de fluoxetina (0.2 ml de agua purificada por rata, vía oral, 23 días, n= 7). El último día de la administración sistémica de vehículo, los animales recibieron la microinyección intraseptal de vehículo de testosterona o vehículo de fluoxetina y fueron sometidas a las pruebas de actividad locomotriz y nado forzado.

El grupo de fluoxetina sistémica recibió el tratamiento crónico sistémico de fluoxetina (1mg/kg/0.2 ml/vo/23 días) y se dividió en dos grupos: el grupo fluoxetina sistémica-fluoxetina septal (n=6) y el grupo fluoxetina sistémica-testosterona septal (n=8). El día 21 de tratamiento con fluoxetina, los animales de ambos grupos recibieron la microinyección intraseptal de vehículo de fluoxetina o testosterona respectivamente, y se sometieron a las pruebas conductuales. El último día de la administración crónica de fluoxetina (día 23), los animales del grupo fluoxetina sistémica-fluoxetina septal recibieron la microinyección intraseptal de fluoxetina 43.3 $\mu$ M (43.3picomol/ $\mu$ l), mientras que los animales del grupo fluoxetina sistémica-testosterona septal recibieron la microinyección intraseptal de testosterona 500 $\mu$ M (500picomol/ $\mu$ l) y se sometieron a las pruebas conductuales.

La fluoxetina se administró durante 3 semanas debido a que a partir de ese momento se observa el efecto anti-inmovilidad del antidepresivo (Contreras *et al.*, 2001).

La aplicación de testosterona o fluoxetina directamente al núcleo septal lateral permitió evaluar si se trata de un sitio de acción hormonal y antidepresiva, a través de los cambios conductuales observados ante el refuerzo o el desafío farmacológico.

El tiempo transcurrido desde el inicio de la microinyección al momento de someter a los animales a la primera prueba conductual (actividad locomotriz) fue de 15 minutos. Con ello se aseguró registrar a los animales dentro del primer tiempo de vida media de

la fluoxetina de 5 h (Caccia *et al.*, 1990) y de la testosterona de 1 h (Sommerville y Tartelin, 1983) reportado para ratas.

La concentración seleccionada de testosterona para la inyección intraseptal fue la de 500 $\mu$ M, la cual aumentó significativamente la inmovilidad en la prueba de nado forzado en un estudio piloto que se realizó para determinar la concentración a utilizar, mientras que la concentración seleccionada de fluoxetina fue la de 43.3  $\mu$ M por ser la equivalente a la dosis sistémica que disminuye la inmovilidad en dicha prueba (ver el Apéndice I).

Los resultados obtenidos se sometieron al ANOVA de 1 vía para grupos independientes y se utilizó la prueba *post hoc* de Dunnett.

### *Resultados. Tratamiento crónico y desafío intraseptal.*

*Verificación del implante de la cánula guía.* De un total de 36 ratas que fueron implantadas y que recibieron la microinyección intraseptal de testosterona, fluoxetina o vehículo, el 22% de ellas se descartó del análisis de los datos debido a que el implante de la cánula guía se realizó fuera del núcleo septal lateral (septum fimbrial n = 4, cuerpo calloso n = 3, septum ventral = 1). La trayectoria de la cánula guía y la marca del colorante se observó a simple vista. La figura 9 muestra una foto donde se puede observar la trayectoria de la cánula implantada en el núcleo septal lateral.

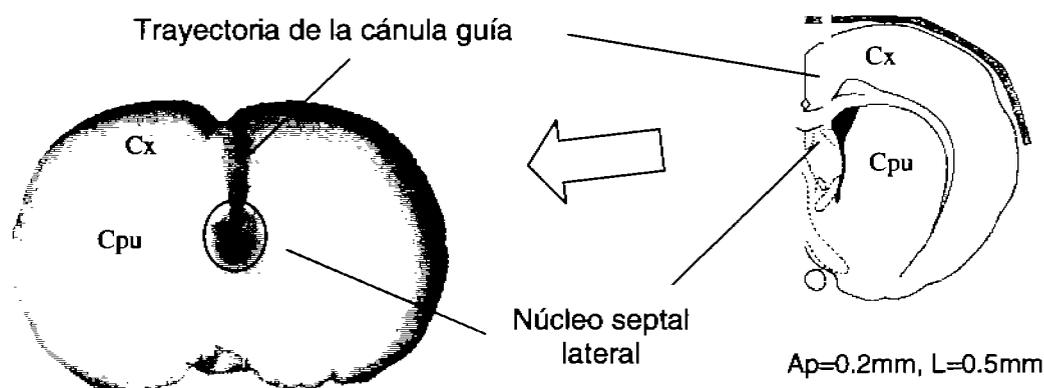


Figura 9. Trayectoria de la cánula guía en un corte transversal (600 $\mu$ m) de un cerebro de ratona. Se puede apreciar la trayectoria de la cánula que indica la dirección hacia el núcleo septal lateral y la marca realizada con la microinyección de 1  $\mu$ l de azul de metileno (círculo). Cx=corteza fronto-parietal, Cpu= caudado putamen. Plano del corte: Ap=anteroposterior, L= lateral.

**Actividad locomotriz.** En la prueba de campo abierto, la administración intraseptal de vehículo, refuerzo de fluoxetina (43.3 $\mu$ M), o desafío intraseptal de testosterona (500 $\mu$ M), al final del tratamiento crónico sistémico con fluoxetina (1 mg/kg), no modificaron la actividad locomotriz ( $F_{3, 46} = 0.88$ ,  $p = 0.45$ , NS), ver la figura 10.

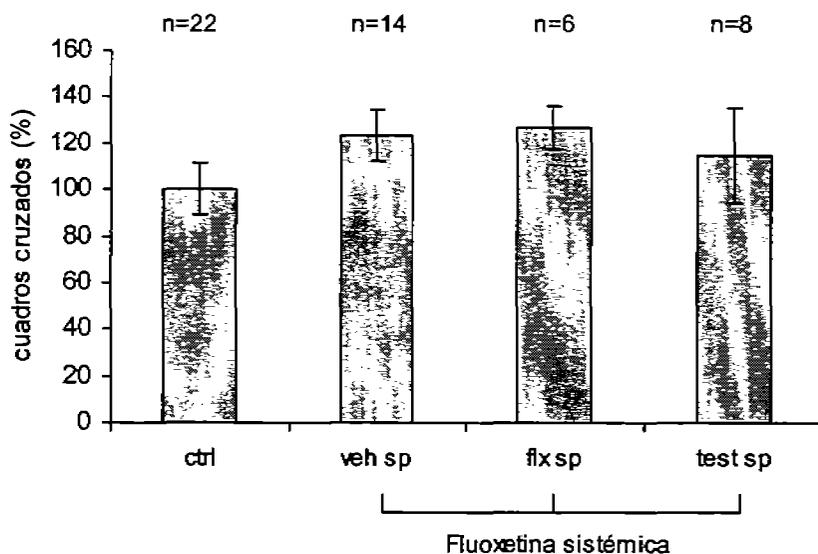
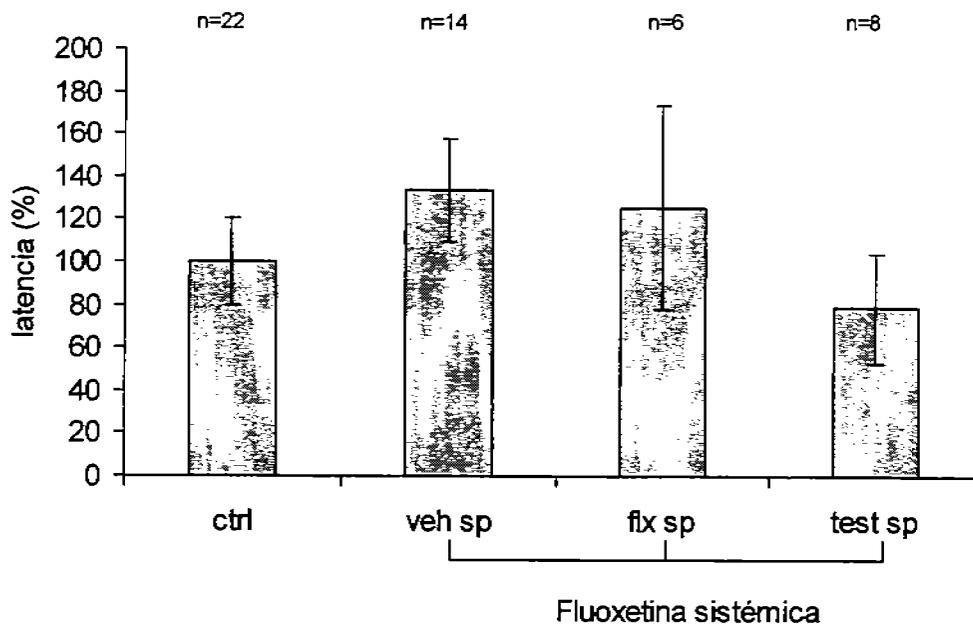


Figura 10. Actividad locomotriz (número de cuadros cruzados) de ratas que recibieron tratamiento crónico sistémico de fluoxetina con refuerzo de fluoxetina (fix sp) o desafío intraseptal de testosterona (test sp). Ningún tratamiento modificó el número de cuadros cruzados.

**Nado forzado.** El ANOVA de una vía mostró que no hubo diferencias en la latencia a la primera inmovilidad ( $F_{3, 46} = 0.72$ ,  $p=0.53$ , ver la figura 11a) ante la administración intraseptal de vehículo, refuerzo de fluoxetina o desafío de testosterona en los animales que recibieron la administración crónica de fluoxetina. La duración de la inmovilidad fue significativamente menor comparada con el grupo control, ante la administración sistémica crónica de fluoxetina en ausencia o presencia del refuerzo intraseptal con fluoxetina ( $F_{3, 46} = 10.1$ ,  $p<0.0001$ ), mientras que el desafío intraseptal con testosterona revirtió este efecto, ver la figura 11b.

a)



b)

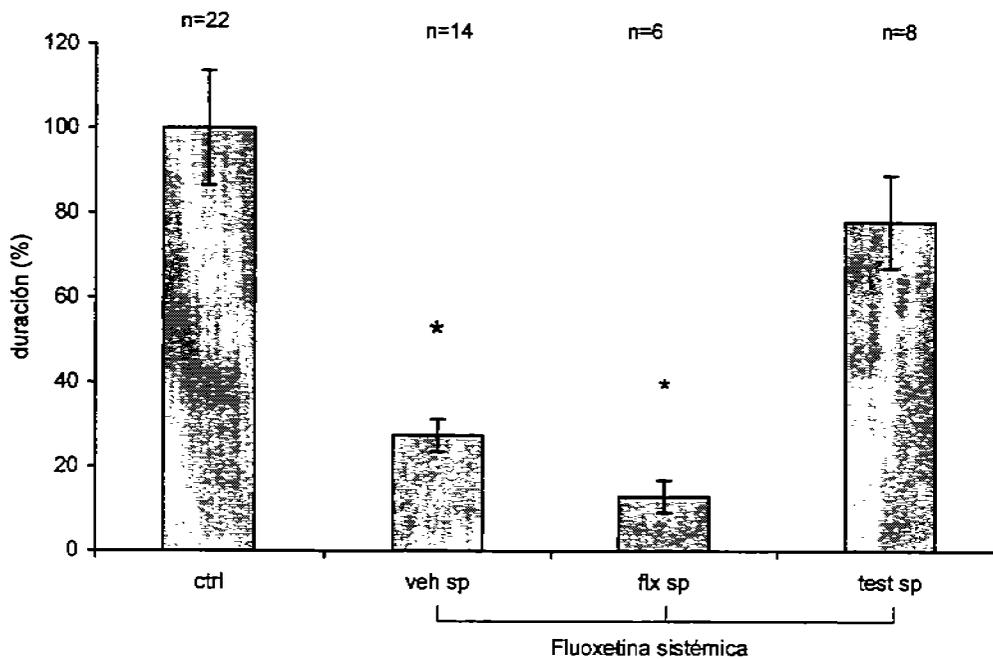


Figura 11. Nado forzado de ratas que recibieron fluoxetina por vía sistémica crónica con desafío intraseptal (vía local). La administración de fluoxetina produjo menor duración de la inmovilidad mientras que el desafío intraseptal con testosterona impidió tal efecto anti-inmovilidad. a) Latencia a la primera inmovilidad, b) duración de la inmovilidad. \* Dunnet,  $p < 0.05$ .

## 7.4 CUANTIFICACIÓN DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA

Los resultados obtenidos por medio del método cuantitativo inmunoenzimático de ELISA mostraron que los animales orquidectomizados que recibieron testosterona (1mg/rata/sc/día/21días) tuvieron concentraciones suprafisiológicas de testosterona en el orden de 10 veces mayor al valor del grupo intacto que recibió vehículo. El tratamiento crónico con fluoxetina no produjo cambios en el nivel plasmático ocasionado por la administración crónica de testosterona (ver tabla 2). Los grupos orquidectomizados, que recibieron vehículo o fluoxetina, disminuyeron sus niveles de testosterona a valores indetectables.

Tabla 2. Concentraciones plasmáticas de testosterona en ratas que recibieron la inyección de la hormona (1mg/día) durante 21 días.

