

03086
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR
TALÁMICO EN LA SINCRONIZACION”

DOCTORADO EN : CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA:
SALAZAR JUÁREZ / ALBERTO

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

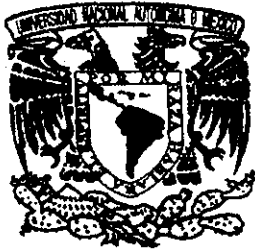
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

03086
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

ACCIONES ANSIOLÍTICAS Y ANTIDEPRESIVAS DEL
ESTRADIOL, LA PROGESTERONA Y LA
DESMETILIMIPRAMINA EN LA RATA HEMBRA

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A:
M.C. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA

TUTORES:
DR. CARLOS M. CONTRERAS
DR. ALONSO FERNÁNDEZ GUASTI

México D.F.

NOVIEMBRE 2002

La presente tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Manuel Contreras Pérez y del Dr. José Alonso Fernández Guasti. El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurofarmacología que pertenece al Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el Laboratorio de Farmacología Conductual perteneciente al Instituto Nacional de Psiquiatría y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN.

Agradecimientos

Al Comité tutorial:

Al Dr. Carlos M Contreras, por el apoyo, la comprensión y el cariño con el que me condujiste por esta carrera. Gracias por tus consejos y por tu ejemplo de trabajo constante.

Al Dr. José Alonso Fernández Guasti, por la confianza depositada y por la oportunidad de aprender de tu ejemplo.

A la Dra. Dolores Rodríguez Ortiz, por el apoyo como amiga y como profesional. Gracias por la asesoría y por compartir experiencias como investigadora y como ser humano.

Al Jurado evaluador:

Dra. Carolina López Rubalcava
Dra. Dolores Rodríguez Ortiz
Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora
Dr. José Alonso Fernández Guasti
Dr. Carlos Manuel Contreras Pérez
Dr. Miguel Molina Hernández
Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Por sus valiosos comentarios sobre este trabajo, los cuales ayudaron a enriquecer el escrito.

INDICE

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Capítulo I	
1.1 Introducción General	3
1.2 Ansiedad y depresión	4
1.3 Terapias farmacológicas de la ansiedad y la depresión	6
1.4 Modelos animales de depresión y ansiedad	9
1.4.1 Prueba de nado forzado	10
1.4.2 Modelos animales de ansiedad	13
Capítulo II	
2.1 Trastornos emocionales y sistemas de neuromodulación	16
2.2 La serotonina en la depresión y la ansiedad	16
2.3 Las catecolaminas en la depresión y la ansiedad	18
2.4 El sistema GABAérgico en la depresión y la ansiedad	21
2.5 Las hormonas esteroides y los trastornos afectivos	24
2.5.1 Los estrógenos, la progesterona y sus receptores	25
2.5.2 Hormonas ováricas en modelos animales depresión y ansiedad	27
Capítulo III	
3.1 Justificación	31
3.2 Hipótesis	31
3.3 Objetivo General	31
3.3.1 Objetivos particulares	31
Capítulo IV	
Material y Métodos	
4.1 Sujetos	33
4.2 Frotis vaginal	35
4.3 Pruebas conductuales	35
4.4 Estadística	36

Capítulo V
Resultados

5.1 Desipramine restricts estrous cycle oscillations in swimming	37
5.2 Progesterone reduces immobility in rats forced to swim	38
5.3 Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the plus-maze test	39
5.4 Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety	40

Capítulo VI
Discusión General

6.1 Prueba de nado forzado y parámetros evaluados	42
6.2 Efecto de la fase del ciclo estral en la prueba de nado forzado	42
6.3 Efecto la progesterona y el estradiol en la prueba de nado forzado	44
6.4 Efecto de la desmetilimipramina en la prueba de nado forzado	47
6.5 Desmetilimipramina y fases del ciclo estral: efectos en la prueba de nado forzado	49
6.6 Efecto ansiolítico de la desmetilimipramina en dos modelos animales de ansiedad; la prueba de enterramiento defensivo y el laberinto elevado en cruz	49
6.7 Modulación hormonal ovárica de efecto ansiolítico de la desmetilimipramina: papel del estradiol y de la progesterona	51
6.8 Conclusiones	57

Apéndice I Fármacos antidepresivos	59
---------------------------------------	----

Apéndice II Fármacos ansiolíticos	63
--------------------------------------	----

Apéndice III Modelos animales de ansiedad	65
--	----

Apéndice IV Modelos animales de depresión	68
--	----

Apéndice V Ciclo estral de la rata	72
---------------------------------------	----

Referencias	74
-------------	----

RESUMEN

Se ha propuesto que las fluctuaciones de las hormonas ováricas juegan un papel importante en la regulación de las emociones en las mujeres e incluso que modifican los efectos farmacológicos de los antidepresivos y los ansiolíticos. Sin embargo, se desconoce la manera en la que se lleva a cabo tal regulación hormonal. El propósito general de esta serie de experimentos fue explorar la posible modulación hormonal ejercida por el estradiol y la progesterona sobre los efectos antidepresivo y ansiolítico producidos por la Desmetilimipramina (DMI). Se utilizó a la rata hembra como animal experimental, considerando que esta especie es de ovulación espontánea y su ciclo reproductivo o estral se caracteriza por fases asociadas a fluctuaciones en la concentración de estrógenos y progesterona. El primer objetivo fue explorar si las fases del ciclo estral de la rata influyen en la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado o en el efecto antidepresivo de la DMI. La prueba de nado es un modelo animal sensible a los antidepresivos, en el que la reducción de la conducta de inmovilidad se interpreta como un efecto antidepresivo. Un segundo objetivo fue explorar el papel de la progesterona en los cambios conductuales en la prueba de nado asociados a las oscilaciones hormonales cíclicas. El tercer objetivo fue explorar si las fluctuaciones hormonales propias del ciclo estral modifican el efecto ansiolítico de la DMI evaluado en dos modelos animales de ansiedad. Por último, el cuarto objetivo fue analizar la posible participación de la progesterona, el estradiol o la combinación de ambas hormonas en el efecto ansiolítico de la DMI.

Encontramos que la fase del ciclo estral modificó la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado, destacando un efecto anti-inmovilidad en las fases de proestro-estro. Estas fases del ciclo estral se caracterizan por las más altas concentraciones de estógenos y progesterona. El segundo experimento confirmó la participación de la progesterona en el efecto anti-inmovilidad observado en proestro-estro. La DMI (2.5 mg/kg, i.p, por 21 días) produjo un efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado, que fue independiente del ciclo estral. En las pruebas de ansiedad experimental, la DMI administrada crónicamente disminuyó la ansiedad tanto en las ratas ovariectomizadas como en las intactas, destacando que en las últimas el efecto ansiolítico fue de magnitud diferente dependiendo de la fase del ciclo. En esta serie experimental encontramos un efecto ansiolítico máximo producido por la DMI en las ratas en proestro y en estro. En un experimento posterior se encontró que tanto el estradiol como la progesterona facilitaron el efecto ansiolítico de dosis sub-óptimas de DMI. El estradiol *per se* carece de actividad ansiolítica, sin embargo, en combinación con la DMI redujo la ansiedad de manera más importante que la progesterona. La combinación de ambas hormonas, en dosis que inducen el estro conductual, también facilitó la ansiólisis producida por la DMI y esta respuesta fue de magnitud semejante a la producida por la combinación de DMI más estradiol. En conclusión, las hormonas ováricas participan en las conductas que reflejan ansiedad y desesperanza en la rata y tienen la propiedad de modular algunos efectos farmacológicos de los fármacos psicoactivos, como por ejemplo, el efecto ansiolítico de la DMI.

ABSTRACT

The general aim of this study was to analyze whether estradiol or progesterone modifies the antidepressant and anxiolytic-like effects produced by desmethylimipramine (DMI). The first objective was to search for behavioral changes in an animal model of depression, the forced swimming test (FST), that were associated with the estrous cycle in female rats. The estrous cycle is characterized by the occurrence of cyclic oscillations in both estradiol and progesterone concentrations. In order to establish the participation of progesterone in these putative behavioral changes, different doses of this steroid were tested in ovariectomized rats in the FST. The second objective consisted in exploring the possible influence of the estrous cycle on the antidepressant- and anxiolytic-like effects of DMI (DMI at 2.5 mg/kg, i.p., for 21 days). Female intact rats were classified according to the different estrous phases and evaluated in the FST and in two animal models of anxiety: the elevated plus-maze and the burying behavior paradigm. Results revealed that the estrous cycle induced some changes in the immobility behavior in the FST. The shortest time of immobility and the highest latency to the first period of immobility were observed during the proestrous-estrous phases, while the opposite effect was found during the metestrous-diestrous phases. Progesterone systemically administered reduced the total time of immobility, an antidepressant-like effect that might explain the lowest immobility levels observed during the proestrous-estrous phases. Besides, DMI produced an antidepressant-like effect in the FST which was not altered by the estrous cycle. Chronic treatment with DMI produced an anxiolytic-like effect in both ovariectomized intact females. Interestingly, the anxiolytic effect of DMI was highest in proestrous and estrous rats. Such actions were mediated both by progesterone and estradiol, as revealed in other experimental series. Estradiol *per se* did not produce anxiolytic-like actions, however it facilitated the anxiolytic effect of a sub-threshold dose of DMI in the burying behavior test. The hormonal combination of estradiol plus progesterone, at doses to induce behavioral estrous, facilitated DMI's anxiolytic action and this effect was identical to that produced by the combination of DMI plus estradiol. It is concluded that ovarian hormones influence some antidepressant- and anxiolytic-like behaviors, suggesting their participation in the regulation of mood states and psychiatric illness. Moreover, estradiol and progesterone independently regulate the anxiolytic-like effect of DMI changing the sub-threshold dose of the anxiolytic in a threshold dose.

CAPITULO I

1.1 Introducción General

Las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, han sido asociadas con la regulación de las emociones así como con algunos estados psicopatológicos entre los que se encuentran la ansiedad, la depresión (Halbreich y cols., 1986; 1990; Janowski y cols., 1996) y la esquizofrenia (Sumner y Fink, 1995; Fink y cols., 1996). Una observación constante, consiste en que la caída brusca de la concentración plasmática de estos esteroides ováricos tiene efectos deletéreos sobre el estado de ánimo y la ansiedad (Janowski y cols., 1996). Por ello, se ha propuesto que el estradiol, la progesterona o ambas hormonas actúan como antidepresivos o ansiolíticos endógenos (Pearlstein, 1995). Dado que las evidencias obtenidas en los experimentos clínicos son controversiales, aún queda mucho por esclarecer acerca de la participación hormonal en los cambios emocionales. Un aspecto interesante relativo a las propiedades de estas hormonas es que parecen modular los efectos farmacológicos de algunos ansiolíticos. Por ejemplo, la progesterona incrementa las acciones sedantes y ansiolíticas de las benzodiazepinas tanto en mujeres (De Wit y Rukstalis, 1997) como en ratas hembras (Fernández-Guasti y Picazo, 1990). Sin embargo, ante la asociación entre la ansiedad y la depresión (*vide infra*), aún se desconoce si las hormonas ováricas afectan de manera análoga las acciones de los fármacos antidepresivos. Por lo tanto, el propósito de esta serie de experimentos fue, por un lado, investigar si las fluctuaciones hormonales propias del ciclo reproductivo de la rata afectan algunas conductas que reflejan depresión y ansiedad. Para ello, se utilizaron modelos animales específicos para el estudio de estos trastornos psiquiátricos. Por otro lado, también se exploró el efecto del estradiol y de la progesterona en la modulación de las acciones ansiolíticas y antidepresivas de la desmetilimipramina, un antidepresivo tricíclico que también es usado como ansiolítico en humanos (Lydiard y cols., 1993; Nutt y Glue, 1991).

1.2 Ansiedad y Depresión

La ansiedad y la depresión son estados emocionales complejos que conllevan alteraciones cognitivas, afectivas y fisiológicas, por lo que causan un deterioro considerable de la salud. El Manual Diagnóstico y Estadístico de las Enfermedades Mentales (DSM-IV-R, 1998) clasifica a la depresión como un desorden afectivo cuyos síntomas básicos son los sentimientos de tristeza y de culpa, el retardo motor, el abatimiento cognitivo, la ideación suicida y la anhedonia o incapacidad para experimentar placer. Cabe destacar que la depresión debe distinguirse de ciertas emociones normales de la esfera afectiva, como la tristeza y el duelo, para las cuales existe un límite temporal y un factor reconocido que desencadena la sintomatología.

En contraste con la naturaleza patológica de la depresión, la ansiedad es una emoción normal que se caracteriza por intranquilidad, aumento del estado de alerta, tensión motora e incremento de la actividad autonómica. La ansiedad, hasta cierto punto, es un estado que se genera cuando los individuos se enfrentan a una situación potencialmente peligrosa, por lo que se considera un mecanismo de alerta o de alarma (Hommer y cols., 1987). En general, tal estado ansioso desaparece una vez que el estímulo estresante es retirado, sin embargo, en algunos individuos la ansiedad persiste por largo tiempo. Este último estado se considera patológico y puede ser un síntoma central de algunos desórdenes como el trastorno de pánico o el obsesivo-compulsivo, o bien formar parte de un síndrome de ansiedad generalizada (Dubovsky, 1990).

De acuerdo con las estadísticas mundiales, la ansiedad y la depresión se encuentran entre los trastornos psiquiátricos más frecuentes. Se estima que el 18 % de la población ha sufrido por lo menos un episodio de depresión (Caraveo-Anduanga y cols., 1999), en tanto que un 7 % de los individuos ha padecido ansiedad como patología (Nutt y Glue, 1991). En México,

las estadísticas arrojan cifras semejantes: el 12 % de la población del Distrito Federal padece de trastorno depresivo o distimia, con alto riesgo de recurrencia ya que el 58.9 % de las personas entrevistadas tuvo más de un episodio de depresión (Caraveo-Anduanga y cols., 1999). Existen diferencias genéricas importantes en cuanto a la prevalencia de estas psicopatologías, ya que un número mayor de mujeres sufre de ansiedad, depresión o ambas alteraciones. De hecho, en la depresión la incidencia o distribución por géneros es de 2:1 (Jensvold, 1996) hasta 3:1 (Yonkers y Chantillis, 1995) y de 2:1 para la ansiedad (Breslau y cols., 1995).