	Gpo. Intacto (vehículo)	Gpo. Oqx-T (T1mg/21días)	Gpo. Oqx-T-Fix (T1mg+Fix1mg/21días)
Testosterona (ng/ml)	2.19±0.36	20.44±0.09	21.70±0.13

## 8. DISCUSIÓN.

El objetivo de este estudio fue explorar el efecto de la testosterona administrada por vía sistémica o aplicada en el núcleo septal lateral de la rata, sobre la inmovilidad en la prueba de nado forzado, para determinar su interacción con el antidepresivo fluoxetina. Los resultados muestran que una sola inyección de testosterona (10mg/kg) o fluoxetina (10mg/kg), o la administración crónica de testosterona, por vía sistémica, no producen efecto anti-inmovilidad; pero si lo hace la administración crónica sistémica de fluoxetina. Se detectó una interacción farmacológica, la testosterona administrada de manera aguda, sistémica o intraseptal, suprime el efecto anti-inmovilidad de fluoxetina, sin afectar sustancialmente la actividad locomotriz.

### *Actividad locomotriz.*

La inmovilidad en la prueba de nado forzado no debe estar asociada con cambios en la actividad locomotriz (Hilakivi y Lister, 1990; Wieland y Lucki, 1990; Alonso *et al.*, 1991; Contreras *et al.*, 1998), aunque es posible alguna reducción de ella ante el tratamiento con fluoxetina, sin modificar el efecto anti-inmovilidad (Contreras *et al.*, 2001); sin embargo, algunos fármacos sedantes o estimulantes del sistema nervioso disminuyen o aumentan, respectivamente, la actividad locomotriz del animal, influyendo en la inmovilidad desplegada en el nado forzado. En el presente estudio una inyección de fluoxetina o la co-administración crónica combinada de fluoxetina y testosterona disminuyó la actividad locomotriz sin influir en el nado forzado.

En este estudio se encontró que ni la orquidectomía *per se*, ni la testosterona modificaron la locomoción en ratas adultas. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores (Salvador *et al.*, 1999; Frye y Seliga, 2001; Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2003), es decir, independientemente del estatus gonadal, la testosterona no modifica la locomoción.

### *Testosterona y nado forzado.*

Los estudios que relacionan a la testosterona con la depresión experimental son escasos, en cambio, abundan aquellos en los que se han estudiado hembras para determinar el papel que juegan las hormonas gonadales. Se sugiere que

el dimorfismo sexual en la prueba de nado forzado en ratas, en donde los machos despliegan mayor inmovilidad que las hembras (Alonso *et al.*, 1991; Contreras *et al.*, 1995), es modulado por las hormonas gonadales, un efecto que parece dar inicio en la pubertad. Bernardi y colaboradores (1989) demostraron que la testosterona disminuye la inmovilidad de manera semejante al antidepresivo tricíclico desmetilimipramina en ratones adultos. En contraste, en nuestro estudio la administración aguda o crónica de testosterona en la rata careció de efectos sobre la duración de la inmovilidad, de acuerdo con Martínez-Mota y Fernández-Guasti (2004).

El dimorfismo sexual en la respuesta antidepresiva a nivel clínico y experimental (Hamilton *et al.*, 1984; Komstein *et al.*, 2000; Grigoriadis *et al.*, 2003; Bano *et al.*, 2004; Leuner *et al.*, 2004) sugiere la participación de las hormonas gonadales incluyendo la testosterona. La interacción de testosterona con el sistema serotoninérgico en el macho ha sido demostrada en la agresión (Cologer-Clifford *et al.*, 1999), en donde hay una relación opuesta de la testosterona con la serotonina (Bernhardt, 1997): ante una función serotoninérgica disminuída ocurre mayor agresión, mientras que la relación de la testosterona con la impulsividad y la agresión es directamente proporcional (Simon *et al.*, 1998; Dolan *et al.*, 2001). Así, es probable que en aspectos no reproductivos de la conducta exista alguna interacción de la testosterona con el sistema serotoninérgico en el septum lateral en donde concurren estos dos sistemas.

La administración microiontoforética de hormonas esteroidales provoca la respuesta inmediata de las neuronas (Suga y Sakuma, 1994). La pregnenolona y la dehidroepiandrosterona aplicadas en el área septo-preóptica, aumentan la frecuencia de disparo neuronal a través de acciones membranales (Robel y Baulieu, 1985); en tanto que el estradiol produce efectos inhibitorios, la testosterona activa sólo una pequeña población neuronal en el septum (Yamada, 1979). La duración de los efectos de la testosterona aplicada microiontoforéticamente se restringe a sólo algunos minutos, con latencias  $\leq 5$  min y con 30 min de duración (Orsini, 1981). Tales cambios consisten en respuestas rápidas de las hormonas en la membrana, pero no a nivel genómico el cual implica respuestas a largo plazo (Heinlein y Chang, 2002). En el presente estudio, la testosterona microinyectada *in situ* en el núcleo septal lateral provocó una respuesta rápida ya que el aumento de la duración de la inmovilidad se

observó 15 minutos después de la microinyección de la hormona. Por tanto, se sugiere que estos efectos inmediatos hayan ocurrido a través del receptor membranal a andrógenos. La distribución de los receptores a andrógenos y de aromatasas es mayor en los machos, es decir, es sexualmente dimórfica (Simmerly *et al.*, 1990; Young y Chang, 1998; Ravizza *et al.*, 2002; Xiao y Jordan, 2002); sin embargo, en el presente estudio se descarta el efecto agudo de la aromatización de la testosterona intraseptal debido a que se requiere de 48 horas para que la aromatasas ejerza su acción enzimática (Roselli y Resko, 1997).

#### *Fluoxetina y nado forzado.*

Las acciones antidepresivas de la fluoxetina han sido extensamente documentadas tanto a nivel clínico como experimental (Detke *et al.*, 1995; 1997; Skerrett *et al.*, 1997; Kirby y Lucki, 1997; Reneric y Lucki, 1998; Contreras *et al.*, 2001 ver Apéndice ; Rossi *et al.*, 2004). Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina como la fluoxetina reducen la inmovilidad en el nado forzado e incrementan la conducta activa de nado, a diferencia de otros fármacos selectivos de la neurotransmisión noradrenérgica o dopaminérgica que reducen la inmovilidad pero incrementan el escalamiento (Detke y Lucki, 1996; Page *et al.*, 1999).

El nado forzado por sí mismo disminuye un 40% los niveles extracelulares de serotonina en el núcleo septal lateral (Kirby *et al.*, 1995), por tanto, es posible que el aumento de serotonina en el rafe dorsal producido por la fluoxetina (Rutter y Auerbach, 1993; Rutter *et al.*, 1995; Duman *et al.*, 1997) esté asociado con la reducción de la inmovilidad en el nado forzado. Esta acción anti-inmovilidad puede tener base en que la serotonina en exceso activa al autorreceptor 5HT<sub>1A</sub> e hiperpolariza las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal disminuyendo su tasa de disparo (Kelly *et al.*, 1991). Como la liberación de serotonina es proporcional a la tasa de disparo, la activación excesiva de los autorreceptores disminuye la liberación de serotonina hacia las estructuras límbicas de proyección del rafe (Rutter *et al.*, 1995). Con la administración prolongada con antidepresivos, la presencia sostenida de serotonina produce desensibilización gradual de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en el núcleo dorsal del rafe (Fuller y Wong, 1977; Hajós *et al.*, 1995; Le Poul *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996) con lo que

las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal gradualmente recuperan su tasa normal de disparo incrementando la concentración extracelular local de serotonina que produce efectos desinhibitorios en estructuras que reciben aferencias inhibitorias del rafe dorsal, como la corteza frontal y el NSL (Ceci *et al.*, 1993; Contreras *et al.*, 2001).

A pesar de que las dosis anti-inmovilidad de fluoxetina administradas sistémicamente en un régimen subcrónico o crónico oscilan entre 5 y 20 mg/kg (Detke *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1999; Cryan y Lucki, 2000), los efectos anti-inmovilidad de la fluoxetina en el presente trabajo son consistentes con otros estudios (Detke *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 2001) en los que también se emplean dosis de 1 mg/kg durante 21 días. Ante la falta de efecto anti-inmovilidad de la administración aguda de fluoxetina, es posible entonces que una sola inyección de fluoxetina no conduzca a su biotransformación a nor-fluoxetina, pero tampoco ocurren aun los cambios plásticos asociados a la administración repetida (Fuller y Snoddy, 1991).

#### *Interacción Testosterona-Fluoxetina (desafío farmacológico)*

En el presente estudio se analizó la posible interacción entre la testosterona y la fluoxetina proponiendo al núcleo septal lateral como sitio blanco. Observamos que la combinación del tratamiento crónico sistémico de la fluoxetina con la aplicación intraseptal de testosterona anuló el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina, lo que se replicó en la combinación de la administración sistémica de ambas sustancias. Si bien la latencia a la primera inmovilidad no se mide regularmente en los estudios de nado forzado, esta variable aporta información sobre el primer esfuerzo que realiza la rata para escapar de la situación estresante del nado (Contreras *et al.*, 2001; Espejo y Miñano, 1999). En el presente trabajo, la interacción sistémica crónica entre fluoxetina y testosterona provocó que las ratas rápidamente desplegaran la inmovilidad y con una duración mayor en comparación con el tratamiento único con fluoxetina. Entonces la combinación de testosterona con fluoxetina a largo plazo impide el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina.

En el presente estudio se encontró que la orquidectomía y la testosterona por sí solas no modifican la inmovilidad, de acuerdo con el estudio de Martínez-Mota y

Fernández-Guasti (2004), quienes reportaron que el tratamiento subagudo de fluoxetina reduce la inmovilidad pero tal efecto se bloquea en machos orquidectomizados y restituidos crónicamente con propionato de testosterona (1 mg/rata/10 días). En el presente estudio, la fluoxetina crónica (1 mg/kg/21días) disminuyó la inmovilidad tanto en machos intactos como orquidectomizados. La diferencia probablemente radica en la duración del tratamiento. El efecto del desafío farmacológico en el presente estudio coincide con el efecto del tratamiento de testosterona con fluoxetina en el estudio de estos autores, en el sentido de que aunque uno de los tratamientos se administre de manera crónica, si el siguiente tratamiento es co-administrado de manera subaguda, no se observa disminución de la inmovilidad.

### *Participación serotoninérgica*

La orquidectomía produce *downregulation* (regulación a la baja) del receptor 5HT<sub>1A</sub> en ratones *knockout* al transportador de serotonina, mientras que la ovariectomía produce el efecto contrario (Bouali *et al.*, 2003), es decir, existe dimorfismo sexual en el sistema serotoninérgico. Es mayor el contenido de serotonina hipotalámica en hembras comparado con machos, por acción de las hormonas gonadales ya que la orquidectomía neonatal aumenta los niveles de serotonina a valores cercanos a los de hembras intactas (Borisova *et al.*, 1996). Estos hallazgos sugieren que la testosterona ejerce una influencia inhibitoria sobre la síntesis de serotonina, ya que la orquidectomía en ratas de 70 días de edad también incrementa los niveles de serotonina cerebral en estructuras límbicas del cerebro anterior (Engel *et al.*, 1979); sin embargo, Bitar y colaboradores (1991) encontraron que la orquidectomía reduce los niveles de serotonina en el hipocampo y en el hipotálamo y que dicho efecto es revertido por la administración de testosterona y estradiol. Por otro lado, el incremento de la actividad serotoninérgica inducida por agonistas 5-HT<sub>2</sub> durante la segunda semana de gestación, antagoniza el efecto masculinizante de la testosterona neonatal (Murray *et al.*, 2004). En conductas no reproductivas se ha reportado que los machos son más susceptibles a la hiperfagia inducida por el agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT comparado con las hembras en fase de estro, lo que sugiere una sensibilidad diferente de los receptores serotoninérgicos dependientes del género y del

estatus hormonal (Uphouse *et al.*, 1991). Las diferencias sexuales en la expresión del ARNm de los receptores a serotonina 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>2A</sub> en el cerebro de la rata, podrían deberse a la testosterona, ya que la orquidectomía incrementa significativamente el ARNm para 5HT<sub>1A</sub> en estructuras límbicas como la corteza cerebral, el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala y el núcleo dorsal del rafe, donde los receptores a andrógenos son abundantes (Zhang *et al.*, 1999). A pesar de las diferencias mencionadas en la actividad serotoninérgica con la orquidectomía, no se observaron diferencias entre animales intactos y orquidectomizados ante la administración crónica de fluoxetina y se puede deber en parte a que la castración no afecta la concentración del transportador de serotonina (Attali *et al.*, 1997), por lo que los efectos antidepresivos observados de la fluoxetina se producen sin la intervención del aporte testicular del andrógeno.