Tabla 1. Síntomas de la ansiedad y la depresión

Depresión	Síntomas traslapados	Ansiedad
Talante deprimido	Alteraciones del sueño	Tremor
Interés deprimido	Agitación psicomotora	Tensión muscular
Retardo psicomotor	Fatiga	Disnea
Alteraciones del apetito	Preocupación/culpa	Sudoración
Sentimientos de abandono	Dificultad para concentrarse	Boca seca
Desesperanza	Ideación suicida	Naúseas

Tomado de Pasnau y Bystritsky, 1994.

La ansiedad y la depresión son entidades patológicas diferentes, sin embargo, un porcentaje alto de individuos padece los dos tipos de desórdenes como ocurre en la depresión mayor combinada ya sea con el desorden de pánico, el desorden obsesivo-compulsivo o con el trastorno por ansiedad. En la tabla 1 se describen los síntomas característicos de los trastornos de ansiedad y depresión, así como aquellos que son compartidos por ambos desórdenes. Dado el traslapamiento de síntomas, es factible pensar que ambos padecimientos tienen una etiología común. De hecho, en algunos casos, las terapias farmacológicas son equivalentes, por ejemplo, el tratamiento de largo plazo con antidepresivos disminuye también los síntomas de la ansiedad (Lydiard y cols., 1993; Nutt y Glue, 1991; Pasnau y Bystritsky, 1994) y los ansiolíticos, como la buspirona, también sirven de apoyo en la terapia de la depresión en pacientes de alto riesgo,

como los ancianos (Schweizer y cols., 1998).

1.3 Terapias farmacológicas de la Ansiedad y la Depresión.

El tratamiento farmacológico de la depresión se inició con el descubrimiento de las acciones de dos compuestos: la iproniazida y la imipramina. La primera fue sintetizada en 1951 con el propósito de ser usada como agente anti-tuberculoso; sorpresivamente, se encontró que además producía una mejoría del estado de ánimo de los pacientes tuberculosos. Las investigaciones subsecuentes revelaron que la iproniazida inhibe la actividad de la monoaminoxidasa, la enzima que biotransforma a las catecolaminas (dopamina: DA; noradrenalina: NA) y a la serotonina (5-HT), por lo que se propuso que el efecto antidepresivo producido por este fármaco estaba mediado por el aumento en la concentración de neurotransmisores en el espacio sináptico (Musselman y cols., 1998). Paralelamente (1952), la imipramina fue sintetizada, junto con otros análogos de la clorpromacina, para ser usado como posible antipsicótico. Su potencial antidepresivo fue descubierto cuando se administró a algunos pacientes deprimidos, entre otros sujetos de estudio (Stahl, 2000). A partir de la imipramina, cuyo mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la recaptura de la 5-HT y la NA, se sintetizaron otros antidepresivos tricíclicos, entre ellos algunas aminas terciarias como el doxepin, la clorimipramina y la amitriptilina, las cuales inhiben con mayor selectividad la recaptura de la 5-HT, así como las aminas secundarias desipramina y nortriptilina, que bloquean principalmente la recaptura de la NA (Stahl, 1998a). A la fecha se han producido otros antidepresivos de estructura química diferente a los tricíclicos, tales como los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (fluoxetina y fluvoxamina, entre otros), los inhibidores de la recaptura de NA/5-HT (venlafaxina), así como los inhibidores selectivos de la recaptura de DA (bupropión). A pesar de esta variedad de compuestos, los antidepresivos tricíclicos siguen vigentes en la terapéutica de la depresión (Stahl, 1998a).

Por otra parte, el tratamiento farmacológico de la ansiedad comprende principalmente la terapia con benzodiazepinas, un grupo de compuestos que se caracteriza por tener un núcleo bicíclico de benzo-1,4-diazepina. El primer compuesto benzodiazepínico, el clordiazepóxido, fue sintetizado a mediados de 1950 y posteriormente (1969) lanzado al mercado en sustitución de los antiguos ansiolíticos: el alcohol, el meprobamato y los barbitúricos (Haefely, 1994). El mecanismo de acción de las benzodiazepinas comprende la unión del fármaco a un sitio de reconocimiento ubicado en el receptor tipo A del ácido gama-aminobutírico (GABA). La consecuencia es un aumento del tiempo de apertura del canal de cloro que está acoplado a este receptor, lo que conduce a un incremento del flujo de cloro hacia el interior de la célula y, finalmente, la hiperpolarización membranar. Las benzodiazepinas tienen un rango amplio de efectos farmacológicos mediados por este mecanismo, ya que son ansiolíticos, relajantes musculares, sedantes y anti-convulsivos (Majewska, 1992). El tratamiento de largo plazo con benzodiazepinas tiene consecuencias desfavorables ya que produce dependencia física y tolerancia (Haefely, 1994), por lo que una alternativa terapéutica son los antidepresivos (Nutt y Glue, 1991). Algunas investigaciones clínicas han demostrado que los tratamientos crónicos con imipramina, desmetilimipramina y clorimipramina son más eficaces que el placebo y que las benzodiazepinas para disminuir la ansiedad en pacientes con trastorno de ansiedad generalizada (Nutt y Glue, 1991; Tyrer y Tyrer, 1994). Los resultados, tanto de estas investigaciones clínicas como de algunas realizadas en animales (Bodnoff y cols., 1988, 1989; Laino y cols., 1993), permiten abordar la terapéutica de ambos desórdenes (ansiedad y depresión) con medicamentos de la misma naturaleza química, preferentemente mediante la administración de largo plazo de antidepresivos tricíclicos.

Uno de los antidepresivos tricíclicos de nuestro interés es la desipramina o desmetilimipramina, la cual existe como fármaco (Norpramin) o como producto del metabolismo de la imipramina (Stahl, 1998a). Este compuesto tiene afinidad alta por el transportador de NA

(Baker y Blakely, 1994), por lo que su acción inicial es inhibir la recaptura de este neurotransmisor. El tratamiento crónico (dos semanas ó más) con este compuesto produce una disminución del número de receptores β 1-adrenérgicos post-sinápticos (Bergstrom y Kellar, 1979; Sapena y cols., 1994), a la vez que también provoca la disminución de la sensibilidad de los receptores α 2-adrenérgicos presinápticos, los cuales regulan la liberación de NA y 5-HT (Heal y cols., 1988; Yoshioka y cols., 1995). Dado que las acciones de la desmetilimipramina se ejercen primordialmente sobre el sistema noradrérgico (Page y cols., 1999), la integridad de dicho sistema es esencial para la producción de los efectos farmacológicos de este compuesto (Hall y cols., 1984; Fontana y cols., 1999).

Cabe agregar que este antidepresivo tiene acciones adicionales sobre otros sistemas de neurotransmisión. Algunos autores han reportado que el tratamiento crónico con el tricíclico produce una disminución del número de receptores 5HT_{2A}, un efecto que se correlaciona con su actividad antidepresiva en un modelo animal sensible a estos tratamientos (Mudunkotuwa y Horton, 1996). Otros, han encontrado que el efecto antidepresivo de este compuesto es bloqueado por antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} ó 5-HT_{1B} tales como el NAN-190, el pindolol o el BMY 7378, por lo que se propone que tal actividad antidepresiva es parcialmente mediada por los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} y 5-HT_{1A} (Detke y cols., 1995b). Algunos autores han reportado que el antagonista dopaminérgico haloperidol así como la destrucción de las vías dopaminérgicas bloquean el efecto antidepresivo de la desmetilimipramina (Cervo y Samanin, 1987; Besson y cols., 1999). Otros autores han propuesto que las acciones de los antidepresivos (incluyendo la desmetilimipramina) son mediadas por el sistema GABAérgico. La desmetilimipramina tiene afinidad por los receptores GABA_A (Squares y Saederup, 1988) y su administración crónica incrementa la unión de [³H]GABA a sus receptores (Suranyi-Cadotte y cols., 1984). Además, el tratamiento de largo plazo con la desmetilimipramina favorece la transmisión GABAérgica en el hipocampo, así como la actividad de la descarboxilasa del ácido

glutámico, enzima crucial en la síntesis del GABA (Scatton y cols., 1987). En resumen, las acciones antidepresivas y posiblemente las ansiolíticas de la desmetilimipramina, son consecuencia de un conjunto de cambios plásticos de los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico y GABAérgico, cuya participación en algunas respuestas conductuales ha sido determinada por diferentes grupos de investigación mediante el uso de modelos animales.

1.4. Modelos animales de Depresión y Ansiedad

La participación de los componentes neurales que subyacen a los trastornos por ansiedad, depresión y otras psicopatologías, no es posible de llevarse a cabo usando humanos como sujetos de experimentación. Por ello, los modelos animales son herramientas metodológicas de gran importancia en la investigación (ver Apéndices III y IV). En los modelos animales de depresión y ansiedad, los roedores son sometidos a eventos estresantes, químicos o quirúrgicos, con el propósito de generar respuestas bioquímicas y conductuales semejantes a las presentadas por los individuos deprimidos o ansiosos (Porsolt y Lenègre, 1992; Koob y cols., 1998). De acuerdo con Porsolt y Lenègre (1992), los modelos animales de los trastornos psiquiátricos deben ser útiles para tres propósitos: a) detectar el potencial terapéutico de drogas específicas para el tratamiento de estos desórdenes, b) proporcionar datos relevantes acerca de los mecanismos de acción de dichos fármacos y c) constituir una herramienta para la determinación de los substratos neurobiológicos de los desórdenes psiquiátricos (Porsolt y Lenègre, 1992).

La contribución de los modelos animales a la neurobiología de los trastornos psiquiátricos depende de su validez. Willner (1994) propone tres criterios de validez que permiten calificar a los modelos animales. El concepto de *validez predictiva* implica que todas aquellas manipulaciones que modifican el estado patológico en los humanos también deben

hacerlo en el modelo animal. En la práctica, la *validez predictiva* del modelo se determina por la respuesta a los tratamientos farmacológicos. La *validez de apariencia* se refiere a la similitud fenomenológica entre el modelo y el desorden modelado (Willner, 1994). Previamente, Abramson y Seligman (1978, citado en Willner, 1994) propusieron que el modelo debe mostrar los síntomas más representativos del desorden y no los síntomas secundarios; por ejemplo, en caso de la depresión, la anhedonia es un síntoma central. El tercer criterio señalado por Willner (1994), la *validez de constructo o validez hipotética*, hace referencia a las bases teóricas subyacentes al desorden psiquiátrico. Este criterio establece que las hipótesis que explican el trastorno psiquiátrico también deben servir como fundamento del modelo. Por ejemplo, someter a los animales a un procedimiento de estrés crónico produce desesperanza, lo cual puede ser comparable con los eventos estresantes de la vida diaria que en muchos casos forman parte de la etiología de la depresión en individuos susceptibles.

Los modelos animales usados para esta tesis fueron la prueba de nado forzado, como modelo de depresión, y las pruebas de enterramiento defensivo y laberinto de brazos elevados, como modelos de ansiedad. Estos paradigmas fueron seleccionados para la investigación tomando en cuenta las siguientes ventajas: a) son selectivos para los fármacos antidepresivos y ansiolíticos, respectivamente, por lo que cumplen con el criterio de validez predictiva, b) no requieren el entrenamiento de los animales, c) son económicos y d) los resultados obtenidos son replicados fácilmente por distintos observadores.

1.4.1 Prueba de nado forzado

La prueba de nado forzado (Porsolt y cols., 1977) consta de dos sesiones, la primera de 15 minutos denominada pre-prueba, seguida 24 horas más tarde por una sesión de 5 minutos o prueba. En la pre-prueba, los animales son introducidos en un estanque que contiene agua (temperatura 25 ± 1 °C) a una profundidad que permite que toquen el fondo con sus patas, de tal

forma que los animales no pueden escapar del estanque y son forzados a nadar. Inicialmente, las ratas nadan de forma vigorosa hasta que paulatinamente sus movimientos se reducen y realizan sólo aquellos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua y respirar. A esta reducción de los movimientos o ausencia de ellos (flotación) se le denomina conducta de inmovilidad y se ha propuesto que refleja directamente los niveles de desesperanza los cuales son evaluados durante la sesión de prueba (5 min). Los antidepresivos administrados sub- o crónicamente antes de la prueba reducen la conducta de inmovilidad, un efecto que se considera antidepresivo (Porsolt y cols., 1977; 1992; Borsini y Meli, 1988). Las variables evaluadas fueron el tiempo de inmovilidad, que refleja directamente los niveles de desesperanza, así como la latencia a la primer inmovilidad, es decir, el tiempo transcurrido desde que se coloca a la rata en el estanque hasta que presenta por primera vez la inmovilidad (Contreras y cols., 1995; Espejo y Minano, 1998). Esta última variable puede ser considerada un indicador del tiempo en que los animales se esfuerzan por nadar antes de abatirse ante una situación que les provoca estrés. En consecuencia, un antidepresivo disminuye el tiempo de inmovilidad a la vez que incrementa la latencia a la primer inmovilidad.

De acuerdo con los autores de este modelo (Porsolt y cols., 1977; Porsolt y Lenègre, 1992), durante la pre-prueba los animales aprenden que no pueden escapar del estanque y gradualmente dejan de luchar. La consecuencia es un estado de "desesperanza" ("behavioral despair") semejante al presentado por humanos sometidos a estrés continuo, por lo que se propuso a la prueba de nado como un modelo de depresión. Algunos autores han cuestionado la validez de apariencia (*vide supra*) de este modelo, argumentando que el aumento de la inmovilidad se debe a factores distintos de los de un estado depresivo, tales como alteraciones motoras o estrategias de ahorro de energía (De Pablo y cols., 1989; West, 1990). Sin embargo, existen suficientes argumentos para asegurar que la prueba de nado induce un estado de desesperanza generado por la aplicación de un evento estresante e inescapable. Borsini y cols.

(1989) demostraron que la sesión de pre-prueba es necesaria para el desarrollo de la inmovilidad. La pre-prueba puede ser sustituida por la aplicación de otros estresores que producen el mismo efecto en cuanto a la inmovilidad, tales como cambios en la temperatura ambiente o en el fotoperiodo, restricción de espacio y privación de alimento, entre otros (Borsini y cols., 1989). La relación entre la ansiedad y la depresión también puede ser abordada en este paradigma, dado que la pre-prueba genera ansiedad y predispone al aumento de la inmovilidad. Así, la administración de diazepam antes de la pre-prueba impide el aumento de la conducta de inmovilidad (Borsini y cols., 1989), lo cual tiene relación con la idea de que la ansiedad es un antecedente importante de la depresión en algunos individuos.