El tratamiento crónico con fluoxetina desensibiliza al autoreceptor somatodendrítico 5HT<sub>1A</sub> (como ya ha sido ampliamente demostrado) pero también hipersensibiliza al receptor 5HT<sub>1A</sub> post-sináptico en el hipocampo debido a modificaciones en el proceso de acoplamiento a la proteína G (Castro *et al.*, 2003). Cabe mencionar que en la neurotransmisión puede haber interacciones receptor-receptor en la membrana celular, vía macromoléculas involucradas en el reconocimiento y la traducción de las señales. Un neurotransmisor o un modulador a través de la unión a su receptor, modifica las características del receptor a otro neurotransmisor o neuromodulador (Zoli *et al.*, 1993). Dicho tipo de regulación conforma el fenómeno de heterorregulación de receptores y ha sido ampliamente descrito en la modulación alostérica del receptor GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>, y la heterorregulación de los receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos y adrenérgicos a través de los receptores de neuropéptidos y de otros moduladores, en presencia o ausencia de la activación de proteínas G y segundos mensajeros (Zoli *et al.*, 1993; Agnati *et al.*, 2003). Algunas interacciones se han relacionado con desórdenes psiquiátricos, como en el caso de los heterómeros de los receptores A<sub>2</sub>-D<sub>2</sub> y su interacción antagonística en la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia (Ferre *et al.*, 2004). También se ha demostrado que diferentes receptores serotoninérgicos tienen efectos inhibidores (5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>) y estimuladores (5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>3</sub>) sobre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-testicular inducido por hembras receptoras, lo que sugiere

algún tipo de interacción receptor-receptor en el control de la activación sexual en los ratones macho (Amstislvskaia y Popova, 2004). No obstante que parecería que la fluoxetina y la testosterona actúan bajo diferentes mecanismos de acción, algún tipo de interacción receptor-receptor podría ocurrir en el bloqueo del efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina.

La respuesta del receptor serotoninérgico a los antidepresivos es dependiente de la condición hormonal de los animales. Un estudio de unión a receptores ha demostrado que la castración suprime la disminución de la concentración del receptor 5HT<sub>2A</sub> inducido por el tratamiento crónico con el antidepresivo imipramina, lo cual es restaurado por la administración de testosterona y estradiol (Kendall *et al.*, 1982). El bloqueo de la acción antidepresiva de la fluoxetina por la testosterona observado en el presente estudio, sugiere que el efecto de la fluoxetina es parcialmente dependiente de la testosterona exógena que está interactuando con receptores serotoninérgicos, probablemente el 5HT<sub>1A</sub>, una posibilidad que debe ser explorada. Los mecanismos celulares involucrados en la producción de estos efectos moduladores aún no se han determinado; los múltiples procesos que caracterizarían la forma en que la testosterona afecta la función serotoninérgica en la desesperanza requiere de estudios adicionales.

#### *Otras interacciones*

La disminución del efecto de la fluoxetina ante el desafío con el andrógeno, no puede ser explicada por un antagonismo competitivo a nivel serotoninérgico porque las acciones de la testosterona sobre este sistema de neurotransmisión son indirectas. La testosterona en cambio, ejerce una interacción alostérica sobre el receptor 5HT<sub>3</sub> en la membrana, que inhibe la corriente evocada en el canal iónico acoplado a serotonina sin modificar la afinidad por el receptor (Wetzel *et al.*, 1998). El antagonismo observado en el presente estudio podría entonces ser de tipo no competitivo ya que para la fluoxetina y la testosterona hay receptores conocidos y son claramente diferentes.

#### *Participación de otras hormonas*

Otras interacciones farmacocinéticas podrían contribuir a explicar la interacción entre la fluoxetina y la testosterona en el nado forzado. El tratamiento con fluoxetina o

paroxetina aumenta la concentración de la alopregnanolona en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con depresión (Uzunov *et al.*, 1996; Uzunova *et al.*, 1998) y en el cerebro de ratones (Nechmad *et al.*, 2003), por la estimulación de la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa y la 5 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Griffin y Mellon, 1999; Romeo *et al.*, 2000). El contenido de esta hormona está disminuído en la depresión (Eser *et al.*, 2005) y es conveniente destacar que la testosterona disminuye la concentración de alopregnanolona cerebral y la expresión del ARNm de la 5 $\alpha$ -reductasa (Pinna *et al.*, 2005). Por lo tanto, el bloqueo del efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina crónica por la testosterona podría deberse a acciones inhibitoras de la testosterona sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa, al disminuir la síntesis de la alopregnanolona y así el efecto anti-inmovilidad mediado por neuroesteroides. Se propone que otras hormonas gonadales diferentes de testosterona podrían estar implicadas en el efecto de la fluoxetina pero al menos es claro que la testosterona exógena impide el efecto anti-inmovilidad en nuestro estudio.

#### *Cuantificación de testosterona plasmática*

La administración crónica de testosterona en animales orquidectomizados produjo un aumento de 10 veces la concentración control. Este aumento fue independiente del tratamiento crónico con fluoxetina, es decir, la fluoxetina no modificó los niveles plasmáticos de testosterona producidos por la administración de esta hormona, por tanto, se descarta cualquier proceso de inducción enzimática ya que los niveles promedio de testosterona plasmática se mantuvieron por arriba del rango fisiológico descrito por otros autores (Bartke *et al.*, 1973; Miller *et al.*, 1989).

#### *Participación genómica*

En la depresión hay una aparente alteración de las vías intracelulares de señalización de AMPc, de esta forma los nuevos agentes terapéuticos se dirigirían a modificar la traducción de las señales intracelulares aumentando la producción o duración del AMPc o modificando la acción de las enzimas implicadas (proteincinasas, fosfodiesterasas y fosfatasas), o bien de los factores de transcripción aumentando CREB, su fosforilación o la expresión de la neurotrofina BDNF (Paez *et al.*, 2003). Se

ha demostrado que en los machos se presenta una mayor fosforilación de CREB en algunas regiones límbicas (Auger *et al.*, 2001). Por tanto, podría haber alguna vía común en la que convergen las acciones de los andrógenos y los antidepresivos como la fluoxetina: la señalización intracelular, o bien, a través del sistema de glucocorticoides ya que éstos últimos inhiben las acciones de los esteroides gonadales y producen "regulación a la baja" de los receptores serotoninérgicos (Brown, 1994; Flugge *et al.*, 1998; Páez *et al.*, 2003). Con lo que se observa alguna participación de la testosterona en algunos aspectos genómicos relacionados con la depresión.

### *Consideración final*

Aparentemente no existen diferencias entre niños y adolescentes en la sintomatología depresiva, ya que la duración, la severidad, los desórdenes comórbidos y la historia parental de desórdenes psiquiátricos son similares; sin embargo, los adolescentes tienden a requerir un tiempo más largo de recuperación y un tiempo más corto para desarrollar recurrencias comparado con los niños prepuberales (Birmaher *et al.*, 2004). Por ello, es posible que la elevación de la testosterona en la pubertad sea un factor de vulnerabilidad a la depresión. Por lo anteriormente descrito, los hallazgos de este trabajo permiten sugerir que los pulsos de testosterona pueden repercutir negativamente en el efecto antidepresivo de la fluoxetina.

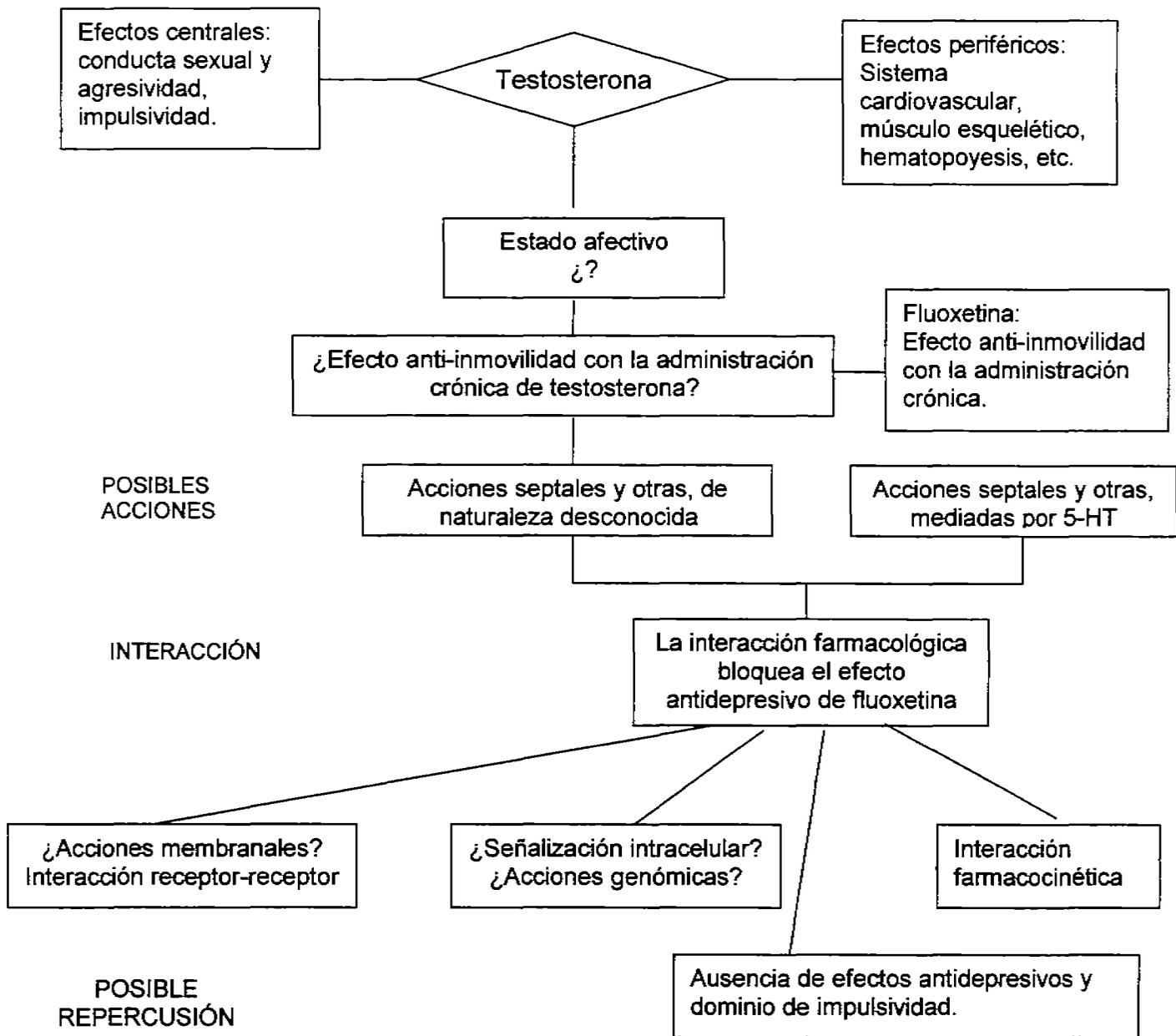


Fig. 10. Participación de la testosterona en la regulación de la desesperanza. Un pulso de testosterona bloquea el efecto de fluoxetina cuando se administra como desafío ante la impregnación con el antidepresivo. Estructuras límbicas como el núcleo septal lateral son sitios blanco en la interacción farmacológica de testosterona con fluoxetina, probablemente a través interacciones receptor-receptor (acciones membranales), de mecanismos de señalización intracelular o de interacción farmacocinética.

## 9. CONCLUSIONES

1. Con los resultados obtenidos de los experimentos, se concluye que la administración de testosterona en animales con concentraciones fisiológicas de testosterona no modifica la desesperanza en el modelo de depresión experimental de nado forzado.
2. En ratas con o sin el aporte endógeno de testosterona gonadal, el efecto antidepresivo de fluoxetina se cancela con una exposición sistémica a testosterona.
3. El núcleo septal lateral participa en las acciones antidepresivas de la fluoxetina; modificadas por la testosterona.
4. La interacción de testosterona con fluoxetina muestra un antagonismo sobre el efecto antidepresivo conocido.
5. En general, un pulso de testosterona dirigido al núcleo septal lateral o su paso al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica repercute sobre el efecto antidepresivo de fluoxetina cancelando sus acciones sobre la motivación.

## 10. REFERENCIAS.

Agnati LF, Ferré S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons *Pharmacol Rev* 2003; 55: 509–550.

Alonso SJ, Castellano MA, Afonso D, Rodríguez M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol Behav* 1991; 49: 69-72.

Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1007: 232-237.

American Psychiatric Association. DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), Text Revision. American Psychiatric Press, Washington DC, fourth edition, 943 pp, 2000.

Amstislvskaia TG, Popova NK. The roles of different types of serotonin receptors in activation of the hypophyseal-testicular complex induced in mice by the presence of a female. *Neurosci Behav Physiol* 2004; 34(8): 833-837.

Angold A, Costello EJ, Erkanli A, Worthman CM. Pubertal changes in hormone levels and depression in girls. *Psychol Med* 1999; 29: 1043-1053.

Attali G, Weizman A, Gil-Ad I, Rehavi M. Opposite modulatory effects of ovarian hormones on rat brain dopamine and serotonin transporters. *Brain Res* 1997; 756(1-2): 153-159.

Auger AP, Hexter DP, McCarty MM. Sex difference in the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in neonatal rat brain. *Brain Res* 2001; 890(1): 110-117.

Baischer W, Koinig G, Hartman B, Huber J, Langer G. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in depressed premenopausal women: elevated blood testosterone concentrations compared to normal controls. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20(5): 553-559.

Bano S, Akhter S, Afridi MI. Gender based response to fluoxetine hydrochloride medication in endogenous depression. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004; 14(3):161-165.

Bartke A, Steele RE, Musto N, Caldwell BV. Fluctuations in plasma testosterone levels in adult male rats and mice. *Endocrinology* 1973; 92: 1223-1228.

Beach FA, Holz-Tucker AM. Effects of different concentrations of androgens upon sexual behavior in castrated male rats. *J Comp Physiol Psychol* 1949; 42: 433-453.

Beasley CM Jr, Domseif BE, Bosomworth JC, Saylor ME, Rampey AH Jr, Heiligenstein JH, Thompson VL, Murphy DJ, Masica DN. Fluoxetine and suicide: a meta-analysis of controlled trials of treatment for depression. *BMJ* 1991; 303(6804): 685-92.

Bernardi M, Genedani S, Tagliavini S, Bertolini A. Effect of castration and testosterone in experimental models of depression in mice. *Behav Neurosci* 1989; 103(5): 1148-1150.

Bernhardt PC. Influences of serotonin and testosterone in aggression and dominance: convergence with social psychology. *Curr Direct Psychol Sci* 1997; 6(2): 44-48.

Birmaher B, Williamson DE, Dahl RE, Axelson DA, Kaufman J, Dorn LD, Ryan ND. Clinical presentation and course of depression on youth: does onset in childhood differ from onset in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004; 43(1): 63-70.

Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK. Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA<sub>A</sub> receptor. *Brain Res* 1991; 561: 157-161.

Bitran D, Kellogg CK, Hilvers RJ. Treatment with anabolic-androgenic steroids affects non sex related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA<sub>A</sub> receptors in the rat. *Horm Behav* 1993; 27: 568-583.

Bloch M, Schmidt PJ, Su TP, Tobin MB, Rubinow DR. Pituitary-adrenal hormones and testosterone across the menstrual cycle in women with premenstrual syndrome and controls. *Biol Psychiatry* 1998; 43(12): 897-903.

Bloch M, Schmidt PJ, Danaceau M, Murphy J, Nieman L, Rubinow D. Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 924-930.

Blum I, Lerman M, Misrachi I, Nordenberg Y, Grosskopf I, Weizman A, Levy-Schiff R, Sulkes J, Vered Y. Lack of plasma norepinephrine cyclicity, increased estradiol during the follicular phase, and of progesterone and gonadotrophins at ovulation in women with premenstrual syndrome. *Neuropsychobiology* 2004; 50(1): 10-15.

Booth A, Shelly G, Mazur A, Tharp G, Kittok R. Testosterone and winning and losing in human competition. *Horm Behav* 1989; 23: 556-571.

Booth A, Johnson DR, Granger DA. Testosterone and men's depression: the role of social behavior. *J Health Soc Behav* 1999; 40: 130-140.

Borisova Na, Proshlyakova EV, Sapronova AY, Ugrumov MV. Androgen-dependent sex differences in the hypothalamic serotonergic system. *Eur J Endocrinol* 1996; 134(2): 232-235.

Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 1988; 94: 147-160.

Bouali S, Evrard A, Chastanet M, Lesch KP, Hamon M, Adrien J. Sex hormone-dependent desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in knockout mice deficient in the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci* 2003; 18(8):2203-2212.

Brand T, Slob AK. Peripubertal castration of male rats, adult open field ambulation and partner preference behavior. *Behav Brain Res* 1988; 30: 111-117.

Breslau N, Schultz L, Peterson E. Sex differences in depression: a role of preexisting anxiety. *Psychiat Res* 1995; 58: 1-12.

Brincat M, Magos A, Studd JW, Cardozo LD, O'Dowd T, Wardle PJ, Cooper D. Subcutaneous hormone implants for the control of climacteric symptoms. *Lancet* 1984; 1(8367):16-18.

Brown RE. An introduction to neuroendocrinology. United Kingdom: Cambridge University Press; 1994. p. 408.

Caccia S, Cappi M, Fracasso C, Garattini S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1990; 100(4): 509-5014.

Cameron DR, Braunstein GD. The use of dehydroepiandrosterone therapy in clinical practice. *Trat Endocrinol* 2005; 4(2):95-114.

Cashdan E. Hormones, sex and status in women. *Horm Behav* 1995; 29: 354-366.

Castro ME, Diaz A, Del Olmo E, Pazos A. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 2003; 44: 93-101.

Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1560–H1569.

Ceci A, Baschiroto A, Borsini F. Effect of fluoxetine on the spontaneous electrical activity of fronto-cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 1993; 250: 461–464.

Celada P, Puig V, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29(4): 252-265.

Chaki S, Hirota S, Funakoshi T, Suzuki Y, Suetake S, Okubo T, Ishii T, Nakazato A, Okuyama S. Anxiolytic-like and antidepressant-like activities of MCL0129 (1-[(S)-2-(4-Fluorophenyl)-2-(4-isopropylpiperidin-1-yl)ethyl]-4-[4-(2-methoxynaphthalen-1-yl)]

butyl]piperazine), a novel and potent nonpeptide antagonist of the melanocortin-4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304(2): 818–826.

Chaki S, Nakazato A, Kennis L, Nakamura M, Mackie C, Sugiura M, Vinken P, Ashton D, Langlois X, Steckler T. Anxiolytic- and antidepressant-like profile of a new CRF1 receptor antagonist, R278995/CRA0450. *Eur J Pharmacol* 2004; 485: 145–158.

Chatterton RT, Dooley SL. Reversal of diurnal cortisol rhythm and suppression of plasma testosterone in obstetric residents on call. *J Soc Gynecol Invest* 1999; 6: 50-54.

Christiansen K, Knussmann R, Couwenbergs C. Sex hormones and stress in the human male. *Horm Behav* 1985; 19: 426-440.

Cologer-Clifford A, Simon NG, Richter ML, Smoluk SA, Lu S. Androgens and estrogens modulate 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> agonist effects on aggression. *Physiol Behav* 1999; 65(4-5): 823-8.

Contreras CM, Alcalá-Herrera V, Marván ML. Actions of antidepressants in the septal of the rat. *Physiol Behav* 1989; 46(4): 793-798.

Contreras CM, Lara-Morales H, Molina-Hernández M, Saavedra M, Arellín-Rosas G. An early lesion of the lateral septal nuclei produced changes in the forced swim test depending on gender. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 1995; 19(8): 1277-1284.

Contreras CM, Martínez-Mota L, Saavedra M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 1998; 22: 1121-1128.

Contreras CM, Marván ML, Alcalá-Herrera V, Guzmán-Sáenz MA. Chronic clomipramine increases firing rate in lateral septal nuclei of the rat. *Physiol Behav* 48: 551-554, 1990.

Contreras CM, Marván ML, Alcalá-Herrera V. A few electroconvulsive shocks produce more reliable effects of firing rate in lateral septal neurons than repetitive treatment in the rat. *Neuropsychobiology* 1993a; 27: 80-82.

Contreras CM, Marván ML, Alcalá-Herrera V. Sleep deprivation is a less potent agent than clomipramine in increasing firing rate in lateral septal neurons in the rat. *Neuropsychobiology* 1993b; 27:83-85.

Contreras CM, Molina M, Saavedra M, Martínez-Mota L. Lateral septal neuronal firing rate increased during proestrus-estrus in the rat. *Physiol Behav* 2000; 68(3): 279-284.

Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, Bernal-Morales B. The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurons in the rat. *J Psychopharmacol* 2001; 15(4):231-236.

Contreras CM, Chacón L, Rodríguez-Landa JF, Bernal-Morales B, Gutiérrez-García AG, Saavedra M. Spontaneous firing rate of lateral septal neurons decreases after forced swimming test in Wistar rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28(2): 343-348.

Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4704-4707.

Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjoval J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 1983; 270: 119-125.

Cryan JF, Lucki I. 5-HT<sub>4</sub> receptors do not mediate the antidepressant-like behavioral effects of fluoxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol* 2000; 409: 295-299.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(5): 238-245.

Cussons AJ, Bhagat CI, Fletcher SJ, Walsh JP. Brown-Séquard revisited: a lesson from history on the placebo effect of androgen treatment. *Med J Aust* 2002; 177(11-12): 678-679.

Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18(6): 601-607.

Dabbs JM, Hargrove MF. Age, testosterone and behavior among female prison inmates. *Psychosom Med* 1996; 59: 477-480.

Dalton K. Successful prophylactic progesterone for idiopathic postnatal depression. *Int J Prenatal Perinatal Stud* 1989; 323-7.

Davies RH, Harris B, Thomas DR, Cook N, Read G, Riad-Fahmy D. Salivary testosterone levels and major depressive illness in men. *Br J Psychiatry* 1992; 161: 629-632.

Delgado PL, Charney DS, Price LH, Aghajanian GK, Landis H, Heninger GR. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action: Reversal of antidepressant induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Arch Gen Psychiatry* 1990; 47: 411-418.

Delhez M, Hansenne M, Legros JJ. Andropause and psychopathology: minor symptoms rather than pathological ones. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 863-874.

Detke MJ, Rickels M, Lucki Y. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berlin)* 1995; 121 (1):66-72.

Detke MJ, Jonson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol* 1997; 5(2): 107-112.

Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res* 1996, 73(1-2): 43-46.

Dolan M, Anderson IM, Deakin JFW. Relationship between 5-HT function and impulsivity and aggression in male offenders with personality disorders. *Br J Psychiatry* 2001; 178: 352-359.

Dong Q, Salva A, Sottas CM, Niu E, Holmes M, Hardy MP. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J Androl* 2004; 25(6): 973-981.

Dougherty DM, Bjork JM, Moeller FG, Swann AC. The influence of menstrual-cycle phase on the relationship between testosterone and aggression. *Physiol Behav* 1997; 62(2): 431-435.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54: 597-606.

Duncan GE, Knapp DJ, Carson SW, Breese GR. Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress- and fluoxetine-induced secretion of corticosterone and progesterone. *Pharmacol Exp Ther* 1998; 285(2): 579-587.

Engel J, Ahlenius S, Almgren O, Carlsson A, Larsson K, Sodersten P. Effects of gonadectomy and hormone replacement on brain monoamine synthesis in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 10: 149-154.

Epperson CN, Wisner KL, Yamamoto B. Gonadal steroids in the treatment of mood disorders. *Psychosom Med* 1999; 61(5):676-97.

Eser D, Schule C, Romeo E, Baghai TC, di Michele F, Pasini A, Zwanzger P, Padberg F, Rupprecht R. Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids in depression and anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 1-15, en prensa.

Espejo EF, Miñano FJ. Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. *Neuroscience* 1999; 88: 609-615.

Estrada-Camarena E, Contreras CM, Saavedra M, Luna-Baltazar I, López-Ruvalcaba C. Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST). *Behav Brain Res* 2002; 134(1-2):175-83.

Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28(5): 830-8.

FDA Public Health Advisory. Worsening depression and suicidality in patients being treated with antidepressant medications. Marzo 22, 2004a.

FDA Public Health Advisory. Suicidality in Children and Adolescents Being Treated With Antidepressant Medications. Octubre 15, 2004b.

Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 589-598.

Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L. Orchidectomy sensitizes male rats to the action of diazepam on burying behavior latency: role of testosterone. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 473-479.

Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L. Anxiolytic-like actions of testosterone in the burying behavior test: role of androgen and GABA-benzodiazepine receptors. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30(8): 762-770.

Ferre S, Ciruela F, Canals M, Marcellino D, Burgueno J, Casado V, Hillion J, Torvinen M, Fanelli F, Benedetti PdP, Goldberger SR, Bouvier M, Fuxe K, Agnati LF, Lluís C, Franco R, Woods A. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2004; 10(5): 265-271.

Flugge G, Kramer M, Rensing S, Fuchs E. 5HT1A-receptors and behaviour under chronic stress: selective counteraction by testosterone. *Eur J Neurosci* 1998; 10(8): 2685-2693.

Freeman EW, Sammel MD, Liu L, Gracia CR, Nelson DB, Hollander L. Hormones and menopausal status as predictors of depression in women in transition to menopause. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61(1): 62-70.

Frye CA, Seliga AM. Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2001; 1 (4): 371-381.

Fuller RW, Wong DT. Inhibition of serotonin reuptake. *Fed Proc* 1977; 36: 2154-2158.

Fuller RW, Snoddy HD. Role of norfluoxetine in the inhibition of desipramine metabolism and in the inhibition of serotonin uptake after fluoxetine administration to rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991; 73(1): 31-40.

Galligani N, Renck A, Hansen S. Personality profile of men using anabolic androgenic steroids. *Horm Behav* 1996; 30: 170-175.

Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Rev* 2005; 48(2): 273-86.

Gilbert P, Allan S. The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. *Psychol Med* 1998; 28(2): 585-598.

Gijsman HJ, Cohen AF, van Gerven JMA. The application of the principles of clinical drug development to pharmacological challenge tests of the serotonergic system. *J Psychopharmacol* 2004; 18(1):7-13.

Goodyer IM, Hebert J, Tamplin A, Altham PME. Recent life events, cortisol, dehydroepiandrosterone and the onset of major depression in high-risk adolescents. *Br J Psychiatry* 2000; 177: 499-504.

Goodyer IM, Park RJ, Netherton CM, Herbert J. Possible role of cortisol and dehydroepiandrosterone in human development and psychopathology. *Br J Psychiatry* 2001; 179: 243-249.

Graham CA, Ramos R, Bancroft J, Maglaya C, Farley TMM. The effects of steroidal contraceptives on the well-being and sexuality of women: a double-blind, placebo-controlled, two-center study of combined and progestogen-only methods. *Contraception* 1995; 52: 363-369.

Griffin LD, Mellon SH. Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(23): 13512-13517.

Grigoriadis S, Kennedy SH, Bagby RM. A comparison of antidepressant response in younger and older women. *J Clin Psychopharmacol* 2003; 23(4):405-407.

Hajós M, Gartside SE, Sharp T. Inhibition of medial and dorsal raphe neurons following administration of selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351: 624-629.