Kirby y cols. (1995) han demostrado que el nado forzado incrementa los niveles de corticosterona plasmática. La analogía con el ser humano es un punto a favor del modelo, dado que los sujetos deprimidos sufren una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Tal alteración se pone en evidencia después de la administración de dexametasona, un corticosteroide sintético, ya que en un individuo sano la aplicación de este esteroide provoca la supresión de cortisol en tanto que en un paciente deprimido tal respuesta no se presenta (López y cols., 1998). Los resultados de Kirby y cols. (1997b) confirman que la pre-prueba induce hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en la rata, y tal hiperactividad es revertida por el tratamiento antidepresivo de fluoxetina. Otros hallazgos apoyan a la prueba de nado como modelo de depresión. Se ha encontrado que la pre-prueba modifica diferencialmente las concentraciones de 5-HT en algunas regiones cerebrales, provocando, por ejemplo, aumento del contenido de 5-HT en el núcleo estriado y disminución en el núcleo septal lateral (Kirby y cols., 1995; 1997a; 1997b; 1998). Estas estructuras participan en la regulación de dos funciones involucradas en la prueba de nado: la motricidad y las emociones (Yadin y Thomas, 1981; 1996). Otro argumento a favor de la prueba de nado como modelo de depresión es su selectividad alta por los antidepresivos, así como la producción escasa de falsos positivos. De

estos últimos, un ejemplo clásico son las anfetaminas (estimulantes), las cuales reducen la inmovilidad en la prueba de nado, pero a expensas de un aumento de la actividad motriz, un efecto que no se produce con los antidepresivos (Borsini y Meli, 1988).

1.4.2 Modelos animales de ansiedad

Los modelos de ansiedad se basan en la capacidad de los animales para responder con reacciones de temor ante estímulos que reconocen como ajenos y potencialmente peligrosos. Estas reacciones de miedo pueden ser cuantificables, proporcionando así información acerca de los niveles de ansiedad alcanzados por el animal, así como de la respuesta ante el tratamiento ansiolítico (Treit, 1994). Los modelos animales de ansiedad han sido clasificados de acuerdo al procedimiento utilizado para inducir la reacción de temor, en modelos condicionados y no condicionados. Los modelos condicionados utilizan manipulaciones instrumentales de aprendizaje aversivo, tales como la supresión condicionada, la evitación activa y el castigo (apéndice IV). Por el contrario, los modelos de ansiedad no condicionada aprovechan las conductas espontáneas presentadas por los animales ante estímulos naturalmente desagradables para ellos, como la luz brillante, los espacios abiertos y los conespecíficos extraños (Treit, 1994).

Dada la ventaja que confiere utilizar el repertorio conductual de cada especie sin la intervención de manipulaciones instrumentales de larga duración, para la presente investigación se utilizaron dos modelos de ansiedad no condicionada: el laberinto elevado en cruz o laberinto de brazos elevados (Pellow y cols., 1985) y la prueba de enterramiento defensivo (Pinel y Treit, 1978; Pinel y cols., 1980). El laberinto elevado en cruz es un dispositivo formado por 4 brazos de madera o plexiglass, colocados en forma de cruz sobre una plataforma elevada; dos brazos tienen paredes en tanto que los dos restantes carecen de ellas. La inducción de la ansiedad se basa en el temor natural de los roedores a los espacios abiertos, de tal forma que un animal sin

tratamiento ansiolítico permanecerá más tiempo en los brazos cerrados que en los abiertos. El efecto ansiolítico se mide por el aumento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, un efecto claramente observado después del tratamiento con benzodiazepinas (Pellow y cols., 1985). Una ventaja adicional de este modelo es su sensibilidad a algunas variaciones fisiológicas, por ejemplo, se han determinado diferencias en los niveles de ansiedad entre ratas hembras intactas y lactantes (Bitran y cols., 1991a, 1991b).

El modelo de la conducta defensiva de enterramiento explota una conducta innata de los roedores, que surge ante la presencia de un estímulo aversivo. En este modelo, los animales se introducen en una caja de acrílico, cuyo piso está cubierto por una capa de aserrín fino. Una de las paredes de la caja tiene adherido un electrodo que permite aplicar choques eléctricos constantes, de baja intensidad (0.3 mA). Cuando los animales reciben uno ó más choques, cubren el electrodo con el aserrín. El tiempo invertido en la conducta de enterramiento es indicativo de los niveles de ansiedad (Treit y cols., 1982), en tanto que la latencia de enterramiento revela la reactividad o la capacidad de respuesta de los animales (Rodríguez-Manzo y cols., 1999). Un ansiolítico óptimo es aquel que reduce la conducta de enterramiento sin modificar la latencia o reactividad, un efecto obtenido con dosis de 1-2 mg/kg de diazepam (Treit y cols., 1982; Treit, 1990). Este modelo también detecta efectos sedantes, como sucede con dosis mayores (más de 3 mg/kg) de diazepam, o efectos ansiogénicos, lo cual se evidencia por el incremento de la conducta de enterramiento (Treit, 1990). Las diferencias entre el estímulo inductor de la ansiedad en el laberinto de brazos elevados con respecto al del enterramiento defensivo permiten distinguir el efecto de diferentes compuestos ansiolíticos. Por ejemplo, las benzodiazepinas reducen la ansiedad en ambos modelos, en tanto que los agonistas al receptor 5-HT_{1A} son efectivos en el modelo de enterramiento defensivo y carecen de efecto o incluso generan ansiedad en el laberinto elevado en cruz (Handley, 1991).

Se ha descrito que la gama de conductas exhibidas por los animales en el paradigma de la conducta de enterramiento se relaciona con factores como la intensidad del choque y la altura de la cama de aserrín. Un choque eléctrico de intensidad mayor a 3.0 mA inhibe la exploración e induce la conducta de congelamiento ("freezing"), obstaculizando así la expresión de la conducta de enterramiento. De la misma manera, la reducción de la altura de la cama de aserrín o su ausencia genera reacción de congelamiento. En nuestro modelo, la cama de aserrín tuvo una altura considerable (aproximadamente 5 cm) y los animales recibieron choques eléctricos de baja intensidad lo que favoreció el despliegue óptimo de la conducta de enterramiento.

CAPITULO II

2.1 Trastornos emocionales y sistemas de neuromodulación

En 1965, Schidkraut encontró que la administración de reserpina, un fármaco que depleta las reservas de monoaminas cerebrales, provoca un estado de ánimo deprimido en pacientes susceptibles. Con base en este hecho, propuso que la depresión se origina por una baja disponibilidad de las aminas cerebrales, principalmente NA, DA y 5-HT (Schildkraut, 1995). Esta hipótesis fue sostenida por el descubrimiento de las propiedades antidepresivas de la iproniazida (1951, *vide supra*), un medicamento que incrementa la disponibilidad de estas aminas (tomado de Blier y de Montigny, 1997). Tales hallazgos dieron la pauta para la investigación del papel de los neurotransmisores en las enfermedades mentales. La etiología de los trastornos afectivos y de la ansiedad se ha relacionado con la perturbación del funcionamiento de una gran cantidad de neuromoduladores tales como los transmisores clásicos NA, 5-HT, DA y GABA (Duman y cols., 1997), algunos péptidos como las colecistoquininas (CCK, para el caso particular de la ansiedad), la hormona liberadora de corticotropina (CRH, Arborelius y cols., 1999; Curtis y Valentino, 1994; López y cols., 1998), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) así como las hormonas esteroideas estrógenos y progesterona (Freeman y cols., 1993; Halbreich y cols., 1995; Stahl, 1998b).

2.2 La serotonina en la depresión y la ansiedad

Los estudios clínicos han revelado que existe una alteración del sistema serotoninérgico en los individuos que padecen algunas enfermedades psiquiátricas, entre ellas la depresión y la ansiedad. Esto ha sido propuesto tomando en cuenta que algunos pacientes deprimidos tienen niveles bajos de 5-HT y de su metabolito principal, el ácido 5-hidroxiindol acético (Zangen y cols., 1997; Musselman y cols., 1998). Mediante la investigación en animales se ha demostrado que las alteraciones más relevantes en la depresión están relacionadas con cambios en

algunos receptores serotoninérgicos (Redrobe y cols., 1996; Schreiber y de Vry, 1993). Los receptores 5-HT_{1A} se encuentran ubicados tanto en la pre- como en la post-sinápsis. Presinápticamente se encuentran en los somas y las dendritas de las neuronas de los núcleos dorsal y medial del rafe. Estos núcleos se localizan en el tallo cerebral y constituyen el principal reservorio de 5-HT. La función de estos autorreceptores es el control de la neurotransmisión serotoninérgica a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Blier y de Montigny, 1997). Por otro lado, la activación de los receptores 5-HT_{1A} post-sinápticos provoca la inhibición del disparo neuronal de las estructuras límbicas, tales como la corteza cerebral, el hipocampo, algunas áreas hipotalámicas y los núcleos septales (Blier y de Montigny, 1997; 1998). Otros estudios farmacológicos revelaron que la aplicación crónica de agonistas 5-HT_{1A} produce la desensibilización de los autorreceptores e incrementa la función de los receptores post-sinápticos 5-HT_{1A}. En línea con estas evidencias, el tratamiento a largo plazo con antidepresivos tricíclicos (imipramina y clorimipramina) mejora la neurotransmisión serotoninérgica mediante el aumento de la sensibilidad de los receptores 5-HT_{1A} post-sinápticos (Chaput y cols., 1991; Blier y de Montigny, 1997; 1998) y la regulación a la baja de los receptores 5HT₂ post-sinápticos (Stahl, 1998a; 2000).

En los modelos animales de ansiedad, los agonistas del receptor 5-HT_{1A} tales como la 8-hidroxi-di-(propil-amino) tetralina (8-OH-DPAT), la ipsapirona y la buspirona, producen ansiólisis en roedores (ratas o ratones) por estimulación de los receptores pre- y post-sinápticos (Fernández-Guasti y cols., 1992; López-Rubalcava, 1996; Schreiber y de Vry, 1993), dependiendo del modelo animal utilizado y de la especie de roedor (Fernández-Guasti y cols., 1992; López-Rubalcava, 1996). Así mismo, la ketanserina y la ritanserina, dos antagonistas 5-HT₂, reducen la ansiedad en roedores (Díaz-Véliz y cols., 1997; Schreiber y de Vry, 1993). En términos generales, podemos decir que tanto los receptores 5-HT_{1A} como los 5-HT_{1B} y 5-HT₂ participan en las diferentes respuestas asociadas a la ansiedad y la depresión.

2.3. Las catecolaminas en la depresión y la ansiedad

La hipótesis catecolaminérgica de la depresión fue establecida desde 1965 por Joseph Schildkraut, quien, junto con sus colegas, propuso que algunos tipos de depresión son originados por la disminución de las monoaminas cerebrales, la NA, la DA y la 5-HT (*vide supra*), en la sinapsis (Schildkraut, 1965; Musselman y cols., 1998). Esta hipótesis dio la pauta para realizar estudios que evidencian lo siguiente: a) algunos pacientes deprimidos tienen una sensibilidad baja de los receptores α 2-adrenérgicos, medido por la liberación de cortisol ante la administración de desmetilimipramina (Stone y Quartermain, 1999); b) existe una disminución de la actividad del AMP cíclico en respuesta a agonistas β -adrenérgicos, así como en los receptores α 2-adrenérgicos en plaquetas (Charney y cols., 1998); c) la respuesta antidepresiva provocada por los inhibidores selectivos de la recaptura de NA (por ejemplo, reboxetina) no se produce si la NA es depletada (Miller y cols., 1996); d) existe un aumento del número de receptores β -adrenérgicos en la corteza cerebral de víctimas suicidas (Charney y cols., 1994). Como puede observarse, en la depresión existen alteraciones de los diferentes componentes del sistema noradrenérgico; sin embargo, otros sistemas de neurotransmisión también forman parte de la etiología de este desorden complejo (*vide infra*). Sumado a lo anterior se encuentra el hecho de que la depresión no es consecuencia única de la disminución de las monoaminas sino de cambios a nivel de receptores y de segundos mensajeros. Considerando esto, Duman y cols. (1997) han desarrollado otra hipótesis que involucra a otros componentes sinápticos, unificando, de esta manera, la participación tanto de las catecolaminas como de la 5-HT en la depresión. Los autores proponen que el tratamiento de largo plazo con antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la recaptura de 5-HT produce un incremento de la disponibilidad de neurotransmisores en la sinápsis, lo que a su vez, genera la activación sostenida del 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) en algunas regiones cerebrales, entre las que destaca el hipocampo (Nibuya y cols., 1995). A este evento se suceden el aumento de un factor

de transcripción llamado CREB ('cAMP-response element binding protein'), lo cual se logra mediante mecanismos diferentes que dependen de los receptores estimulados: un mecanismo conlleva la activación de proteínas cinasas dependientes del AMP cíclico, en tanto que un segundo mecanismo es regulado por cinasas dependientes de Ca^{++} . La activación e incremento del CREB lleva a la regulación de genes blanco específicos como el Factor Neurotrófico derivado del Cerebro, un miembro de la familia de los factores de crecimiento neural, que interviene en la sobrevivencia de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas (Duman y cols., 1997; Nibuya y cols., 1995). Un punto a favor de esta hipótesis es que la administración de largo plazo de antidepresivos, que tienen como blanco inicial a los sistemas de la 5-HT o la NA, induce la función y expresión del CREB en el hipocampo de la rata (Conti y cols., 2002; Nibuya y cols., 1996), lo que ocurre en un periodo que es equiparable con la latencia de efectos terapéuticos producidos por los antidepresivos. Otro hallazgo interesante es que el estrés provoca la disminución de la expresión del Factor Neurotrófico derivado del Cerebro en el hipocampo (Smith y cols., 1995) y que la administración intracerebral de esta neurotrofina produce acciones antidepresivas en dos modelos animales de depresión (Siuciak y cols., 1997, Shirayama y cols., 2002). Por ello, Duman y cols. (1997) proponen que el estrés y la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal causan la atrofia y la muerte de las neuronas en las estructuras cerebrales involucradas en la depresión, lo que es revertido por acción de los tratamientos antidepresivos.