Halbreich U, Petty F, Yonkers K, Kramer GL, Rush AJ, Bibi KW. Low plasma gamma-aminobutyric acid levels during the late luteal phase of women with premenstrual dysphoric disorder. *Am J Psychiatry* 1996; 718-719.

Hamilton JA, Alagna SW, Pinkel S. Gender differences in antidepressant and activating drug effects on self-perceptions. *J Aff Dis* 1984; 7: 235-243.

Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002; 16(10): 2181-2187.

Hengge UR. Testosterone replacement for hypogonadism: clinical findings and best practices. *AIDS Read* 2003; 13 (Suppl 12): 15-21.

Hilakivi LA, Lister RG. Correlations between behavior of mice in Porsolt's swim test and in tests of anxiety, locomotion and exploration. *Behav Neu Biol* 1990; 53:153-159.

Hirani K, Khisti RT, Chopde CT. Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1339-1350.

Hochberg Z, Pacak K, Chrousos GP. Endocrine Withdrawal Syndromes. *Endocrine Reviews* 2003; 24: 523-538.

Hohlagschwandtner M, Husslein P, Klier C, Ulm B. Correlation between serum testosterone levels and peripartal mood status. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80: 326-330.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Estadísticas de intentos de suicidio y suicidio. Cuaderno Número 8. Edición 2002. Pag 22. México.

Jakab RL, Leranath C. Septum. En: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2a ed. Australia: Academic Press; 1995. vol 4: 4055-442.

Jakab RL, Harada N, Naftolin F. Aromatase-(estrogen synthetase) immunoreactive neurons in the rat septal area. A light and electron microscopic study. *Brain Res* 1994; 664: 85-93.

Jick H, Kaye JA, Jick SS. Antidepressants and the risk of suicidal behaviors. *JAMA* 2004; 292(3): 338-343.

Kaergaard A, Hansen AM, Rasmussen K, Andersen JH. Association between plasma testosterone and work-related neck and shoulder disorders among female workers. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26(4): 292-298.

Kane FJ Jr. Evaluation of emotional reactions to oral contraceptive use. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126: 968-972.

Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder. *Neurosci Res* 2001; 40: 105-113.

Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 152-156.

Kelly JS, Larkman P, Penington NJ, Rainnie DG, McAllister-Williams H, Hodgkiss J. Serotonin receptor heterogeneity and the role of potassium channels in neuronal excitability. *Adv Exp Med Biol* 1991; 287: 177-191.

Kendall DA, Stancel GM, Enna SJ. The influence of sex hormones on antidepressant-induced alterations in neurotransmitter receptor binding. *J Neurosci* 1982; 2(3): 354:360.

Kendell SF, Krystal JH, Sanacora G. GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9(1): 153-168.

Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS. The epidemiology of major depressive disorder. Results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003; 289(23): 3095-3105.

Kirby LG, Allen AR, Lucki I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid. *Brain Res* 1995; 682(1-2): 189-196.

Kirby LG, I Lucki. Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282(2): 967-976.

Kirkham C, Hahn PM, Van Vugt DA, Carmichael JA, Reid RL. A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial to assess the side effects of medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 93-97.

Klaiber EL, Broverman DM, Vogel W, Kobayashi Y. Estrogen therapy for severe persistent depressions in women. *Arch Gen Psychiatry* 1979; 36: 550-554.

Klaiber EL, Broverman DM, Vogel W, Peterson LG, Snyder MB. Relationships of serum estradiol levels, menopausal duration, and mood during hormonal replacement therapy. *Psychoneuroendocrinology* 22(7):549-58. 1997

Komstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, Gelenberg AJ, Davis SM, Harrison WM, Keller MB. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 1445-1452.

Kritzer M. The distribution of immunoreactivity for intracellular androgen receptors in the cerebral cortex of hormonally intact adult male and female rats: localization in pyramidal neurons making corticocortical connections. *Cereb Cortex* 2004; 14(3):268-80.

Kuteeva E, Hokfelt T, Ogren SO. Behavioural characterisation of young adult transgenic mice overexpressing galanin under the PDGF-B promoter. *Reg Pep* 125: 67- 78, 2005.

Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte A M, Hammon M, Lanfumey L. Early desensitization of somato-dendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in rat treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 352: 141–148.

Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Shors TJ. Males and females respond differently to controllability and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 2004; 56(12): 964-970.

Li Q, Muma NA, Van De Kar LD. Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors: reductions in hypothalamic and midbrain Gi and G(o) proteins and in neuroendocrine responses to a 5-HT<sub>1A</sub> agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 1035–1042.

Lucki Y, Wieland S. 5-Hydroxytryptamine receptors and behavioral responses. *Neuropsychopharmacology* 1990; 3: 481-493.

Martínez-Mota L, Contreras CM, Saavedra M. Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Arch Med Res* 1999; 30(4): 286-289.

Martínez-Mota L, Fernández-Guasti A. Testosterone-dependent antidepressant-like effect of noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 78: 711-718.

Marván ML, Santana S, Chávez L, Bertran M. Inescapable shocks accentuate fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. *Arch Med Res* 1997; 28(3): 369-372.

Mazur A, Lamb TA. Testosterone, status and mood in human males. *Horm Behav* 1980; 14: 236-246.

McCaul KD, Gladue BA, Joppa M. Winning, losing, mood and testosterone. *Horm Behav* 1992; 26: 486-504.

McGinnis, Montana RC, Lumia AR. Effects of hydroxyflutamide in the medial preoptic area or lateral septum on reproductive behaviors in male rats. *Brain Res Bull* 2002; 59(3): 223-234.

Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 1999; 51(1): 63-81.

Miller MA, Urban JH, Dorsa DM. Steroid dependency of vasopressin neurons in the bed nucleus of the stria terminalis by in situ hybridization. *Endocrinology* 1989; 125(5): 2335-2340.

Morrison MF. Androgens in the elderly: will androgen replacement therapy improve mood, cognition and quality of life in aging men and women. *Psychopharmacol Bull* 1997; 33(2): 293-296.

Morrow AL, Suzdak PD, Paul SM. Steroid hormone metabolites potentiate GABA receptor-mediated chloride ion flux with nanomolar potency. *Eur J Pharmacol* 1987; 142: 483-482.

Mulchahey JJ, Ekhtor NN, Zhang H, Kasckow JW, Baker DG, Geraciotti TD Jr. Cerebrospinal fluid and plasma testosterone levels in post-traumatic stress disorder and tobacco dependence. *Psychoneuroendocrinology* 2001; 26(3): 273-285.

Murray JF, Dakin CL, Siddiqui A, Pellatt LJ, Ahmed S, Ormerod LJ, Swan AV, Davies DC, Wilson CA. Neonatal 5HT activity antagonizes the masculinizing effect of testosterone on the luteinizing hormonal release response to gonadal steroids and on brain structures in rats. *Eur J Neurosci* 2004; 19(2): 387-395.

Nechmad A, Maayan R, Spivak B, Ramadan E, Poyurovsky M, Weizman A. Brain neurosteroid changes after paroxetine administration in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 327-332.

Nemeroff BC. The neurobiology of depression. *Scientific American* 1998; 278(6): 28-35.

Novák A, Brod M, Elbers J. Andropause and quality of life: findings from patient focus groups and clinical experts. *Maturitas* 2002; 43: 231- 237.

Obminski Z, Wojtkowiak M, Stupnicki R, Golec L, Hackney AC. Effect of acceleration stress on salivary cortisol and plasma cortisol and testosterone levels in cadet pilots. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48(2): 193-200.

Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol* 1954; 47: 419-427.

Oppenheim G. A case of rapid mood cycling with estrogen: implications for therapy. *J Clin Psychiatry* 1984; 45:34-35.

Orsini JC. Hypothalamic neurons responsive to increased plasma level of testosterone in the male rat. *Brain Res* 1981; 212(2): 489-493.

Páez X, Hernández L, Baptista T. Avances en la terapéutica molecular de la depresión. *Rev Neurol* 2003; 37(5): 459-470.

Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacol* 1999; 147: 162-167.

Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying and forced-swim tests in WKY rats. *Physiol Behav* 1994; 55(3): 433-439.

Paxinos G, Watson CH. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1982.

Pearson-Murphy BE, Ghadirian AM, Dhar V. Neuroendocrine responses to inhibitors of steroid biosynthesis in patients with major depression resistant to antidepressant therapy. *Can J Psychiatry* 1998; 43: 279-286.

Pelkonen M, Marttunen M, Pulkkinen E, Koivisto AM, Laippala P, Aro H. Excess mortality among former adolescent male out-patients. *Acta Psychiatr Scand* 1996; 94: 60-66.

Perry PJ, Yates WR, Andersen KH. Psychiatric symptoms associated with anabolic steroids: a controlled retrospective study. *Ann Clin Psychiatry* 1990; 2: 11-17.

Peterson SL. *Drug microinjection in discrete brain regions*. KOPF CARRIER, 1998.

Pfaff D. Autoradiographic localization of radioactivity in rat brain after injection of tritiated sex hormones. *Science* 1968; 161: 1355-1356.

Pinna G, Costa E, Guidotti A. Changes in brain testosterone and allopregnanolone biosynthesis elicit aggressive behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(6): 2135-2140.

Pope HG, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry* 1988; 145: 487-490.

Pope HG, Katz DL. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use: a controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51(5): 375-382.

Pope HG, Kouri EM, Hudson JI. Effects of supraphysiologic doses of testosterone on mood and aggression in normal men: a randomized controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(2): 133-140.

Porsolt RD, Lenegre A, McArthur RA. Pharmacological models of depression. En: Oliver B, Mos J, Slagen JL, editores. *Animal models in psychopharmacology*. Switzerland: Birkhäuser Verlag; 1991. pp. 137-159.

Porsolt R, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: an animal model sensitive to antidepressants. *Nature* 1977; 266: 730-732.

Price LH, Goddard AW, Barr LC, Goodman WK. Pharmacological Challenges in Anxiety Disorders. *Psychopharmacology-The Fourth Generation of Progress*, 2004. Disponible en: <http://www.acnp.org/g4/GN401000126/Default.htm>

Rachman IM, Unnerstall IM, Pfaff DW, Cohen RS. Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13941-13946.

Ravizza T, Galanopoulou AS, Veliskova J, Moshe SL. Sex differences in androgen and estrogen receptor expression in rat substantia nigra during development: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 2002; 115(3): 685-696.

Renner JP, Lucki I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 1998; 136(2): 190-197.

Ripley HS, Shorr E, Papanicolaou GN. The effect of treatment with depression in the menopause with estrogenic hormone. *Am J Psychiatry* 1940; 96: 905-914.

Robel P, Baulieu EE. Neuro-steroids: 3 $\beta$ -hydroxy-  $\Delta^5$  derivatives in the rodent brain. *Neurochem Int* 1985; 7: 953-958.

Rodríguez-Landa JF, Contreras CM. Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Arch Neurocién (Mex)* 2000; 5(2): 74-83.

Rohr UD. The impact of testosterone imbalance on depression and women's health. *Maturitas* 2002; 41(Suppl 1): 25-46.

Romeo E, Pompili E, di Michele F, Pace M, Rupprecht R, Bernardi G, Pasinib A. Effects of fluoxetine, indomethacine and placebo on 3 alpha, 5 alpha tetrahydroprogesterone (THP) plasma levels in uncomplicated alcohol withdrawal. *World J Biol Psychiatry* 2000; 1(2): 101-104

Roselli CE, Resko JA. Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61(3-6): 365-374.

Rossi A, Barraco A, Donda P. Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Ann Gen Hosp Psychiatry* 2004; 3(1): 2.

Roy A, De Jong J, Linnoila M. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46: 609-612.

Rutter JJ, Auerbach SB. Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 1319-1324.

Rutter JJ, Gundlach C, Auerbach SB. Systemic uptake inhibition decreases serotonin release via somatodendritic autoreceptor activation. *Synapse* 1995; 20: 225-233.

Sachar EJ, Baron M. The biology of affective disorders. *Ann Rev Neurosci* 1979; 2: 505-518.

Salvador A, Moya-Albiol L, Martinez-Sanchis S, Simon VM. Lack of effects of anabolic-androgenic steroids on locomotor activity in intact male mice. *Percept Mot Skills* 1999; 88(1): 319-328.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiat* 1965; 122(5): 509-522.

Schmidt PJ, Daly RC, Bloch M, Smith MJ, Danaceau MA, St Clair LS, Murphy JH, Haq N, Rubinow DR. Dehydroepiandrosterone monotherapy in midlife-onset major and minor depression. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62(2):154-62.

Schneider LS, Small GW, Hamilton SH, Bystritsky A, Nemeroff CB, Meyers BS. Estrogen replacement and response to fluoxetine in a multicenter geriatric depression trial. *Am J Geriatr Psychiatry* 1997; 5: 97-106.

Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJ, Garcia-Segura LM, Lambert JJ, Mayo W, Melcangi RC, Parducz A, Suter U, Carelli C, Baulieu EE, Akwa Y. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol* 2003; 71(1): 3-29.

Schweiger U, Deuschle M, Weber B, Kömer A, Class-Hinrich L, Schmider J, Gotthardt U, Heuser I. Testosterone, gonadotropin and cortisol secretion in male patients with major depression. *Psychosom Med* 1999; 61: 292-296.

Seidman SN, Rabkin JG. Testosterone replacement therapy for hypogonadal men with SSRI-refractory depression. *J Affect Disord* 1998; 48(2-3): 157-161.

Sharp PE, LaRegina MC, editores. *The laboratory rat*. Florida: CRC Press; 1998. p. 11.

Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Rev* 2004; 46: 71- 117.

Sheng Z, Kawano J, Yanai A, Fujinaga R, Tanaka M, Watanabe Y, Shinoda K. Expression of estrogen receptors (alpha, beta) and androgen receptor in serotonin neurons of the rat and mouse dorsal raphe nuclei; sex and species differences. *Neurosci Res* 2004; 49(2): 185-196.

Sherwin BB, Gelfand MM. Sex steroids and affect in the surgical menopause: A double-blind, cross-over study. *Psychoneuroendocrinology* 1985; 10: 325-335.

Shores MM, Sloan KL, Matsumoto AM, Mocerri VM, Felker B, Kivlahan DR. Increased incidence of diagnosed depressive illness in hypogonadal older men. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61(2): 162-7.

Simmerly RB, C Chang, M Muramatsu, LW Swanson. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* 1990; 249: 76-95.

Simon JA. Safety of estrogen/androgen regimens. *J Reprod Med* 2001; 46 (Suppl 3): 281-290.

Simon NG, Cologer-Clifford A, Lu S, McKenna SE, Hu S. Testosterone and its metabolites modulate 5HT1A and 5HT1B agonist effects on intermale aggression. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23: 325-336.

Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 281-292.

Skerrit U, Evans R, Montgomery SA. Selective serotonin reuptake inhibitors in older patients. *Drug Aging* 1997; 10(3): 209-218.

Skuza G, Rogóz Z. Sigma1 receptor antagonists attenuate antidepressant-like effect induced by co-administration of 1,3 di-o-tolylguanidine (DTG) and memantine in the forced swimming test in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 1149-1152.

Slob AK, Huizer T, Van der Werff TBJJ. Ontogeny of sex differences in open-field ambulation in the rat. *Physiol Behav* 1986; 37(2): 313-315.

Sommerville EM, Tarttelin MF. Plasma testosterone levels in adult and neonatal female rats bearing testosterone-filled silicone elastomer capsules for varying periods of time. *J Endocrinol* 1983; 98(3): 365-371.

Spivak B, Maayan R, Mester R, Weizman A. Plasma testosterone levels in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Neuropsychobiology* 2003; 47(2): 57-60.

Stalenheim EG, Eriksson E, Von Knorring L, Wide L. Testosterone as a biological marker in psychopathy and alcoholism. *Psychiatry Res* 1998; 77: 79-88.

Stembach H. Age-associated testosterone decline in men: clinical issues for psychiatry. *Am J Psychiatry* 1998; 155(10): 1310-1318.

Stoffel EC, Craft RM. Ovarian hormone withdrawal-induced "depression" in female rats. *Physiol Behav* 2004; 83: 505-513.

Stoffel-Wagner B. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 669-679.

Su TP, Pagliaro M, Schmidt PJ, Picar D, Wolkowitz O, Rubinow DR. Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. *JAMA* 1993; 269(21): 2760-2764.

Suga S, Sakuma Y. Dihydrotestosterone-sensitive neurons in the male rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res Bull* 1994; 33: 205-210.

Tabori NE, Stewart LS, Znamensky V, Romeo RD, Alves SE, McEwen BS, Milner TA. Ultrastructural evidence that androgen receptors are located at extranuclear sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 2005; 130(1): 151-163.

Träskmann L, Åsberg M, Bertilsson L, Sjöstrand L. Monoamine metabolites in CSF and suicidal behavior. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38: 631-636.

T'sjoen GG, De Vos S, Goemaere S, Van Pottelberg I, Dierick M, Van Heeringen C, Kaufman JM. Sex steroid levels, androgen receptor polymorphism, and depressive symptoms in healthy elderly men. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53(4): 636-642.

Uphouse L, Salamanca S, Caldarola-Pastuszka M. Gender and estrous cycle differences in the response to the 5HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40: 901-906.

Uzunov DP, Coopert TB, Costa E, Guidorri A. Fluoxetine-elicited changes in brain neurosteroid content measured by negative ion mass fragmentography. *Neurobiology* 1996; 93: 12599-12604.

Uzunova V, Sheline Y, Davis JM, Rasmusson A, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(6): 3239-3244.

Veiga S, García-Segura LM, Azcoitia L. Propiedades de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. *Rev Neurol* 2004; 39: 1043-1051.

Velázquez-Moctezuma J, Díaz-Ruiz O. Neonatal treatment with clomipramine increased immobility in the forced swim test: an attribute of animal models of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 42(4): 737-739.

Wetzel CHR, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Ziegglänsberger W, Holsboer F, Rupprecht R. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol* 1998; 12(9): 1441-1451.

Wieland S, Lucki I. Antidepressant-like activity of 5HT1A agonist measured with the forced swim test. *Psychopharmacology* 1990; 101: 497-504.

Willner P, Muscat R. Animal models for investigating the symptoms of depression and the mechanisms of action of antidepressant drugs. En: Oliver B, Mos J, Slagen JL, editores. *Animal models in psychopharmacology*. Switzerland: Birkhäuser Verlag; 1991. pp. 183-198.

Willner P. Animal models of depression. En: Den Boer JA, Ad Sitsen JM, editores. Handbook of depression and anxiety. A Biological Approach. New York: Marcel Dekker,; 1994. pp. 291-316.

Wood RL, Newman SW. Androgen receptor immunoreactivity in the male and female Syrian hamster brain. *J Neurobiol* 1999; 39(3): 359-370.

Xiao L, Jordan CL. Sex differences, laterality, and hormonal regulation of androgen receptor immunoreactivity in rat hippocampus. *Horm Behav* 2002; 42(3): 327-336.

Yadin E, Thomas E, Grishkat H, Strickland C. The role of lateral septum in anxiolysis. *Physiol Behav* 1993; 53: 1077-1083.

Yadin E, Thomas E. Septal correlates of conditioned inhibition and excitation in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1981; 95(2): 331-340.

Yamada N, Takahashi S. Methods of assessing circadian rhythms in animal models of affective disorders. En: Boulton AA, GB Baker, MT Martin-Iverson, editores. *Neuromethods 19. Animal models in psychiatry II*. New Jersey: Humana Press, Clifton; 1991. pp. 115-146.

Yamada Y. Effects of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. *Brain Res* 1979; 172: 165-168.

Yates G, Panksepp J, Ikemoto S, Nelson E, Conner R. Social isolation effects on the "behavioral despair" forced swimming test: effect of age and duration of testing. *Physiol Behav* 1991; 49(2): 347-353.

Yates WR, Perry P, Murray S. Aggression and hostility in anabolic steroid users. *Biol Psychiatry* 1992; 31: 1232-1234.

Yates W. Testosterone in psychiatry: risks and benefits. *Arch Med Psychiatr* 2000; 57(2): 155.

Young WJ, Chang C. Ontogeny and autoregulation of androgen receptor mRNA expression in the nervous system. *Endocrine* 1998; 9(1): 79-88.

Zhang L, Ma W, Barker L, Rubinow DR. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience* 1999; 94: 251-259.

Zoli M, Agnati LF, Hedlund PB, Li XM, Ferre S, Fuxe K. Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells. *Mol Neurobiol* 1993; 7(3-4): 293-334.

Zolman JF. *Biostatistics. Experimental design and statistical inference*. New York: Oxford University Press; 1993. pp. 25-30, 137.

Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 1999; 140: 3843-3852.

Zurrow MC, Yochim JM, McCarthy JL. *Experimental endocrinology. A source book of basic techniques.* New York: Academic Press; 1964. p. 125.

## APÉNDICE

Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, **Bernal-Morales B**. The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. *Journal of Psychopharmacology* 2001; 15(4): 231-236.

## The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat

Carlos M. Contreras, Juan Francisco Rodríguez-Landa, Ana G. Gutiérrez-García and Blandina Bernal-Morales

Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neurociología, Universidad Veracruzana and Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Xalapa, Veracruz, México.

The administration of a relatively high dose of antidepressant drugs produces an increased neuronal firing rate of the lateral septal nucleus (LSN) in the rat and a decreased immobility in rats forced to swim. However, it is unknown whether a minimally effective low-dose 21-day treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, while reducing immobility in the forced swim test, also increases the neuronal firing rate of the LSN in Wistar rats. The total time of immobility decreased with a daily injection of 0.5, 1.0 or 2.0 mg/kg of fluoxetine ( $p < 0.001$ ), and the lowest dose increasing the latency to the first immobility period ( $p < 0.0001$ ) was 1.0 mg/kg. Therefore, the action of the 21-day fluoxetine treatment (1.0 mg/kg) on the firing rate of LSN neurones was tested in another group of rats. A total amount of 78 single-unit extracellular recordings was taken from the LSN of eight control rats ( $n = 40$ ) and eight fluoxetine treated rats ( $n = 38$ ). The LSN firing rate in the fluoxetine group was double ( $18.3 \pm 2.5$  spikes per 10 s,  $p < 0.05$ ) that in the control group ( $7.0 \pm 0.9$  spikes per 10 s), and the first order interval of firing proved to be significantly lower in the fluoxetine group compared to the control group ( $384.3 \pm 22.3$  and  $639.7 \pm 27.5$  ms, respectively;  $p < 0.05$ ). In conclusion, the increased neuronal firing rate of the LSN in the animals treated with a low dose of fluoxetine may be associated with an increased motivation to escape from the stressful situation that the forced swim represents.

**Key words:** antidepressants; fluoxetine; forced swim test; immobility; lateral septal nucleus; serotonin reuptake inhibitors

### Introduction

A decrease in the neuronal firing rate of the lateral septal nucleus (LSN) is associated with emotional states characterized by anxiety and fear; namely during the anticipation of an aversive stimulus (Thomas, 1988; Thomas *et al.*, 1991; Yadin *et al.*, 1993); although the delivery of positive reinforcers increases its neuronal firing rate (Yadin and Thomas, 1981) and the electric stimulation of the LSN may be used as a conditioning stimulus (Knowlton and Thompson, 1989). Herein, the neuronal firing rate in the LSN increases after the acute administration of several clinically effective antidepressants, such as clomipramine, isocarboxazid, trazodone, or even sleep deprivation and electroshock (Contreras *et al.*, 1989, 1993b), and this increase reaches maximum values in the firing rate after 2 weeks of treatment with a relatively low dose of clomipramine (1.25 mg/kg; twice a day) (Contreras *et al.*, 1990). Therefore, the neuronal activity of the LSN is related to motivational aspects of behaviour (Thomas, 1988; Gogate *et al.*, 1995). For example, the neurones from both the dorsal and intermediate aspects of the LSN increase their firing rate during the

oestral phases of the rat characterized by plasmatic high levels of gonadal hormones, concurrently with low immobility rates in the forced swim test (Contreras *et al.*, 2000). However, there is a scarcity of studies associating neuronal activity with well-defined behavioural tests used to explore antidepressant actions.

Immobility in rats forced to swim decreases after the administration of diverse clinically effective antidepressants (Porsolt *et al.*, 1977; Borsini and Meli, 1988); suggesting an increased motivation to escape from the constraining situation that swimming represents. In particular, desipramine (20 mg/kg, subacute dose) decreases immobility in the forced swim test (Porsolt *et al.*, 1977) and a low (2.14 mg/kg), long-term (21 days) dose increases the firing rate of the LSN neurones (Molina *et al.*, 1996). There is a possible relationship between an increased neuronal firing rate of the LSN and decreased immobility in the forced swim test associated with the administration of antidepressants.

Noticeably, data from single unit recordings and the forced swim test have been obtained from drugs that were not selected with respect to their actions on specific neurotransmission systems, and the dose commonly used seems to be relatively high (regularly

10 mg/kg). In this sense, fluoxetine is a clinically effective (Skerrit *et al.*, 1997) selective serotonin reuptake inhibitor (Fuller and Wong, 1977), which decreases immobility in animals forced to swim (Detke *et al.*, 1997; Kirby and Lucki, 1997; Reneric and Lucki, 1998). However, it is unknown whether the fluoxetine dose that reduces immobility in the forced swim test also increases the neuronal firing rate of the LSN as reported for other non-specific antidepressants (Conreras *et al.*, 1989, 1990). Therefore, in the present study, we determined the minimal effective fluoxetine dose that decreases the immobility in the forced swim test to define its actions on the firing rate of the LSN neurones.

## Methods

### Animals

We used 51 male Wistar rats, aged 3 months and weighing 300–350 g at the beginning of the study. The animals lived in housing facilities in Plexiglass cages (six animals per cage), at an average temperature of 25 °C ( $\pm 1$  °C) and *ad libitum* access to water and food, with an artificial light/dark cycle of 12/12 h (light on at 07.00 h). All experiments were carried out in accordance with the guide for care and use of laboratory animals issued by the National Institutes of Health.

### Behaviour

The effect of 21-day fluoxetine administration (intracapsophageal route) on immobility in the forced swim test was evaluated in 35 rats. Four groups of rats ( $n = 7$ , each group) received 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0 mg/kg of fluoxetine (Prozac, Ely Lilly Compañía de México, SA de CV México, DF) and a fifth group (control,  $n = 7$ ) received vehicle (saline solution). All treatments were administered once a day during 21 days (08.00 h), at a volume equivalent to 0.5 ml per 300 g, through a displaceable sterilized intracapsophageal polyethylene cannula (S-54-HL Cole-Parmer Co, Vernon Hills, IL, USA: 4 cm long  $\times$  1.0 mm diameter), coupled to a disposable syringe (B-D Plastipak, Becton Dickinson and Co, México). The behavioural tests were carried out between 09.00 h and 11.00 h.