Por otra parte, la relación de las catecolaminas con la ansiedad queda de manifiesto por lo siguiente: a) la presencia de estímulos generadores de ansiedad provocan la liberación de adrenalina y NA en humanos (López y cols., 1998) y en animales (Curtis y Valentino, 1994); b) algunos pacientes ansiosos tienen bajos niveles de NA y de su metabolito, el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, en el plasma, la orina y el líquido cefalorraquídeo (Charney y cols., 1998); c) la ansiedad es abatida con antidepresivos tricíclicos que inhiben la recaptura de NA, como la

desmetilimipramina (Lydiard y cols., 1993; McDougle y cols., 1993). Además de las evidencias antes mencionadas, se ha considerado que el estrés es un factor crucial en la etiología tanto de la ansiedad como de la depresión. Mediante la investigación en animales se han podido estudiar los mecanismos de respuesta al estrés, principalmente la función de la NA y su asociación con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. La aplicación aguda de estresores o de eventos generadores de temor (ruido, restricción de espacio o la confrontación con depredadores) provoca el aumento de la frecuencia de disparo del *locus coeruleus* (Charney, 1994), un núcleo formado por los somas de neuronas noradrenérgicas ubicadas en el tallo cerebral. Estos estresores también incrementan el uso de la NA en el cerebro de la rata, un evento que se acompaña del aumento de la síntesis del neurotransmisor. Si el estresor es inescapable, la utilización de NA y DA se elevará hasta el agotamiento de las reservas (Anisman y cols., 1991), lo cual explica los bajos niveles de estos neurotransmisores encontrados en algunos pacientes ansiosos (Charney y cols., 1994).

Se ha propuesto que la presencia de un estresor durante un tiempo prolongado lleva a la adaptación del organismo y provoca el equilibrio entre la síntesis y la utilización de estos neurotransmisores, una función que aparentemente está alterada en individuos susceptibles (Anisman y cols., 1991). La adaptación periférica al estrés se lleva a cabo por los glucocorticoides, un sistema hormonal que forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y que está regulado directamente por la NA cerebral. En pacientes deprimidos, dicho sistema hormonal está alterado lo cual se demuestra por el hecho de que la administración de dexametasona no suprime la secreción de cortisol, como sucede en individuos normales (Birkinhager y cols., 1995).

Algunos estudios farmacológicos revelan que los receptores α_2 -adrenérgicos (autorreceptores) regulan la liberación de NA y 5-HT; así, la aplicación de estresores agudos

reduce la sensibilidad de estos receptores y genera ansiedad, un efecto que se reproduce con la administración de un antagonista para este receptor, por ejemplo la yohimbina (Charney y cols., 1994). La administración de tratamientos ansiolíticos, como las benzodiazepinas, reduce la actividad del *locus coeruleus*; en tanto que la administración crónica de antidepresivos tricíclicos, por ejemplo la desmetilimipramina, regula a la baja a los receptores α_2 - y β -adrenérgicos, un cambio importante para la producción de los efectos ansiolíticos y antidepresivos de la desmetilimipramina (Stahl, 1998a). En resumen, tanto la ansiedad como la depresión involucran alteraciones a diferentes niveles de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico. Además, existen otros moduladores que también están involucrados en estos desórdenes, por ejemplo, el GABA.

2.4. El sistema GABAérgico en la depresión y la ansiedad

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso de los mamíferos. La mayor parte de las terminales nerviosas centrales posee receptores GABAérgicos, los cuales han sido clasificados en A, B y C (Gee y cols., 1988; Jackel y cols., 1994; Lambert y cols., 1995). Las alteraciones del sistema GABAérgico se han relacionado con patologías como la epilepsia, la ansiedad y la depresión (Majewska, 1992). La participación del GABA en los trastornos del estado de ánimo fue propuesta por Emrich en 1980 y se basó en la observación de que el ácido valproico, un agonista de los receptores GABA_A, es efectivo en el tratamiento de la depresión. Este hallazgo, en conjunto con la detección de los niveles bajos de GABA en el líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos (Emrich, 1980, tomado de Petty, 1995) permitieron sugerir que la depresión era provocada por una disfunción del tono GABAérgico. Los experimentos llevados a cabo en animales apoyan esta propuesta, ya que se ha demostrado que existen bajos niveles del GABA en animales sometidos al paradigma de la desesperanza aprendida (Petty y Sherman, 1981). Este modelo (Seligman y Beagley, 1975, Seligman y cols., 1975) consiste en estresar a los roedores mediante choques eléctricos

(en las patas) inevitables e inescapables, lo que posteriormente (24 hrs ó más) provoca que los animales muestren alteraciones en su capacidad para resolver una situación apremiante. La sesión de evaluación (24 hrs ó más después del estrés) es conducida en una caja con dos compartimentos y cuando el animal se coloca en uno de ellos, recibe nuevamente choques, los cuales puede evitar siempre y cuando cambie de compartimento. Un animal sano escapará al compartimento donde no recibe choques, en tanto que un animal desesperanzado no lo hará. Esta última conducta se define como desesperanza aprendida y es considerada por los autores del modelo como un estado análogo a la depresión padecida por humanos sometidos a estrés crónico. Por ello, Petty y Sherman (1981, *vide supra*) propusieron que la desesperanza (en roedores) y posiblemente la depresión (en humanos) tengan como origen una disminución de los niveles de GABA en el organismo.

El déficit conductual provocado por la desesperanza se revierte (por ejemplo, aumento en el número de escapes) básicamente con antidepresivos tricíclicos, los cuales, se sabe, producen tal acción farmacológica mediante un aumento del número de receptores GABA_B en la corteza frontal (Lloyd y cols., 1985) así como por la regulación a la baja de los receptores β -adrenérgicos (Susdak y Giantusos, 1985). Este efecto antidepresivo se replica con el tratamiento crónico de progabide, un agonista GABA_B (Susdak y Giantusos, 1985), así como con el agonista GABA_A muscimol (Martin y cols., 1989). De manera semejante, los agonistas GABA_A como el muscimol y valproato de sodio, así como el alprazolam, un derivado de las benzodiazepinas, producen un efecto antidepresivo en el modelo de nado forzado, lo que refuerza la idea de la participación del sistema GABAérgico en la depresión.

En relación con la ansiedad, la hipótesis de la participación del GABA está fundamentada por el hecho de que el sitio de reconocimiento a las benzodiazepinas está físicamente asociado al receptor GABA_A (Haefely, 1994). Este receptor es un complejo

pentamérico formado por subunidades de glicoproteínas (α 1-6; β 1-4; γ 1-4 y δ) acopladas a un canal de cloro; además también tienen sitios de reconocimiento para benzodiazepinas, picrotoxina, barbituratos y neuroesteroides que al ser estimulados por sus agonistas modulan al receptor GABA_A (Gee y cols., 1988). Mediante técnicas de registro intracelular se ha demostrado que las benzodiazepinas aumentan la conductancia al cloro, estimulada por GABA, como consecuencia del incremento en la frecuencia de apertura del canal de Cl⁻. Esto induce un estado prolongado de hiperpolarización membranal, así como aumento de la inhibición neuronal en aquellas estructuras que poseen receptores GABAérgicos (Haefely, 1994). Tomando en cuenta esta información, la hipótesis GABAérgica de la ansiedad plantea que ésta se debe a una transmisión GABAérgica disminuída, que es revertida mediante el tratamiento con benzodiazepinas.

La relación entre el GABA y otros neurotransmisores es crucial para la regulación de la ansiedad. La hiperactividad del sistema noradrenérgico genera ansiedad en los humanos y en otros mamíferos (López y cols., 1998). Tal estado es revertido con antidepresivos, opiáceos y benzodiazepinas (Charney y cols., 1994). Por otro lado, el efecto ansiolítico producido por un inhibidor de la síntesis de la 5-HT (para-clorofenilalanina) es abolido por flumazenil y bicuculina, antagonistas de los receptores a benzodiazepinas y a GABA_A, respectivamente (Söderpalm y Engel, 1988). Además, el efecto ansiolítico de algunos agonistas 5-HT_{1A} (buspirona, ipsapirona y 8-OH-DPAT) es bloqueado por el flumazenil, en tanto que el diazepam facilita las acciones ansiolíticas de dosis sub-óptimas de los agonistas 5-HT_{1A} (Fernández-Guasti y López-Rubalcava, 1998). Estos hallazgos indican una relación funcional (y anatómica) entre el GABA, la NA y la 5-HT, y que las interacciones entre moduladores regulan funciones cerebrales que subyacen a la ansiedad y a las acciones farmacológicas de los compuestos ansiolíticos. Cabe agregar que después de 1985, Majewska y cols (1986; 1987) descubrieron que la progesterona y otras progestinas modulan la función del receptor GABA_A-benzodiazepinas (*vide infra*), un

hecho que dió la pauta para la investigación de la participación de las hormonas esteroides en la regulación de la ansiedad y la depresión.

2.5. Las hormonas esteroides en la depresión y la ansiedad

En 1931, Klein describió una serie de síntomas somáticos y emocionales padecidos por algunas mujeres en los días previos a la menstruación, los cuales remitían después del sangrado menstrual. Actualmente, dicho trastorno es conocido como Síndrome Premenstrual y se caracteriza por dolor de cabeza, cambios en el apetito, irritabilidad, ansiedad, labilidad afectiva e incluso estado de ánimo deprimido. Varios grupos de investigación han relacionado los cambios emocionales del periodo premenstrual con la disminución súbita de los niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona, un evento endócrino que trae como consecuencia la menstruación (Endicott y Halbreich, 1988; Halbreich y cols., 1986). De manera semejante, la disminución plasmática de estas hormonas en el periodo post-parto y en la menopausia también se asocia con los episodios de depresión padecidos por algunas mujeres bajo estas circunstancias de su vida (Halbreich y cols., 1990; Sichel y cols., 1995). De hecho, se ha propuesto que los cambios en las emociones y del afecto son consecuencia de un síndrome de abstinencia hormonal (Majewska, 1992).

Uno de los tratamientos farmacológicos para estas patologías es la restitución hormonal. Varios autores han reportado que la terapia reconstitutiva con estrógenos naturales (sintetizados en el organismo) o sintéticos reduce la depresión en mujeres menopáusicas, en paralelo con el incremento en el número de sitios de unión para imipramina en las plaquetas (Best y cols., 1992; Halbreich y cols., 1995; Pearce y cols., 1995). En contraste, la mayor parte de los estudios clínicos en los que se ha evaluado el efecto de la progesterona sobre la depresión y la ansiedad arrojan resultados negativos (para revisión ver Epperson y cols., 1999). Entre los positivos, algunos autores han relacionado los síntomas deletéreos del Síndrome Premenstrual

con los niveles bajos de alopregnanolona, el metabolito reducido de la progesterona, durante la fases folicular (Bicikova y cols., 1998) y lútea (Rapkin y cols., 1997). Otros autores mencionan que la administración de progesterona en forma de supositorios o de contraceptivos orales disminuye la depresión y la ansiedad en mujeres que padecen Síndrome Premenstrual (Baker y cols., 1995; Freeman y cols., 1996). Estas evidencias invitan a seguir explorando las acciones de la progesterona en mujeres que padecen trastornos afectivos asociados a las fluctuaciones hormonales. En este sentido, las investigaciones llevadas a cabo en animales han proporcionado información acerca del papel de las hormonas ováricas como moduladores de la comunicación neuronal y, en consecuencia, de la conducta. Tal función se lleva a cabo mediante su interacción con los receptores a esteroides y a los neuromoduladores involucrados en la regulación de la ansiedad y la depresión.

2.5.1. Los estrógenos, la progesterona y sus receptores

Los estrógenos y la progesterona tienen un amplio espectro de actividad biológica en el organismo de los mamíferos, en los cuales regulan el apareamiento, la reproducción y la agresión, entre otras funciones que permiten la sobrevivencia de la especie. En el sistema nervioso, el estradiol y la progesterona modulan la excitabilidad neuronal (Brann y cols., 1995; Majewska, 1992; Smith y cols., 1998b) y cumplen funciones de protección. Por ejemplo, el estradiol tiene actividad anti-apoptótica en las neuronas de la sustancia nigra (Sawada y cols., 2000), en tanto que la progesterona impide la muerte neuronal provocada por traumatismo experimental (Rott y cols., 1995) y facilita la producción de la vaina de mielina (Baulieu y cols., 1996). Estas y otras propiedades han permitido sugerir que ambos esteroides posiblemente tienen un papel como neuroprotectores ante eventos dañinos.

En las hembras, el estradiol y la progesterona son sintetizados a partir del colesterol en los ovarios y la placenta. Las acciones de estas hormonas se producen después de que se

unen a receptores intracelulares o membranales (Brann y cols., 1995). El mecanismo de acción clásico de las hormonas gonadales involucra el paso de los esteroides hacia el interior de la célula mediante un proceso de difusión pasiva. En este compartimento, la hormona se une a los receptores citoplasmáticos con los cuales forma un complejo molecular que se traslada al núcleo y genera cambios en la transcripción del RNA mensajero, y en consecuencia, en la síntesis de proteínas (Brann y cols., 1995; Mahesh y cols., 1996). Los efectos de los esteroides producidos a través de este mecanismo genómico se producen a largo plazo, es decir, en un periodo de horas o incluso días (McEwen, 1991). Mediante este mecanismo, los estrógenos promueven la síntesis de nuevas proteínas, entre ellas algunas que regulan la excitabilidad neuronal como las enzimas reguladoras de la síntesis de 5-HT y NA (triptofano hidroxilasa y tirosina hidroxilasa, respectivamente), los receptores a 5-HT (Biegon y cols., 1982; Kendall y cols., 1981) y a GABA (Canonaco y cols., 1993a; 1993b), entre otras.

Los receptores intracelulares a estrógenos se encuentran en dos isoformas, la α y la β , que son codificadas por genes independientes. La isoforma β es considerada la más importante para las acciones de los estrógenos y se expresa en el sistema nervioso central, el sistema inmune, el tracto urogenital, los riñones y los pulmones (Gustafsson, 1999). Recientemente, los receptores a estrógenos han sido considerados como factores de transcripción que regulan las acciones de otras sustancias (Gustafsson, 1999) por ejemplo, de la progesterona. Como es bien conocido, los estrógenos inducen la síntesis de los receptores a progesterona (Brann y cols., 1996; Mahesh y cols., 1995). De manera similar a los estrógenos, la progesterona se une a dos diferentes receptores intracelulares denominados A y B, que son derivados de un solo gen (Guerra-Araiza y cols., 2000). En la rata hembra, la fase del ciclo estral influye en la expresión ambas isoformas del receptor a progesterona en las estructuras cerebrales. Por ejemplo, durante el proestro (ver apéndice V) hay un aumento en la isoforma B en el hipotálamo así como una disminución de estos receptores en el área preóptica. Este evento coincide con el

aumento de los receptores y de la concentración de estrógenos en el hipotálamo (Guerra-Araiza y cols., 2000).