### Open field test

Given that locomotor activity may influence immobility in the forced swim test (Wieland and Lucki, 1990), on the 20th and 21st days, 1 h after saline or fluoxetine administration, all the rats were individually submitted to a 5-min videotaped open field test. Only data coming from the second session were statistically evaluated, since the first session was used for habituation to the novel situation. We used an opaque Plexiglass cage (44  $\times$  33 cm) with walls 20-cm in height. The floor was divided into 12 squares (11  $\times$  11 cm). At the beginning of the test, the animals were gently placed in one of the corners of the cage. The number of times that an animal crossed any square with its four paws (crossing) was evaluated. After each test, the cage was carefully cleaned with a solution containing ammoniac 0.5%, ethanol 15%, extran 10%, isopropanol 5%, pinol 10% and water 59%.

### Forced swim test

Immediately after the first-habituation open field test, i.e. on the 20th day of fluoxetine or saline treatment, the rats were submitted to a 15-min pretest forced swim session, during which the animals

confronted a new emergency situation represented by swimming. This allowed us to assure the development of immobility. Each rat was individually placed in a rectangular pool (30  $\times$  50  $\times$  60 cm) containing water (25 °C) ( $\pm 1$  °C), 23 cm in depth. Afterwards, the animals were removed from the water and dried under a lamp. On the 21st day of treatments, in a 5-min videotaped test session, they were forced to swim again. Two independent observers assessed the total duration of immobility and the latency to the first immobility period in videotaped sessions. Immobility was assumed when the rat touched the bottom of the pool making at least two points of contact, i.e. with one or both hindpaws or the tail; or when it floated, making only the movements necessary to maintain its head above the surface of the water, but without any displacement. For statistical analysis, only those results coming from the test session were taken into account.

The data obtained from locomotor activity and the forced swim test were analysed through the one-way ANOVA test for independent groups, and Dunnett's test was applied *post hoc* when the differences reached  $p < 0.05$ . In order to determine whether the actions of fluoxetine differences in the locomotor activity and the forced swim test are related, a possible correlation between crossing in the open field and immobility in the forced swim test was also explored (Pearson's test).

The fluoxetine dose for the study of the spontaneous single-unit extracellular activity of the LSN was selected from this behavioural experiment.

### Electrophysiology

We included two more groups of rats; one group received (intracapsophageally) 1.0 mg/kg (0.5 ml per 300 g) of fluoxetine ( $n = 8$ ) and the other group, the vehicle (saline solution,  $n = 8$ ), during 21 days at 08.00 h. On the 21st day, 1 h after the last administration of saline or fluoxetine, the animals received an initial injection of 1 g/kg of ethyl carbamate (Urethane, i.p.), followed by one-tenth of this dose every 60 min to sustain deep anaesthesia. The head of the animal was fixed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) with the incisor bar set at  $-5.0$  mm. A midline incision uncovered the skull, and through a small trephination, a glass micropipette filled with NaCl 1 M (4–5 M $\Omega$ ) was descended through an hydraulic micromanipulator (Trent Wells, Inc. So. Gate, CA, USA) towards the dorsal and intermediate aspects of the lateral septal nucleus in the following stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1982): AP =  $-0.2$  mm from bregma, L = 0.5 mm from midline and from 3.00–5.00 mm beneath the surface of the cerebral cortex. The spontaneous single-unit extracellular activity captured by the micropipette was sent to an amplifier (Grass 7P511L, Quincy, MA, USA) with filters set at 300 Hz and 3 kHz, connected in parallel to an audio amplifier and to an oscilloscope (Tektronix 5111A, Inc., Beaverton, OR, USA), which received a filtered signal free from background noise through a window discriminator. Each recorded spike coming from the amplifier fed a Grass S88 stimulator which delivered squared pulses of constant amplitude and duration (0.6 ms, 4 V) to the serial port of a PC provided with software designed for the analysis of the firing rate. A criterion of at least 5 min without sudden changes in the firing rate and in the spike amplitude was considered to indicate the stabilization of single-unit extracellular activity. The firing rate was then analysed on-line for 9 min, and the software delivered firing rate histograms, mean and standard

**Table 1** The values represent the mean ( $\pm$  SE) of the crossing of the animals during the 5-min test

Control	Fluoxetine (mg/kg)			
	0.25	0.5	1.0	2.0
33.9 $\pm$ 3.5	30.7 $\pm$ 5.9	24.1 $\pm$ 4.4	18.3 $\pm$ 2.9*	12.1 $\pm$ 2.1*

\* $p < 0.05$  versus control group, Dunnett test.

error of firing rate (10 s epochs), mean firing interval and the variation coefficient (the standard deviation divided by the mean firing rate). Given that we used electrodes with relatively low impedance, in some instances, we picked-up more than one neurone and, in such cases, two criteria were used to discriminate between the signals: (i) the recording taken from two or more neurones fired with different size, but also different regularity, in which case a window discriminator allowed the choosing of only one neurone for recording; and (ii) by descending the micropipette at least 100  $\mu$ m apart from the previous registered neurone to ensure different fields of recording.

At the end of the experiment, the last recorded site was marked by direct current (3 min each polarity). The rat was then perfused intracardially with 50 ml of saline solution (0.9%), followed by 50 ml of formaldehyde (20%). The brain was removed, and frozen sections were cut (40  $\mu$ m) using a cryocut microtome (LEICA-JUNG, Nussloch, West Germany). The Nissl technique allowed the identification of the last recorded point and, with the aid of stereotaxic coordinates, the path followed by the electrode was reconstructed. For analysis of data, we included only those

recordings obtained from the LSN, herein, three recordings from saline and five from fluoxetine groups were discarded.

The neuronal firing rate, the mean firing interval and the variation coefficient were analysed by the Mann-Whitney *U*-test, since the data failed to follow a normal distribution. Only differences attaining  $p < 0.05$  were considered significant and the results are expressed as mean  $\pm$  standard error.

For both immobility in the forced swim test and the LSN neuronal firing rate, individual differences were explored by calculating the percentage of animals or neurones, respectively, corresponding to fluoxetine data surpassing the value of one mean value  $\pm$  1 SD from the saline group.

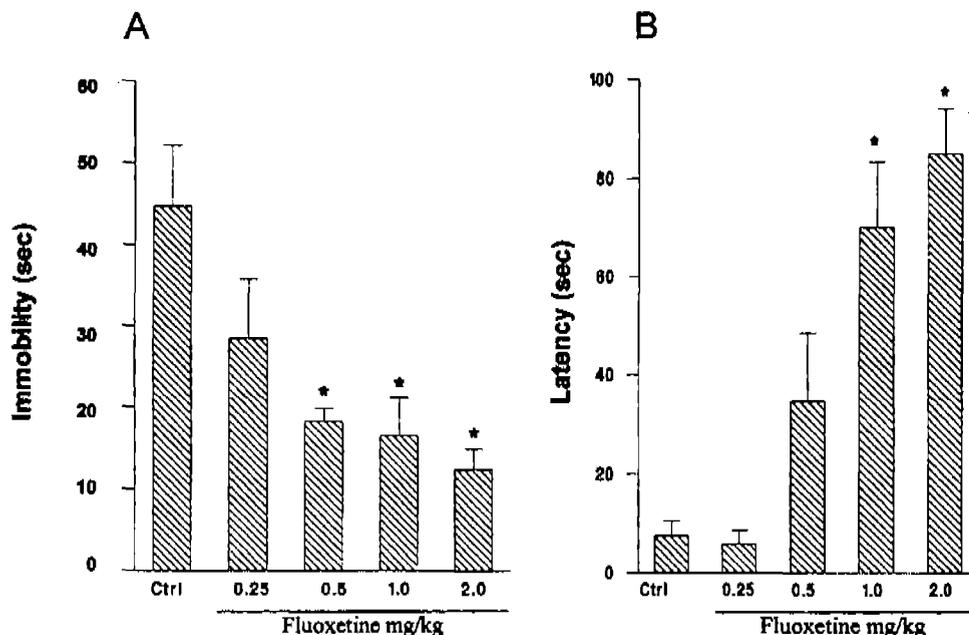
## Results

### Open field test

Fluoxetine significantly [ $F(4,30) = 4.89, p < 0.003$ ] decreased crossing in a dose-dependent manner, and the post-hoc test ( $p < 0.05$ ) indicated that this effect occurred from a dose of 1.0 mg/kg (Table 1).

### Forced swim test

In the forced swim test, fluoxetine decreased the total time of immobility [ $F(4,30) = 6.0, p < 0.001$ ] and increased the latency to the first immobility period [ $F(4,30) = 14.0, p < 0.000$ ] in a dose-dependent manner (Fig. 1). The post-hoc test revealed that 1.0 mg/kg was the lowest effective dose in reducing the total time of immobility and in increasing the latency to the first immobility



**Figure 1** Immobility of fluoxetine-treated animals in the forced swim test. Total time of immobility significantly decreased with 0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg of fluoxetine (a), while 1.0 and 2.0 mg/kg of fluoxetine (b) increased the latency to the first immobility period in a 5-min test; \* $p < 0.05$  against control (Dunnett test). Ctrl, control group

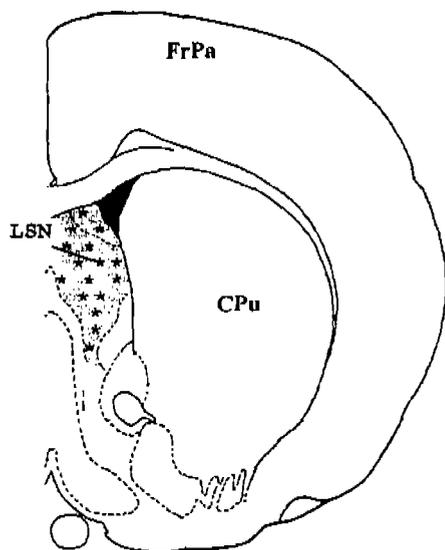


Figure 2 Histological reconstruction of the recorded area in the lateral septal nucleus. Marks represent the single-unit extracellular recording sites; LSN, lateral septal nucleus; Cpu, caudate putamen; FrPa, frontoparietal cortex (Paxinos and Watson, 1982)

period ( $p < 0.05$ ). However, reduced immobility occurred in 29% with the lowest tested dose (0.25 mg/kg), 64% with 0.5 mg/kg, 93% with 1.0 mg/kg and 100% with a dose of 2.0 mg/kg of fluoxetine. The analysis of correlation between crossing in the open field test and immobility in the forced swim failed to produce any significant data ( $r = 0.359$ ). From these results, the dose of 1.0 mg/kg (21 days) was selected for single unit extracellular recording of LSN.

#### LSN firing rate

We obtained 78 single unit extracellular recordings from the LSN (amplitude: 88.7 mV (1.3) at a mean depth of 3.9 mm ( $\pm 0.06$ ) beneath the surface of the cerebral cortex (Fig. 2). From the total amount of recordings, 40 were obtained from the control group ( $n = 8$  rats) and 38 from the group treated during 21 days with 1.0 mg/kg of fluoxetine ( $n = 8$  rats). For a given rat, a mean of 4–5 neurones was recorded.

The effect of the administration of fluoxetine on the LSN neuronal firing rate is shown in Fig. 3. From the histological analysis and the reconstructed path followed by electrodes, the recorded neurones corresponded to the dorsal and intermediate aspects of the LSN (3.0–5.0 mm below cortical surface). The analysis of data revealed that the spontaneous firing rate in the group treated with fluoxetine during 21 days ( $18.3 \pm 2.5$  spikes per 10 s) was significantly greater ( $p < 0.05$ ) compared to the control group treated with saline ( $7.0 \pm 0.9$  spikes per 10 s). The mean first order interval of firing in the group treated with fluoxetine ( $384.3 \pm 22.3$  ms) proved to be significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that of the control group ( $639.7 \pm 27.5$  ms), and no significant changes were found in the variation coefficient between the control group ( $47.6 \pm 1.8\%$ ) and the fluoxetine group ( $53.3 \pm 2.28\%$ ). In spite of this statistical significance, from the fluoxetine group,

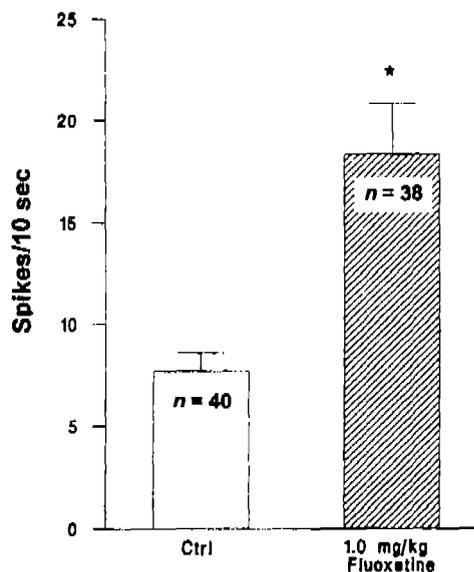


Figure 3 Single-unit extracellular activity of the lateral septal nucleus of the rat treated with 1.0 mg/kg of fluoxetine. Neurones from animals treated with fluoxetine during 21 days increased their firing rate compared to control group (Ctrl); \* $p < 0.05$  Mann-Whitney *U*-test

approximately 65.8% of recorded neurones fired, surpassing the mean ( $\pm 1$  SD) of the saline group but, for all of them, the intermediate aspect of the LSN was identified as the recorded point.