Existe otro mecanismo por medio del cual las hormonas esteroides promueven efectos inmediatos. En los tejidos excitables, la progesterona y otras progestinas se unen a un sitio de reconocimiento a neuroesteroides ubicado en los receptores GABA_A (Gee y cols., 1988). De esta forma, la hormona precursora de la progesterona (pregnenolona) actúa como un modulador negativo del receptor GABA_A, en tanto que el metabolito reducido de la progesterona (alopregnanolona) modula positivamente a este receptor (Lambert y cols., 1995; Mienville y Vicini, 1989). La progesterona facilita el efecto de hiperpolarización neuronal estimulado por GABA, ya que aumenta la frecuencia de apertura del canal de cloro (Paul y Purdy, 1992) y se ha propuesto que este mecanismo es el responsable de las acciones anti-convulsivantes, sedantes, hipnóticas, analgésicas y ansiolíticas de la hormona (Bitran y cols., 1993; 1995; Frye y Duncan, 1994; Kokate y cols., 1998; Majewska, 1992; Picazo y Fernández-Guasti, 1995; Rupprecht, 1997). Recapitulando, los estrógenos y la progesterona regulan la actividad neuronal mediante dos mecanismos de acción, con los cuales generan efectos a corto y largo plazo en el sistema nervioso central.

2.5.2. Las hormonas ováricas en modelos animales de depresión y ansiedad

En la última década, varios autores han reportado que los cambios hormonales producidos a lo largo del ciclo estral de la rata (apéndice V) intervienen en la regulación del estado de alerta y de la ansiedad. Así, durante la fase del proestro tardío existe una disminución espontánea de la ansiedad que no se presenta en las otras fases del ciclo o en las ratas ovariectomizadas (Fernández-Guasti y Picazo, 1992). El proestro se caracteriza por las concentraciones elevadas de estradiol y progesterona (Freeman, 1988), por lo que la ansiólisis encontrada en estos animales parece estar favorecida por este cambio endocrino. Algunos

experimentos posteriores demostraron que la progesterona es la hormona crucial en la ansiólisis encontrada durante el proestro e incluso tales experimentos fueron conducidos utilizando diferentes modelos animales de ansiedad como la prueba de enterramiento defensivo (Fernández-Guasti y Picazo, 1992; 1995), el laberinto de brazos elevados (Bitran y cols., 1991a, 1993, Bitran y Dowd, 1996) y los paradigmas de conflicto (Díaz-Véliz y cols., 1994). Por otro lado, los estrógenos *per se* no modifican la ansiedad experimental (Fernández-Guasti y Picazo, 1992; Galeeva and Tuohimaa, 2000) e incluso se sabe que no son necesarios para que la progesterona produzca sus acciones ansiolíticas.

Las variaciones en la ansiedad son detectables en otras etapas endócrinas, ya que se ha encontrado una disminución de la ansiedad en ratas en el segundo tercio de la gestación (Picazo y Fernández-Guasti, 1993) y en ratas lactantes (Bitran y cols., 1991a; 1991b). La gestación de la rata es de 21 días y durante los días 14 a 21 se produce un aumento de la concentración plasmática y cerebral de la progesterona. Mediante experimentos *in vitro* también se ha encontrado que del día 10 al 19 de gestación se incrementa la concentración de esteroides reducidos como la alopregnanolona y la tetradihidro-desoxicorticosterona (Concas y cols., 1998). Dado que estas hormonas modulan positivamente al receptor GABA_A, la ansiólisis encontrada en las ratas gestantes es atribuible a las acciones de estas hormonas sobre el sistema GABAérgico.

En contraste con lo reportado para la ansiedad experimental, el papel de la progesterona en la depresión ha sido escasamente estudiado. Bernardi y cols. (1989) demostraron que el tratamiento con progesterona o estradiol durante 4 días reduce la inmovilidad en ratonas evaluadas en la prueba de suspensión del rabo. Este efecto fue análogo al encontrado por la desmetilimipramina (Stèru y cols., 1985), lo que se traduce en que ambas hormonas tienen actividad antidepresiva (Bernardi y cols., 1989). Recientemente, Molina-Hernández y cols.

(2000) encontraron que la progesterona incrementa la capacidad de las ratas para obtener una recompensa que, generalmente, es alimento. El paradigma utilizado fue el de la respuesta operante para frecuencia baja de reforzamiento ("differential operant responding for low reinforcement" o "DRL72"), que consiste en proporcionar una recompensa cuando los animales oprimen una palanca. El palanqueo deberá ocurrir después de 72 segundos de espera por parte del animal; si las ratas se apresuran a oprimir la palanca les es negada la recompensa. En este modelo, los antidepresivos clásicos disminuyen la frecuencia de palanqueo y en consecuencia, aumentan la frecuencia de recompensa. Estos resultados se interpretan como un aumento en la motivación para esperar por un evento gratificante (Weiss y Kilts, 1998). Considerando el fundamento del modelo, se propone que la progesterona tiene acciones antidepresivas ya que su efecto es idéntico al de los antidepresivos clásicos, como la clorimipramina (Molina-Hernández y cols., 2000).

En relación con los estrógenos, Rachmann y cols (1998) encontraron que el tratamiento por 7 días con benzoato de estradiol (10 µg) reduce la inmovilidad en la prueba de nado forzado, en paralelo con una reducción del número de núcleos celulares inmunopositivos a cfos en el giro del cíngulo y los núcleos paraventricular y centromedial del hipotálmo. Dado que la prueba de nado forzado es sensible a los antidepresivos (Porsolt y cols., 1977) y que las hormonas ováricas al parecer tienen propiedades antidepresivas, es posible que este modelo animal detecte cambios conductuales asociados a las oscilaciones hormonales propias del ciclo estral de la rata.

Por otra parte, resulta interesante el hecho de que las hormonas ováricas modulen el efecto de algunos fármacos psicoactivos. Fernández-Guasti y Picazo (1990) encontraron que las acciones ansiolíticas del diazepam son facilitadas durante la fase de proestro en la rata, así como por la administración de progesterona pero no de estradiol. Tomando en cuenta el

mecanismo de acción de la hormona y el fármaco, el resultado sugiere acciones conjuntas del diazepam y de la progesterona sobre el sistema GABAérgico. Los reportes clínicos señalan una interacción semejante para las benzodiazepinas, dado que los efectos farmacológicos del triazolam (ansiólisis, sedación y aumento del deterioro cognitivo) fueron máximos cuando se administró progesterona de manera conjunta (Yonkers y Chantilis, 1995). En otro estudio, tal facilitación fue correlacionada con concentraciones elevadas de alopregnanolona plasmática (De Wit y Rukstalis, 1997). Si consideramos las desventajas de las benzodiazepinas, como la tolerancia y la dependencia física, una alternativa terapéutica a tomar en cuenta son los antidepresivos (Nutt y Glue, 1991). Varios reportes clínicos han sugerido una posible interacción farmacológica entre los tratamientos antidepresivos y las hormonas ováricas, particularmente los estrógenos, en la regulación de la depresión (Amsterdam y cols., 1999; Epperson y cols., 1999; Oppenheim, 1983; Stahl, 1998b). Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios en animales que aporten información más precisa acerca de la posible interacción entre ambos compuestos en relación con la ansiedad.

CAPITULO III

3.1 Justificación

Las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, participan en los cambios del estado de ánimo de las mujeres. Algunos trabajos clínicos señalan que los estrógenos tienen actividad antidepresiva, sin embargo, existen pocas evidencias acerca de la participación de la progesterona en la depresión. Así mismo, se ha descrito que las hormonas ováricas modifican el efecto farmacológico de algunos psicofármacos, aunque a la fecha no se han realizado estudios sistemáticos que demuestren bajo que condiciones se lleva a cabo tal regulación hormonal.

3.2 Hipótesis

Las oscilaciones hormonales ováricas características del ciclo estral de la rata modifican los efectos ansiolítico y antidepresivo producidos por la desmetilimipramina. Así, cuando las concentraciones de estradiol y progesterona están elevadas se producirá un incremento de estos efectos farmacológicos generados por el tratamiento con la desmetilimipramina.

3.3. Objetivos

General

Analizar si el estradiol y la progesterona modifican los efectos antidepresivo y ansiolítico producidos por la desmetilimipramina.

Particulares

1) Explorar si las hormonas ováricas modifican de manera espontánea la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado o el efecto antidepresivo de la desmetilimipramina evaluado en el mismo modelo.

2) Determinar si la progesterona produce un efecto anti-inmovilidad en la prueba de

nado forzado.

3) Definir si las oscilaciones hormonales ováricas del ciclo estral ejercen alguna influencia en el efecto ansiolítico de la desmetilimipramina.

4) Determinar la participación del estradiol, la progesterona o de su combinación en el efecto ansiolítico de la desmetilimipramina.

CAPITULO IV

Material y Métodos

4.1. Sujetos

Se utilizaron ratas hembras, adultas (3 meses de edad, 250 g de peso), de la cepa Wistar. Dependiendo de los experimentos, las hembras fueron estudiadas bajo dos condiciones endocrinas: ovariectomizadas o intactas. Estas últimas fueron asignadas a grupos independientes de acuerdo a la fase del ciclo reproductivo, que fue determinada mediante el método de la citología vaginal. Las hembras ovariectomizadas fueron habituadas al contacto con el experimentador, con el fin de evitar diferencias en su respuesta respecto a las ratas intactas.

4.2. Frotis vaginal

Se tomó una muestra de las células de la vagina de la rata con ayuda de un gotero que contenía dos gotas de NaCl al 0.9 %. La preparación en fresco se observó al microscopio (10 X) para determinar las características de las células epiteliales, así como la presencia de leucocitos. Las fases de ciclo se definieron de la siguiente manera (ver Apéndice V): proestro, caracterizada por un predominio de células epiteliales nucleadas; estro, con predominio de células epiteliales cornificadas; metaestro o diestro I, con células epiteliales cornificadas y leucocitos; diestro o diestro II, con predominio de leucocitos (Freeman, 1988). La toma de frotis se inició dos semanas antes del inicio de los tratamientos farmacológicos, con el fin de registrar al menos dos ciclos estrales completos.

4.3. Pruebas conductuales

El efecto de la fase de ciclo, el estradiol, la progesterona y la desmetilimipramina se evaluó en los siguientes modelos animales: la prueba de nado forzado, (Porsolt y cols., 1977); el laberinto de brazos elevados (Pellow y cols., 1985) y la prueba de enterramiento defensivo

(Pinel y Treit, 1978).

Prueba de nado forzado

En nuestros experimentos, la prueba de nado forzado inició al introducir a las ratas individualmente en un estanque rectangular (40 X 20 cm de base X 60 cm de altura) que contenía agua a 25 ± 1 °C. La profundidad del agua debía permitir que los animales tocaran el fondo del estanque con las patas y el rabo, por lo que fue necesario determinar la longitud de cada animal antes de depositarlo en el estanque. En la pre-prueba, los animales fueron sometidos a estas condiciones durante 15 minutos; 24 h más tarde se cuantificó el tiempo de inmovilidad, así como la latencia a la aparición del primer periodo de inmovilidad. La duración de esta última sesión fue de 5 min. La disminución del tiempo de inmovilidad así como el incremento de la latencia al primer periodo de inmovilidad se interpretaron como efectos antidepressivos (Contreras y cols., 1995; Espejo y Minano, 1998).

De manera adicional, se registró la actividad ambulatoria de los animales con el fin de descartar que los cambios conductuales en la prueba de nado forzado estuvieran asociados a alteraciones locomotoras. Este registro se llevó a cabo en una caja de acrílico (33 X 44 X 20 cm) con el piso dividido en cuadros (11 X 11 cm). El parámetro evaluado fue el número de cuadros cruzados en 5 min de registro.

Modelo de conducta defensiva de enterramiento

Antes del registro conductual, las ratas fueron alojadas individualmente, por 72 hrs, en cajas de acrílico de 27 x 16 x 23 cm; posteriormente, el registro se realizó en una caja idéntica a la del alojamiento, cuyo piso está cubierto con una capa de aserrín triturado finamente. Una de las paredes de la caja tiene adherido un electrodo, que a su vez fue conectado a un estimulador. Cuando los animales se acercan al electrodo con el fin de explorarlo, reciben uno ó más choques a los que responden cubriendo el electrodo con la aserrín (Pinel y Treit, 1978;

Pinel y cols., 1980). El registro tiene una duración de 10 min y durante éste periodo se cuantifican a) la conducta de enterramiento, es decir, el tiempo (seg) que los animales invierten en cubrir el electrodo con el aserrín, durante los 10 min que dura la prueba; esta variable es una medida directa de la ansiedad; b) la latencia de enterramiento, que es el tiempo transcurrido desde que el animal recibe el primer choque hasta que empieza a presentar la conducta de enterramiento; esta medida refleja la reactividad o tiempo de reacción de los animales y permite distinguir el efecto ansiolítico del sedante y, c) el número de choques eléctricos, una medida que sirve para descartar posibles efectos analgésicos de los compuestos evaluados. Un ansiolítico clásico, por ejemplo el diacepam a las dosis de 1-2 mg/kg, reduce el tiempo de enterramiento, sin modificar la latencia ni el número de choques eléctricos.

Para descartar que los tratamientos aplicados afecten la motricidad de los animales, se registró la actividad ambulatoria de éstos en una caja de acrílico (33 X 44 X 20 cm) que fue colocada sobre una placa sensible (Lafayette Co) conectada a un contador automático. Los movimientos de los animales detectados por el dispositivo fueron expresados como número de cuentas por 10 min de registro (No. cuentas/10 min).

Laberinto elevado en cruz

El laberinto de brazos elevados (Pellow y cols., 1985) es un dispositivo formado por 4 brazos (50 X 10 cm, cada uno), los cuales están colocados en forma de cruz, sobre una plataforma elevada a 50 cm de la base. Dos brazos están cerrados por paredes (20 cm de altura) mientras que los otros dos carecen de protección. Una vez colocados en el aparato, los animales exploran brevemente el dispositivo hasta que se ubican en los brazos cerrados, es decir, en la parte que ofrece mayor protección. El tratamiento con benzodiazepinas permite que los animales permanezcan más tiempo en los brazos abiertos, lo cual se interpreta como un efecto ansiolítico. Otro parámetro evaluado es el número de veces que el animal cruza de un

brazo a otro, esta medida refleja la actividad motriz de los animales, la cual no debe disminuir por efecto del ansiolítico (Pellow y cols., 1985).

4.4. Estadística

Los resultados obtenidos fueron analizados usando las pruebas estadísticas ANOVA de una vía para grupos independientes, ANOVA de dos vías para grupos independientes y ANOVA de una vía para medidas repetidas. Las pruebas post hoc utilizadas fueron Dunnet, Dunn y Student Newman Keuls, las cuales fueron aplicadas sólo en caso de ser halladas diferencias significativas de al menos $p < 0.05$ en los ANOVAS.

CAPITULO V

Resultados

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



DESIPRAMINE RESTRICTS ESTRAL CYCLE OSCILLATIONS IN SWIMMING

CARLOS M. CONTRERAS, LUCÍA MARTÍNEZ-MOTA and MARGARITA SAAVEDRA.

Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana
and
Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.

(Final form August 1998)

Abstract

Contreras Carlos M., Lucía Martínez-Mota and Margarita Saavedra: Desipramine Restricts Estral Cycle Oscillations in Swimming. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 1998, 22, pp. 1121-1128. © 1998 Elsevier Science Inc.

1. Desipramine (DMI) is a tricyclic antidepressant which reduces the immobility in rats forced to swim; however, it is unknown whether estral cycle phases impinge on DMI actions on immobility in daily swimming tests during several weeks.
2. In female wistar rats, vaginal smears taken before testing defined four estral phases. Afterwards, the authors assessed the latency for the first period of immobility in five-min forced swim tests practiced on 21-day DMI (DMI group), 21-day washout saline given after a 21-day DMI treatment (washout-saline group), or non-treated rats (control group).
3. We observed a longer latency for the first period of immobility in proestrus-estrus from the control and washout-saline groups. The 21-day treatment with DMI (2.1 mg/kg i.p., once a day) significantly ($p < 0.001$) increased the latency by about 160% from control regardless of the estral cycle phase.
4. It is concluded that proestrus-estrus relates to increased struggling behavior. DMI enhances struggling behavior independently of hormonal state.

Key words: antidepressants, depression-modulation, desipramine, estral cycle, forced-swim.

Abbreviations: desipramine (DMI).

Introduction

Desipramine (DMI) is a tricyclic antidepressant which, locally applied on the dorsal hippocampus (Kostowsky, 1985) or injected by systemic route, reduces immobility in rats forced to

swim (Danysz *et al.*, 1988; Cervo and Samanin, 1987), a test suitable for assaying the potency of antidepressant drugs (Porsoit *et al.*, 1977; Porsoit and Lenègre, 1992; Borsini and Meli, 1988).

The action of some drugs is related to the estral cycle; for instance, the reduction of anxiety, as measured by the burying behavior test, is reduced by some 5-HT_{1A} receptor agonists, a pharmacological action that improves in proestrus (Fernández-Guasti and Picazo, 1990). It is uncommon to find differences in immobility in the forced swim test related to any estral cycle phase (Alonso *et al.*, 1991) when the animals are tested once; however, it is unknown whether the action of DMI on the repetitive swimming test is modified in any given estral cycle phase. In fact, DMI interacts among other membranal receptors, with the GABA_A receptor/benzodiazepine/chloride ionophore complex (Fernández-Teruel *et al.*, 1990), the same receptor for which progesterone exerts its membranal actions (Majewska, 1992; Robel and Baulieu, 1994). The action of DMI on adrenoceptors is likely to be modulated by endogenous substrates such as estradiol (Heal *et al.*, 1988) and triiodothyronine (Heal *et al.*, 1987), reinforcing the possibility of interactions of DMI with estral cycle phases. In consequence, the authors tested the long-term DMI action on rats swimming daily for 21 days after the estral cycle phase had been determined through the microscopic examination of vaginal smears.

Material and Methods

Animals

This study included young female wistar rats (60 days, 200-250 gr) maintained in housing facilities, 6 to a cage, with an artificial light-darkness cycle of 12:12 hrs (light ON at 7:00 a.m.), at a mean temperature of 25 °C (± 1), and *ad lib* access to water and food.

Experimental Design

Vaginal smears taken five minutes before the behavioral tests defined four estral cycle phases (estrus, proestrus, metestrus and diestrus). The first experimental (n=6) group received a 21-day DMI treatment (2.14 mg/kg, dissolved in 0.12 ml saline; i.p. once a day). The second group (n=6) having been tested during the post-DMI washout saline treatment underwent an identical treatment with DMI followed by a 21-day washout-saline treatment. A control group (n=6)

consisted of rats matched according to age and submitted to similar handling and procedures during six weeks, except for injections. In all groups, the behavioral tests were applied once a day, seven-days-a-week, between 10:00 a.m. and 1:00 p.m., 120 min after DMI or washout-saline injections.

Behavioral Tests

In order to assess any influence of locomotor activity on the swimming test, a 5-min video-taped open-field test preceded the 5-min video-taped swimming test. The apparatus consisted of a rectangular pool (30 X 50 X 60 cm) filled with warm water (25 °C) to a level of 18-21 cm. After each forced swim session, the rats were dried in a warm (30 ± 1 °C) chamber. Two observers reviewed the video-tapes and assumed immobility when the rat touched the bottom of the pool with one paw plus the tail, or with two paws, thereby measuring the latency for the first period of immobility.

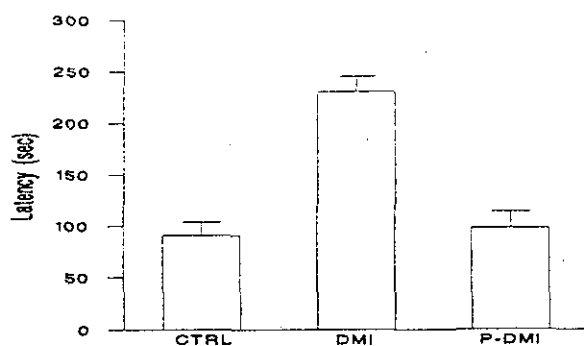
Analysis of Data

Data were analyzed through the two-way ANOVA test and subsequently by the Newman-Keuls' test when a reliable $p < 0.05$. Results are expressed as mean ± SEM. The analysis comprised three weeks of testing the treatments applied to the control, DMI and washout-saline groups. Lastly, well documented differences in hormonal levels throughout the estral cycle in the rat (Feder, 1981; Freeman, 1988) allowed grouping of estral cycle phases in proestrus-estrus and metestrus-diestrus.

Results

The overall effect of daily swimming on the control group consisted of a significant sustained decrease in crossing in the open-field test ($p < 0.05$), and a progressively increased latency for the first period of immobility ($p < 0.01$). DMI largely reduced locomotor activity in DMI-treated and washout-saline groups, as compared to the control group ($p < 0.001$).

DMI increased the latency for the first period of immobility ($p < 0.001$) in comparison to both the control-group and the washout-saline group (Fig 1), but DMI did not affect estral cyclicity.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 1. The latency for the first period of immobility increased regardless of estral cycle during the treatment with desipramine (DMI), but during the washout saline treatment (P-DMI) the latency returned to that observed in the control group (CTRL).

In the control group tested daily during 21 days and in the 21-day washout-saline group, the latency to the first period of immobility appeared greater in proestrus-estrus as compared to metestrus-diestrus ($p < 0.05$). These differences related to the estral cycle disappeared in the DMI-treated group (Fig. 2). Therefore, the main effect of DMI consisted of a significantly increased latency for the first period of immobility ($p < 0.001$), independently of the estral phase.

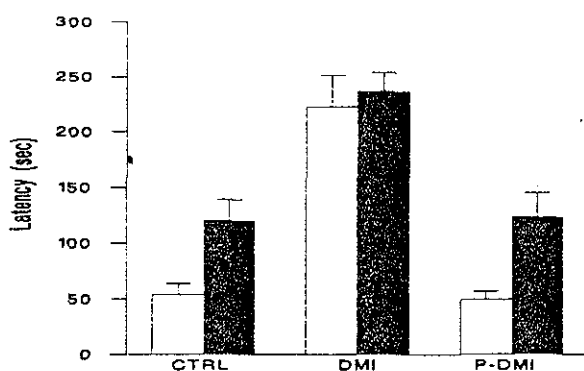


Fig 2. The latency to the first period of immobility increased in proestrus-estrus (dashed bars) as compared to metestrus-diestrus (open bars), in the control and washout-saline groups. DMI treatment increased latency regardless of estral cycle phases.

Discussion

Even though that hormonal levels were not assessed, there is note worthing evidence for assume that proestrus-estrus in concurrent with high levels of estradiol and progesterone (Feder, 1981; Freeman, 1988), therefore these two estral cycle fases were considered together. The most relevant findings in the present paper may be summarized as follows: the enlarged latency to the first period of immobility observed in proestrus-estrus in the control and washout-saline groups vanished in the DMI-treated group; instead, DMI increased the latency for immobility, although it lowered locomotor activity, regardless of the estral cycle phases.

DMI Action

DMI produced a significant decrease in crossing in the 5-min open field test. This finding is in agreement with other study (Wieland and Lucki, 1990). The contribution of the present study consisted on the observation that the effects of DMI on crossing appeared during 21 days of treatment and continually decreased after the treatment was discontinued for 21 days.

In the control group, daily testing during six weeks produced a progressively lowered locomotor activity as well as a decreased immobility in the forced swim test. Repetitive injection may be discarded as influencing immobility (Hilakivi-Clarke, 1992); however, the latency for the first period of immobility in the control group proved to be similar to that observed in the washout-saline group, even though this group underwent a six-week period of injections and a three-week period of behavioral testing, which suggests that DMI treatment modified the progression of habituation to the test.

An Adaptive Response

Commonly, the forced swim test is applied only once 24 h after a 15-min habituation session. In the test session at least three patterns of behavior are observed. In the first, the rats vigorously move from one side of the pool to the other, and occasionally submerge. In the second pattern, the rats keep afloat by making only minimal movements. In the third, they extend their body until they touch the bottom with the two legs or one leg plus the tail, maintaining a resting position (Porsolt et al., 1977). The third pattern may be considered as an adaptive response which only partially solves the problem and is different from the other two patterns of behavior (Hawkins et al., 1978; West, 1990). We used precisely this pattern to evaluate immobility and although this adaptive

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

response may be considered as despaired behavior, its measurement could be useful for testing animals several times, since it uncovered some differences related to the estral cycle phase in their effort to solve an unsolvable problem.

Increased Struggling

Present results indicate that the animals, after being overtrained, selected a more useful strategy than simply keeping themselves safe by touching the bottom of the pool. An attempt at increased swimming arose, which was possibly related to hormonal levels of estradiol and progesterone during proestrus-estrus (Freeman, 1988; Feder, 1981) in the control (non-treated) and the washout-saline groups. In the present study, the rats were submitted to the stress represented by daily swimming, but it is hard to assume that DMI eventually reduced immobility. It is more acceptable to suppose that, regardless of the hormonal state, DMI increased struggling to higher levels than those observed in the absence of treatment.

Conclusion

After repeated exposure to the swimming test, the rats increase their latency for an adaptive response consisting on touching the bottom of the pool, which allows them to maintain themselves with a minimum of effort. The latency for this adaptive response appears spontaneously increased in proestrus-estrus. The DMI long-term treatment detains this adaptive behavior regardless of the estral cycle phase; instead, an attempt to solve the problem develops in the form of an increased struggling behavior.

Acknowledgements

The authors thank Warren R. Haid for revising the manuscript. This work was partially supported by Grant No. 2498PH from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

References

- ALONSO, S. J., CASTELLANOS, M. A., ALFONSO, D. and RODRIGUEZ, M. (1991) Sex Differences in Behavioral Despair: Relationships Between Behavioral Despair and Open Field Activity. *Physiol. Behav.* **49**: 69-72.
- BORSINI, F. and MELI, A. (1988) Is The Forced Swimming Test a Suitable Model for Revealing Antidepressant Activity? *Psychopharmacology* **94**: 147-160.
- CERVO, L. and SAMANIN, R. (1987) Evidence That Dopamine Mechanisms in the Nucleus Accumbens are Selectively Involved in the Effect of Desipramine in the Forced Swimming Test. *Neuropharmacology* **26**: 1469-1472.
- DANYSZ, W., PLAZNIK, A., KOSTOWSKI, W., JARBE, T. U. C., HILTUEN, A. J. and ARCHER, T. (1988) Comparison of Desipramine, Amitriptyline, Zimelidine and Alproclate in Six Animal Models Used to Investigate Antidepressant Drugs. *Pharmacol. Toxicol.* **62**: 42-50.
- FEDER, H. H. (1981) Estrous Cyclicity in Mammals. In: *Neuroendocrinology of Reproduction Physiology and Behavior*, N. T. Adler (Ed.), pp 279-348, Plenum Press, New York.
- FERNÁNDEZ-GUASTI, A. and PICAZO, O. (1990) The Actions of Diazepam and Serotonergic Anxiolytics Vary According to the Gender and the Estrous Cycle Phase. *Pharmac. Biochem. Behav.* **37**: 77-81.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A., ESCORIHUELA, R. M., BOIX, F. and TOBEÑA, A. (1990) Picrotoxin Changes the Effects of Imipramine and Desipramine in Rats in the Forced Swimming Test. *Eur. J. Pharmacol.* **181**: 35-41.
- FREEMAN, M. E. (1988) The Ovarian Cycle of the Rat. In: *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. Neil (Eds.), pp 1893-1912, Raven Press, New York.
- HAWKINS, J., HICKS, R. A., PHILLIPS, N., and MOORE, J. D. (1978) Swimming Rats and Human Depression. *Nature* **274**: 512.
- HEAL, D. J., BRISTOW, L. J., DE SOUZA, R. J., BLOOMFIELD, G., HURST, E. M. and ELLIOTT, J. M. (1988) The Influence of Injection of Oestradiol to Female Rats on Changes in Alpha2- and Beta-adrenoceptor Function Induced by Repeated Administration of Desipramine or Electroconvulsive Shock. *Neuropharmacology* **27**: 1151-1159.
- HEAL, D. L., BRISTOW, L. J., ELLIOT, J. M., BLOOMFIELD, J. G., CATTO, L. C. and ATTERWILL, C. K. (1987) The Influence of L-triiodothyronine (T3) on The Effects of Administration of Desipramine Electroconvulsive Shock on Alpha2- and Beta-adrenoceptor Function in the Brain of the Rat. *Neuropharmacology* **26**: 1131-1139.
- HILAKIVI-CLARKE, L. A. (1992) Injection of Vehicle is Not an Stressor in Porsolt's Swim Test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **42**: 193-196.
- KOSTOWSKI, W. (1985) Possible Relationship of the Locus Coeruleus Hippocampal Noradrenergic Neurons to Depression and Mode of Action of Antidepressant Drugs. *Pol. J. Pharmacol.* **37**: 727-743.