## Discussion

The aim of the present study consisted of defining the action that the minimal 21-day effective dose of fluoxetine in the forced swim test exerts on LSN neuronal activity in an independent groups of rats. The main findings showed that 1.0 mg/kg of fluoxetine decreased the crossing (approximately 50%), decreased the total time of immobility (approximately 50%), increased the latency to the first period of immobility (approximately eight-fold) and increased the LSN firing rate (approximately two-fold).

An increase in locomotor activity may disguise the motivational effects produced by antidepressants, as occurs with stimulants of the central nervous system (Porsolt *et al.*, 1977; Wieland and Lucki, 1990). Our results were not related to any locomotor stimulant action exerted by the antidepressant treatment since, in the open field test, fluoxetine inclusively decreased crossing in a dose-dependent manner. This finding is consistent with other reports stating that the reduced immobility produced by antidepressants is not associated with changes in locomotor activity (Wieland and Lucki, 1990; Contreras *et al.*, 1998).

We applied the forced swim test (Porsolt *et al.*, 1977) with modifications in the size and shape of the pool (30 × 50 × 60 cm, rectangular) and obtained other measurements, such as the latency to the first period of immobility, plus the total time spent in immobility. Using a cylindrical pool with an increased water level (Detke *et al.*, 1995; Detke and Lucki, 1996), fluoxetine (5 and

20 mg/kg; 23.5 h, 5 h and 1 h before the test) was shown to decrease immobility in a modified forced swim test. In our study, a low dose of fluoxetine (1.0 mg/kg; 21 days) significantly reduced immobility in the forced swim test. Our data are consistent with another study in which a fluoxetine or desipramine regimen (1, 2 and 5 mg/kg; 14 days) produced similar results, whereas a subchronic regimen (23.5 h and 1 h before the test) failed to reduce immobility (Detke *et al.*, 1997). It seems therefore that behavioural actions produced by low doses of antidepressants are observed only after a treatment lasting several weeks, which may reflect some adaptive changes at the neuronal receptor level that require some time to become evident (Contreras *et al.*, 1990; Duman *et al.*, 1997).

Immobility in the forced swim test is considered as an indicator that the animal lacks motivation for solving a problem. In consequence, the decrease in immobility produced by diverse antidepressant drugs has been interpreted as an increase in motivation to escape from the stressful situation (Porsolt *et al.*, 1977; Wieland and Lucki, 1990). Besides, the latency to the first period of immobility is proposed as an indicator of the length of the first effort to escape from the stressful situation that the forced swim test represents (Contreras *et al.*, 1998; Espejo and Miñano, 1999). In our study, we found that fluoxetine (1.0 mg/kg, 21 days) significantly increased the latency to the first immobility period, suggesting that fluoxetine increased the effort displayed by the rat to escape from the stressful situation that the forced swimming seems to indicate.

The forced swim test increases the mRNA expression of gene *c-fos* (Cullinan *et al.*, 1995) and increases the glucose consumption (Duncan *et al.*, 1993), mainly in the ventral portion of LSN, but decreases the serotonin extracellular concentrations in the whole of LSN (Kirby *et al.*, 1995). Furthermore, we suppose a relationship between LSN electrical neuronal activity and immobility in the forced swim test, a matter which had not been explored. In this sense, the following data and the present findings could support such assumption.

The reduced immobility in the forced swim test produced by clomipramine is absent in animals submitted to an early lesion to the dorsal and intermediate aspects of the LSN (Contreras *et al.*, 1995). Consistent with this, the fluoxetine dose that reduced immobility and increased the latency to the first period of immobility (1.0 mg/kg, 21 days) significantly increased the LSN neuronal firing rate as well and, consequently, reduced the intervals of firing in a regular manner, as indicated by the constancy of the coefficient of variation. The changes in LSN firing rate were observed mainly in its intermediate portion, in concordance with previous observations (Contreras *et al.*, 1989, 1990, 1995), in a neuronal population that seems to be only slightly affected in regard to an increased expression of *c-fos* activity in stressful situations. Therefore, there appears to be a regional organization of the LSN in which more ventral aspects respond in a differential manner to stress than upper LSN regions. In fact, to explain the pacemakers of theta EEG activity, it must be taken into account that the hippocampus sends fibres to the dorsal aspect of the LSN that possess a dorsoventral circuitry (dorsal, intermediate and ventral aspects) connected with the medial septal region which sends fibres back to the hippocampus (Jakab and Leranth, 1995), which may also explain regional *c-fos* expression and actions of antidepressants.

Antidepressants produce an increased availability of 5-HT in

the synaptic cleft (Duman *et al.*, 1997) and 5-HT reduces the spontaneous activity of LSN neurones (Segal, 1974). The inhibitory effect of 5-HT on the LSN neuronal firing rate is related to an increased conductance of K<sup>+</sup> ions, but the action of 5-HT on IPSP and on afterhyperpolarization may produce excitatory actions in the LSN; therefore, 5-HT actions on LSN neuronal activity seem to be dependent on synaptical input (Jöels *et al.*, 1986; Jöels and Gallagher, 1988). The LSN neurones which increase their firing rate after antidepressant treatments are those which receive an inhibitory input from the hippocampus (Marván *et al.*, 1992) but an excitatory input coming from the dorsal raphe nucleus (Contreras *et al.*, 1993a). The LSN receives inhibitory serotonergic afferences from the dorsal raphe nucleus, the main serotonin reservoir (Dahlstrom and Fuxe, 1964) and serotonin *in situ* diminishes the firing rate in the LSN neurones (Segal, 1974; Jöels and Urban, 1985). Likewise, the systemic application of non-selective or selective serotonin reuptake inhibitors produces a gradual subsensitivity of the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the dorsal raphe nucleus (Fuller and Wong, 1977; Hajós *et al.*, 1995; Le Poul *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996), leading to an increased serotonin local extracellular concentration (Rutter and Aureback, 1993). Consequently, a decreased firing rate of serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus occurs (Kelly *et al.*, 1991), simultaneous to a decreased release of serotonin towards neuronal terminals in the forebrain (Rutter *et al.*, 1995). The electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus increases the firing rate of the LSN neurones, an effect facilitated by clomipramine (Contreras *et al.*, 1993a). The increased availability of serotonin in the dorsal raphe nucleus (Kelly *et al.*, 1991) may produce a disinhibitory effect on structures which receive fibres from the dorsal raphe nucleus, such as the LSN (Contreras *et al.*, 1990, 1993). In fact, fluoxetine increases the fronto-cortical neurones firing rate, apparently through an effect mediated by serotonergic autoreceptors located in the dorsal raphe nucleus, since the selective destruction of the ascending serotonergic pathway blocks the increase in the firing rate of fronto-cortical neurones produced by fluoxetine (Ceci *et al.*, 1993).

In conclusion, our data suggest that the increased neuronal firing rate of the LSN in animals treated with a low dose of fluoxetine during 21 days may be associated with an increase in motivation and in the first effort to escape from the stressful situation that the forced swim test represents.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Warren Haid and Irene Marquina for revising the manuscript. During this investigation, JFR-L, BB-M and AGG-G received fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) Reg. 124885, 124657 and 150023, respectively.

## Address for correspondence

Carlos M. Contreras  
POB 320  
Xalapa 91 000  
Veracruz  
Mexico  
Email: cmc@bugs.invest.uv.mx

## References

- Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94: 147-160
- Ceci A, Baschiroto A, Borsini F (1993) Effect of fluoxetine on the spontaneous electrical activity of fronto-cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 250: 461-464
- Contreras C M, Marván M L, Ramírez-Morales A, Muñoz-Méndez A (1993a) Clomipramine enhances the excitatory actions of raphe nucleus stimulation in lateral septal neurons in the rat. *Neuropsychobiology* 27: 86-90
- Contreras C M, Marván M L, Alcalá-Herrera V (1993b) A few electroconvulsive shocks produce more reliable effects of firing rate in lateral septal neurons than repetitive treatment in the rat. *Neuropsychobiology* 27: 80-82
- Contreras C M, Alcalá-Herrera V, Marván M L (1989) Action of antidepressants on the septal lateral nuclei of the rat. *Physiol Behav* 46: 793-798
- Contreras C M, Marván M L, Alcalá-Herrera V, Guzmán-Sáenz M A (1990) Chronic clomipramine increases firing rate in lateral septal neurons in the rat. *Physiol Behav* 48: 551-554
- Contreras C M, Lara-Morales H, Molina-Hernández M, Saavedra M, Arrellin-Rosas G (1995) An early lesion of the lateral septal nuclei produces changes in the forced swim test depending on gender. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 19: 1277-1284
- Contreras C M, Martínez-Mota L, Saavedra M (1998) Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 22: 1121-1128
- Contreras C M, Molina M, Saavedra M, Martínez-Mota L (2000) Lateral septal neuronal firing rate increases during proestrus-estrus in the rat. *Physiol Behav* 68: 279-284
- Cullinan W E, Herman J P, Battaglia D F, Akil H, Watson S J (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in the rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64: 477-505
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand* 62 (Suppl. 232): 1-55
- Detke M J, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121: 66-72
- Detke M J, Lucki I (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res* 73: 43-46
- Detke M J, Johnson J, Lucki I (1997) Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol* 5: 107-112
- Duman R S, Heninger G R, Nestler E J (1987) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 64: 597-606
- Duncan G E, Johson K B, Breese G R (1993) Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of fos-like immunoreactivity. *J Neurosci* 13: 3932-3943
- Espejo E F, Miñano F J (1999) Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. *Neuroscience* 88: 609-615
- Fuller R W, Wong D T (1977) Inhibition of serotonin reuptake. *Fed Proc* 36: 2154-2158
- Gogate M G, Bird S V, Wingkar K C, Kantak N M (1995) Septal regulation of male sexual behavior in rats. *Physiol Behav* 57: 1205-1207
- Hejós M, Gartside S E, Sharp T (1995) Inhibition of medial and dorsal raphe neurons following administration of selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 351: 624-629
- Jakab R L, Leranath C (1995) Septum. In Paxinos G (ed.), *The rat nervous system*. Academic Press, New York
- Jöels M, Urban J A (1985) Monoamine induced responses in lateral septal neurons: Influence of iontophoretically applied vasopressin. *Brain Res* 344: 120-126
- Jöels M, Twery M J, Shinnick-Gallagher P, Gallagher J P (1986) Multiple actions of serotonin on lateral septal neurons in rat brain. *Eur J Pharmacol* 129: 203-204
- Jöels M, Gallagher J P (1988) Actions of serotonin recorded intracellularly in rat dorsal lateral septal neurons. *Synapse* 2: 45-53
- Knowlton B J, Thompson R F (1989) Stimulation of the lateral septum is a more effective conditioned stimulus than stimulation of the medial septum during classical conditioning of the eye-blink response. *Behav Neurosci* 103: 206-208
- Kelly J S, Larkman P, Penington N J, Rainnie D G, McAllister-Williams H, Hodgkiss J (1991) Serotonin receptor heterogeneity and the role of potassium channels in neuronal excitability. *Adv Exp Med Biol* 287: 177-191
- Kirby L G, Allen A R, Lucki I (1995) Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid. *Brain Res* 682: 189-196
- Kirby L G, Lucki I (1997) Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 987-976
- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte A M, Hammon M, Lanfumey L (1995) Early desensitization of somato-dendritic 5-HT1A autoreceptors in rat treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352: 141-148
- Li Q, Muma N A, Van De Kar L D (1996) Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT1A receptors: reductions in hypothalamic and midbrain G1 and G0 proteins and in neuroendocrine responses to a 5-HT1A agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1035-1042
- Marván M L, Guzmán-Sáenz M A, Barradas J A, Contreras C M (1992) Septal neurons related with hippocampus increases their firing rate after long-term clomipramine actions. *Bol Estud Méd Biol Méx* 40: 9-13
- Molina M, Díaz-Meza J L, Saavedra M, Ortiz M, Contreras C M (1996) Raphe-septal neurons change in sensitivity to desipramine following an early septal lesion in the rat. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 20: 1427-1434
- Paxinos G, Watson C (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York
- Porsolt R D, Pichon L M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732
- Reneric J P, Lucki I (1998) Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 136: 190-197
- Rutter J J, Auerbach S B (1993) Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 1319-1324
- Rutter J J, Gundlach C, Auerbach S B (1995) Systemic uptake inhibition decreases serotonin release via somatodendritic autoreceptor activation. *Synapse* 20: 225-233
- Segal M (1974) Responses of septal nucleus neurons to microiontophoretically administered putative neurotransmitters. *Life Sci* 12: 371-373
- Skerritt U, Evans R, Montgomery S A (1997) Selective serotonin reuptake inhibitors in older patients. *Drug Aging* 10: 209-218
- Thomas E (1988) Forebrain mechanism in the relief of fear. The role of lateral septum. *Psychobiology* 16: 36-44
- Thomas E, Yadin E, Strickland C E (1991) Septal unit activity during classical conditioning: a regional comparison. *Brain Res* 547: 303-308
- Wieland S, Lucki I (1990) Antidepressant-like activity of 5-HT1A agonist measured with the forced swim test. *Psychopharmacology* 101: 497-504
- Yadin E, Thomas E (1981) Septal correlates of conditioned inhibition and excitation. *J Comp Physiol Psychol* 95: 331-340
- Yadin E, Thomas E, Grialha H L, Strickland C E (1993) The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol Behav* 53: 1077-1083