- MAJEWSKA, M. D. (1992) Neurosteroids: Endogenous Bimodal Modulators of the GABA_A Receptor: Mechanism of Action and Physiological Significance. *Prog. Neurobiol.* **38**: 379-395.
- PORSOLT, R. D., PICHON, M. L. and JALFRE, M. (1977) Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments. *Nature* **266**: 730-735.
- PORSOLT, R. D. and LENÈGRE, A. (1992) Behavioral Models of Depression. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. J.M. Elliot, D. J. Heal and C. A. Maisden (Eds.), pp 73-85, John Wiley & Sons Ltd., New York.
- ROBEL, P. and BAULIEU, E. E. (1994) Neurosteroids. Biosynthesis and Function. *Trends Endocrinol. Met.* **5**: 1-8.
- WEST, A. P. (1990) Neurobehavioral Studies on Forced Swimming: the Role of Learning and Memory in the Forced Swim Test. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* **14**: 863-877.
- WIELAND, S. and LUCKI, I. (1990) Antidepressant-like Activity of 5-HT_{1A} Agonists Measured with The Forced Swim Test. *Psychopharmacology* **101**: 497-504.

Inquiries and reprint request should be addressed to:

Dr. Carlos M. Contreras
PO BOX 320,
Xalapa 91000,
Veracruz, México

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

ORIGINAL ARTICLE

Progesterone Reduces Immobility in Rats Forced to Swim

Lucía Martínez-Mota,* Carlos M. Contreras,*** and Margarita Saavedra*

*Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F., Mexico

Received for publication July 1, 1998; accepted April 13, 1999 (98/064).

Background. Among its behavioral actions, progesterone reduces anxiety in several species including humans; however, any antidepressant-like properties remain to be explored.

Methods. In the present study, Wistar rats received injections (i.p.) of progesterone (0.20–3.0 mg/kg) 24 and 2 h before being submitted to the forced swim, a test in which antidepressants regularly reduce immobility and exert few or no actions on locomotor activity. In order to discard the cumulative effects of progesterone and a possible effect from the repetition of the swimming test, all animals received one of several progesterone doses in a different sequence following a completely randomized experimental intrasubject design.

Results. Ovariectomy did not modify immobility in the forced swim test as compared to control tests practiced before surgery. A dose of 0.80 mg/kg strongly reduced the total time of immobility in forced swim test ($p < 0.001$), but did not modify locomotor activity. In a drug-free control test applied 1 week after the last injection of progesterone, immobility returned to the higher values observed in the control tests.

Conclusions. From these results, it is concluded that progesterone may possess some antidepressant-like activity. © 1999 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Antidepressants, Depression, Forced swim test, Rat, Progesterone.

Introduction

Progesterone exerts multiple actions on the nervous system, including a neuroprotective action against cerebral infarct caused by experimental occlusion of the middle cerebral artery in rats (1), the promotion of myelination in the central and peripheral nervous systems (2), and the possession of anticonvulsant properties (3) through potentiation of the GABA-evoked Cl^- currents (4).

From its striking behavioral actions, the anxiolytic properties of progesterone have long been recognized in humans (5–7). Similarly, the exogenous administration of progesterone in estradiol-primed rats reduces anxiety (8). Low levels of anxiety are concurrent with high levels of circulating progesterone occurring spontaneously throughout the estrous cycle (9) and pregnancy (10). In addition, progester-

one produces some anxiolytic actions in both estrogen- (8) and non-estrogen-primed rats (9,11). However, while some antidepressant drugs produce anxiolytic effects (12), some anxiolytics also produce antidepressant actions (13,14). Progesterone consistently restores immobility to control values in the tail suspension test in ovariectomized mice (15); however, the action of progesterone in other tests that measure the antidepressant activity of drugs more specifically remains to be explored.

In the present study, we describe the changes that exogenous administration of progesterone elicited in the immobility measured in rats forced to swim. The validity of this experimental model in monitoring the potency of antidepressant drugs has been extensively discussed (16–23), the conclusion being that antidepressants reduce immobility, with few or no effects on locomotor activity. This is a different action from that exerted by anxiolytics, because these compounds commonly reduce locomotor activity and increase immobility in the forced swim test (16). We, therefore, tested the effect of ovariectomy and the administration of progesterone in rats forced to swim.

Address reprint requests to: Dr. Carlos M. Contreras, P.O.B. 320, 91000 Xalapa, Veracruz, México. Fax: (+52) (28) 125748. E-mail: cmc@bugs.invest.uv.mx

Materials and Methods

Wistar rats (aged 3 months, weighing 250–300 g) were used for this study following strict principles of animal care (NIH publication No. 86-23, revised 1985). The rats were assigned to one of two groups, vehicle or progesterone, and housed 4 to 5 rats per cage at a constant room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) under a 12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 h) with water and food freely available. All animals were anesthetized with ethyl ether and ovariectomized (OVX) from a ventral approach. After surgery, the animals were placed in their home cages for recovery and checked once daily to avoid any additional discomfort.

In both groups of rats, a 15-min pretest habituation session for locomotor activity and forced swim preceded the experimental sessions by 24 h. The first control test (C1) was applied 1 week before ovariectomy, with the majority of the rats in diestrus (80%); the second test was done 2 weeks after surgery (OVX), and from the third through the seventh tests, the animals received saline (NaCl 0.9%) and water-soluble progesterone (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Finally, the eighth test was done 1 week after the last injection of progesterone or saline (C2). In the experimental group ($n = 9$), each rat underwent once-weekly i.p. injections of water-soluble progesterone in a volume of 0.10 mL (NaCl 0.9%). Progesterone (0.20, 0.40, 0.80, 1.50 and 3.0 mg/kg) was injected 24 and 2 h before behavioral testing (between 10:00 and 12:00 h). To discard the cumulative effects of progesterone and a possible effect from the swimming test repetition, all animals received one of several progesterone doses in a different sequence, following a completely randomized experimental intrasubject design. The control group ($n = 8$) underwent 8 once-weekly swim test sessions. In order to discard a possible influence of progesterone on locomotor activity impinging on the forced swim test, the open field test preceded the measurement of immobility in the forced swim test. The apparatus consisted of an opaque-Plexiglas box ($40 \times 30 \times 20$ cm). A black grid divided the floor into 12 equal squares (10×10 cm). The animals were placed in a corner of the apparatus and the number of times an animal entered a square on four paws during a 5-min videotaped session was counted by two independent observers (any discrepancy implied a re-analysis of the videotape).

Immediately thereafter, the forced swim test was practiced individually in a glass cage ($50 \times 30 \times 60$ cm) containing water ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) at a depth of 19–21 cm, depending on the head-tail length of each rat. After the swimming session, the animals were allowed to recover in a warm, dry chamber. The 5-min videotaped test sessions took place the next day until eight weekly experimental sessions were completed. A rat was judged immobile when it remained floating in the water while making only the necessary movements to keep its head above water. Two observers unaware of the treatment evaluated the total time of immobility.

Because the data failed to follow a normal distribution, the results were analyzed from dosage and treatments by the Friedman test. The Student-Newman-Keuls test was used when at least $p < 0.05$ was attained. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Results

In the open-field test, ovariectomy lowered by 50% the crossing amount observed in the session practiced before the surgery ($p < 0.05$), but progesterone failed to produce changes in crossing after ovariectomy even at the highest dose tested (3.0 mg/kg).

Ovariectomy (OVX) did not produce any significant change in immobility in the forced swim test. Similarly, the weekly repetition of the test produced non-significant changes consisting of some trends to decrease or increase immobility in the saline-treated group throughout the 8 weeks of study, but in any case these oscillations reached the criterion of significance.

In the forced swim test, the total mean duration of immobility throughout the study (eight sessions) significantly decreased ($p < 0.05$) in the progesterone group (16.4 ± 1.85 sec) with respect to the saline group (25.3 ± 5.55 sec), but in the analysis of the weekly sessions, a trend toward decreased immobility at a dose of 0.40 mg/kg of progesterone was found. A dose of 0.80 mg/kg significantly decreased immobility ($p < 0.001$) to less than 30% of that obtained in the control test practiced after ovariectomy (Figure 1). In the post-treatment test practiced 1 week after the last injection of progesterone, the immobility values (C2, $25.3 \pm$

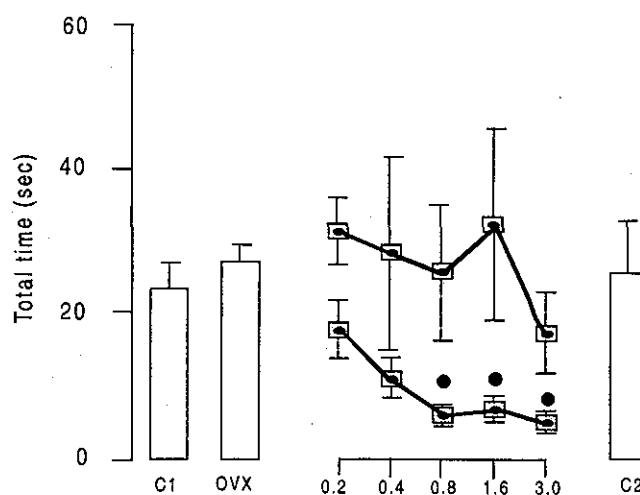


Figure 1. Total time in immobility. Progesterone reduced immobility from a dose of 0.80 mg/kg and immobility returned to control values (C2) 1 week after the last injection of progesterone. Open symbols correspond to saline group and filled symbols to progesterone group. * $p < 0.05$ vs. C1, OVX and control group.

9.44) returned to the values observed in the control test (Cl 23.1 ± 3.88 ; OVX 27.0 ± 6.23) recorded prior to surgery.

Discussion

In this study, we explored some of the antidepressant-like action of progesterone by using the forced swim test. Progesterone shortened the total time spent during immobility in the forced swim test, but failed to show any significant action on locomotor activity, thus behaving as an antidepressant at the dose tested.

The forced swim test is usually applied twice. The first is a habituation (pre-test) session, and the second corresponds to the test session (20,21). In our study, the animals were forced to swim eight times after the pre-test session. We may, however, discard any influence of the repetition of the test on the results based on the following three observations: (a) the repetition of the test in the saline group did not modify immobility in a sustained manner; (b) the administration of progesterone followed a completely randomized design in which all rats received the same dose of progesterone in a different sequence; and (c) in the post-treatment test, practiced after the last injection of progesterone, the values of immobility returned to those obtained in the first (pre-surgery) and second (ovariectomy) control tests.

The results obtained in the present study, in which we used ovariectomized rats not primed with estradiol, suggest direct actions of progesterone on the steroid recognition site in the GABA_A receptor complex (24,25) at a relatively low systemic dose (0.80 mg/kg), because this amount is higher than that required to produce sexual receptivity in estradiol-primed rats (26), but lower than that needed to attenuate the aggressive behavior induced by estradiol and testosterone (27) and that needed to produce a blockade of NMDA receptors (28). Progesterone reduced immobility in a dose-dependent fashion, reaching a maximum effect after 0.80 mg/kg, although changes came after the lower dose (0.40 mg/kg). Additionally, the fact that progesterone produced the aforementioned lowered immobility in rats not primed with estradiol suggests that this effect is independent of the activation of intracellular receptors (29), but dependent on the mediation of the GABA_A/benzodiazepine/ Cl^- channel receptor complex (30,31), which is involved in the anxiolytic and anticonvulsant actions of this steroid.

The actions of progesterone take place directly by mimicking and enhancing the GABA effects through a specific recognition site of steroids in the GABA_A-benzodiazepine receptor Cl^- channel complex (29,32,33). It is accepted that progesterone produces mainly inhibitory neuronal actions by modulating the GABA_A receptor (14,34), potentiating the GABA-induced inhibition of spontaneous firing and suppressing the glutamate-induced excitation at least in Purkinje cerebellar neurons (35). Therefore, some anticonvulsant drugs such as sodium valproate (36,37) or carba-

mazepine (38) and some GABA transaminase inhibitors (39) may behave as antidepressants through actions on GABA_A receptors.

In conclusion, even though the neuronal actions of the active metabolites of progesterone were not evaluated (32), progesterone was observed to reduce immobility in the forced swim test in rats not primed with estradiol, suggesting an antidepressant-like action of progesterone independently of estradiol, probably mediated by actions on GABA_A receptors.

Acknowledgments

The authors wish to thank Warren Haid for revising the manuscript. This study was supported by Grant #2498PH, CONACYT, Mexico.

References

- Jiang N, Chopp M, Stein D, Feit H. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res* 1996;735:101.
- Jung Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE. The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cell Mol Neurobiol* 1996;16:439.
- Kokate TG, Banks MK, Magee T, Yamaguchi SI, Rogawski MA. Finasteride, a 5- α -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;288:679.
- Kokate TG, Svensson BE, Rogawski MA. Anticonvulsant activity of neurosteroid: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:1233.
- Litter BC, Matta RJ, Zahn TP. Physiological and psychological effects of progesterone in men. *J Nerv Ment Dis* 1974;159:256.
- Pearlstein TB. Hormones and depression: what are the facts about premenstrual syndrome, menopause, and hormone replacement therapy? *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:646.
- Kroboth PD, McAuley JW. Progesterone: does it affect response to drug? *Psychopharmacol Bull* 1997;33:297.
- Rodríguez-Sierra JF, Howard JL, Pollard GT, Hendriks SE. Effect of ovarian hormones on conflict behavior. *Psychoneuroendocrinology* 1984;9:293.
- Fernández-Guasti A, Picazo O. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:681.
- Picazo O, Fernández-Guasti A. Changes in experimental anxiety during pregnancy and lactation. *Physiol Behav* 1993;54:295.
- Bitran D, Dowd JA. Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology (Berlin)* 1996;125:65.
- De Angelis L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of meclizemide, a selective MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996;354:379.
- Schreiber R, De Vry J. 5-HT_{1A} receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanisms of action? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1993;17:87.
- Tyrer P, Tyrer J. Antidepressive drugs for treatment of anxiety disorders—and vice versa. In: Den Boer JA, Sitsen JM, editors. *Handbook of Depression and Anxiety. A Biological Approach*. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 497.
- Bernardi M, Vergoni AV, Sandrini M, Tagliavini S, Bertolini A. Influen-

- ence of ovariectomy, estradiol and progesterone on the behavior of mice in an experimental model of depression. *Physiol Behav* 1989;45:1067.
16. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 1988;94:147.
 17. Borsini F, Lecci A, Sessarego A, Frassine R, Meli A. Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. *Psychopharmacology* 1989;97:183.
 18. Borsini F. Role of serotonergic system in the forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:377.
 19. Danysz W, Plaznik A, Kostowski W, Jarbe TUC, Hiltuen AJ, Archer T. Comparison of desipramine, amitriptyline, zimelidine and alaproclate in six animal models used to investigate antidepressant drugs. *Pharmacol Toxicol* 1988;62:42.
 20. Porsolt RD, Pichon ML, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730.
 21. Porsolt RD, Lenègre A. Behavioral models of depression. In: Elliot JM, Heal DJ, Maisden CA, editors. *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. New York: John Wiley & Sons;1992. p. 73.
 22. West AP. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1990;14:863.
 23. Willner P. Sensitization to the actions of antidepressants drugs. In: Goudie AJ, Emmete-Oglesby M, editors. *Psychoactive Drugs*. Totowa, NJ: The Humana Press;1989. p. 407.
 24. Lambert JJ, Belleli D, Hill-Venning D, Peters JA. Neurosteroids and GABA_A receptor function. *TIPS* 1995;16:285.
 25. Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB. Diverse modes of action of progesterone and metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;56:1.
 26. Geary N, Trace D, McEwen B, Smith GP. Cyclic estradiol replacement increases the satiety effect of CCK-8 in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1994;56:281.
 27. Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Interaction of estradiol, testosterone, and progesterone in the modulation of hormone-dependent aggression in the female rat. *Physiol Behav* 1992;52:773.
 28. Garguilo PA, Muñoz V, Donoso AO. Inhibition by N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist of lordosis behavior induced by estrogen followed by progesterone or luteinizing-releasing hormone (LHRH) in the rat. *Physiol Behav* 1992;52:737.
 29. McEwen BS. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *TIPS Rev* 1991;12:141.
 30. Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of GABA_A receptor mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 1992;38:379.
 31. Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Mol Biol* 1995;2:113.
 32. Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 1986;232:1004.
 33. Lan NC, Chen JS, Belleli D, Pritchett DB, Seeburg PH, Gee KW. A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA_A-benzodiazepine receptor. *Eur J Pharmacol* 1990;188:401.
 34. Weizman R, Dagan E, Snyder SH, Gavish M. Impact of pregnancy and lactation on GABA_A receptor and central-type and peripheral-type benzodiazepine receptors. *Brain Res* 1997;752:307.
 35. Smith SS, Waterhouse BD, Chapin JK, Woodward DJ. Progesterone alters GABA and glutamate responsiveness: a possible mechanism for its anxiolytic action. *Brain Res* 1987;400:353.
 36. Fernández-Teruel A, Boix F, Escorihuela RM, Yáñez P, Tobeña A. Sodium valproate reduces immobility in the behavioral "despair" test in rats. *Eur J Pharmacol* 1988;152:1.
 37. Fernández-Teruel A, Boix F, Escorihuela RM, Guix T, Tobeña A. Activity of several GABAergic agents on the behavioral "despair" test in rats. *Psychiatr Psychobiol* 1989;4:167.
 38. Sluzewska A, Nowakowska E, Stachowiak I. Antidepressant-like effects of carbamazepine: the role of GABAergic agents. *Pharmacol Res* 1992;25(S2):65.
 39. Semba J, Kuroda Y, Takahashi R. Potential antidepressant properties of subchronic GABA transaminase inhibitors in the forced swimming test in mice. *Neuropsychobiology* 1989;21:152.

5.3 Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L, Estrada-Camarena E, Contreras CM, López-Rubalcava C. Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 63: 13-20, 1999.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PII S0091-3057(98)00231-7

Chronic Treatment With Desipramine Induces an Estrous Cycle-Dependent Anxiolytic-Like Action in the Burying Behavior, But Not in the Elevated Plus-Maze Test

A. FERNÁNDEZ-GUASTI*†, L. MARTÍNEZ-MOTA§, E. ESTRADA-CAMARENA§,
C. M. CONTRERAS‡§ AND C. LÓPEZ-RUBALCAVA*†

*Sección de Terapéutica Experimental, Departamento de Farmacología, CINVESTAV, Mexico D.F., Mexico,
†División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Mexico D.F., Mexico,
‡Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F., Mexico,
§Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

Received 29 August 1997; Revised 14 August 1998; Accepted 14 September 1998

FERNÁNDEZ-GUASTI, A., L. MARTÍNEZ-MOTA, E. ESTRADA-CAMARENA, C. M. CONTRERAS AND C. LÓPEZ-RUBALCAVA. *Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test.* PHARMACOL BIOCHEM BEHAV 63(1) 13–20, 1999.—The effect of chronic desipramine (DMI, 2.5 mg/kg × 21–26 days) treatment in female rats in two anxiety paradigms was assessed: the burying behavior (BB) and the elevated plus-maze (EPM) tests. In the BB test DMI produced a significant decrease in burying in ovariectomized rats, an effect considered as anxiolytic-like. In cycling females, DMI also reduced the cumulative BB most notably in proestrus rats. However, in diestrus rats no anxiolytic-like actions were observed. In addition, DMI increased BB latencies in proestrus and estrus rats. In the EPM test, DMI produced anxiolytic-like actions only in ovariectomized rats, while no significant actions were found in cycling females. Finally, the chronic treatment with DMI produced a general reduction in the ambulatory behavior of rats in all estrous cycle phases. Results are discussed on the basis of the differences between both anxiety paradigms and the probable relationship between the steroids secreted during proestrus and chronic DMI treatment. © 1999 Elsevier Science Inc.

Desipramine Burying behavior Elevated plus-maze Female estrous cycle Proestrus

SEVERAL compounds that are currently prescribed for various forms of depression have as an additional therapeutic effect the alleviation of anxiety (26,31,32,39,40). Desmethylinipramine or desipramine (DMI) is one of the tricyclic antidepressants most commonly used. When administered acutely, this compound produces an increased synaptic availability of norepinephrine, due to reuptake blockade. In addition, DMI decreases the effectiveness of electrical stimulation of the locus coeruleus by suppressing the firing of CA₃ pyramidal neurons in the hippocampus through the activation of alpha-2 adrenoceptors (13). With a chronic treatment, DMI has additional effects: it decreases the density of beta-adren-

ergic receptors (48), it increases the levels of 5-HT and dopamine (34), reduces the number of 5-HT₂ receptors in frontal cortex (43), and produces a functional upregulation of 5-HT_{1A} receptors (38).

Interestingly, important associations between DMI and the GABA_A receptor complex have also been established. In 1984, Suranyi-Cadotte et al. (51) found that rats treated for 21 days with desipramine had a marked reduction in the number of benzodiazepine binding sites in the rat forebrain (52). In addition, Bouthillier and de Montigny (7) demonstrated that long-term, but not acute treatment with DMI, decreases the response of hippocampal neurons to iontophoretically applied

flunitrazepam. Consistent with these data, *in vitro* studies have shown that DMI and its metabolite were able to antagonize the GABA_A receptors (50). As to DMI's antidepressive action, it has been reported that picrotoxin and pentylenetetrazol are able to synergize DMI's action after chronic and subchronic treatments (22). Finally, Cannizzaro et al. (10,11) found that prenatal exposure to diazepam augments the antidepressive effect of DMI in adult rats.

In 1990 we demonstrated that the effect of compounds acting at the GABA-benzodiazepine complex, like diazepam, varies according to the estrous cycle phases (19). Thus, in the proestrus, this benzodiazepine produced stronger actions as compared with other phases like metestrus. This observation suggested that diazepam might be interacting with the steroid hormones present during the proestrus phase, most likely progesterone. The anxiolytic-like action of progesterone has been proposed since 1940 and confirmed by several authors, either by exogenous hormone administration (20,46) or by selecting endocrine phases characterized by high levels of this steroid such as the late proestrus (3,20) or mid-pregnancy (2,45). Furthermore, it has been shown that the anxiolytic-like action of progesterone or its derivatives depends on the stimulation of the GABA-benzodiazepine system (4,21). Interestingly, Martínez-Mota and Contreras (unpublished data) have found more robust antidepressive-like actions of DMI, in the forced swimming test, in proestrus females compared to the other estrous cycle phases. These actions were seen after a chronic 21-day treatment with DMI 2.5 mg/kg. This treatment schedule has been found to increase the discharge frequency of neurons in the lateral septum (42), an area commonly related to the modulation of anxiety (28).

As previously mentioned, DMI has been reported to possess anxiolytic-like actions in some animal models of anxiety (5,33,41,52). It is important to note that chronic treatments are necessary in order to observe these effects (52). Moreover, DMI and other tricyclic antidepressants are capable of producing both anxiogenic and anxiolytic actions, depending mainly on the treatment schedule used, i.e., acute vs. chronic (5,44).

In the present study, we analyze if chronic treatment with DMI produces anxiolytic-like actions in female rats tested in two behavioral paradigms of anxiety: the burying behavior (BB), and the elevated plus-maze (EPM) tests. These paradigms were selected on the bases of their advantages to reveal anxiolytic-like effects under various pharmacological (24,47,53,54) and physiological conditions (3,17,20,45). We also decided to establish if the anxiolytic-like actions of DMI vary, depending on the estrous cycle phase. To be able to assess possible motor alterations, a general ambulatory behavior test was included.

METHODS

Animals

Adult female Wistar rats (180–200 g b.wt.) were used in this study. All animals were individually housed in a room under inverted and controlled light:dark cycle conditions (lights on at 2200–1000 hs). Animals had *ad libitum* access to water and Purina rat chow throughout the experiments.

Procedure

All behavioral tests were performed during the dark phase of the circadian cycle. Animals were tested first in the BB paradigm at least 1 h after the onset of darkness. Four hours after the BB, the EPM test was run.

Anxiety Tests

Burying behavior (BB) test. The BB test has been previously described in detail (54). Briefly, for this test a cage measuring 27 × 16 × 23 cm, the same dimensions as those of the home cages, was employed. The experimental cage contained an electrified prod (7 cm long) that emerges from one of its walls 2 cm above the bedding material consisting of fine sawdust. Every time the animal touched the prod it received an electric shock of 0.3 mA. The source of the shock was a constant current shocker (La Fayette Instruments Co., model 5806). The prod remained electrified through out the test. Immediately after the placement of the animal in the cage, its behavior was registered for 10 min. Once the animal received the first shock it typically moved towards the prod; the animal then sprayed and pushed a pile of bedding material ahead with rapid alternating movements of its forepaws. The parameters registered in this anxiety test were the cumulative burying behavior (cumulative time, in seconds, that the animals spent burying the prod) and the burying behavior latency (time in seconds from the first shock to the burying behavior display) (54).

Elevated plus-maze (EPM) test. The EPM test has been described in detail elsewhere (24). Briefly, the experimental device consisted of an elevated (40 cm above the floor), plus-shaped maze placed in a room illuminated by two 40-W red bulbs. The four arms were 50 cm long and 10 cm wide. The opposing arms were surrounded by white 40 cm high opaque plastic walls (closed arms), while the other arms lacked walls (open arms). The animal was removed from its home cage and placed in the center of the maze facing a closed arm. An observer, blindfolded to the treatment, was situated 2 m from the center of the maze. An entry into an arm was determined when the animal placed all four paws on one arm. The cumulative time spent in the open arms, the number of entries made into the open arms, and total number of crossings were recorded over a 10-min session. Data were expressed as percentage of the total time spent in open arms, total number of entries to open arms (these two parameters considered to reflect anxiety levels), and total arm entries (considered to reflect exploratory behavior).

Ambulatory behavior test. Immediately after the burying behavior test, general ambulation was registered in all animals. Ambulatory behavior was recorded in a box measuring 43 × 36 × 19 cm, that was placed over a sensitive plate (48 × 40 cm) of an activity meter (Stoelting Co., Chicago, IL, USA) connected to a counter (Stoelting Co., USA). Each animal was placed in the cage, and the number of counts recorded after a 10 min period. The data are expressed as mean number of counts in 10 min. In other studies, it has been demonstrated that the previous exposure to the BB test does not affect the ambulatory behavior of rats (18,37).

Experimental Procedure

Two main groups were included: ovariectomized, and intact female rats. Ovariectomy was performed under pentobarbital anesthesia. Through a ventral incision, the ovaries were recognized and removed; 2 weeks after ovariectomy the chronic treatment was begun. In the non-ovariectomized group, 8 days after the beginning of the chronic treatment with DMI or saline, vaginal smears were daily taken to establish the estrous cycle phase. Thus, the estrous cycle was registered during at least 13 consecutive days. Subgroups were established according to the estrous-cycle phases; these were identified based on the vaginal-cytology as follows: proestrus

(round, nucleated cells), estrus (cornified cells), metestrus (round, nucleated cells, cornified cells and leukocytes), and diestrus (predominance of leukocytes) (20). All animals were injected intraperitoneally (IP) with either 2.5 mg/kg DMI (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in a volume of 0.2 ml or saline (0.2 ml). As a rule, animals received DMI treatment during 21 days. However, some animals could have received one to five more injections when searching for a specific cycle phase. The number of females included for each group varied between 10 and 23.

Animals were tested first in the BB paradigm 2 hs after the last injection of saline or DMI and, at least, 1 hs after the onset of darkness. Four hours after the BB, the EPM test was run.

Pilot Study

A pilot study was conducted in order to establish if the baseline behavior of rats and the action of the prototypical anxiolytic drug diazepam (1.0 mg/kg) in the EPM test were altered by previous exposure (4 hs before) of rats to the BB test. For this study, male Wistar rats (300–350 g) were individually housed with free access to food and water. Rats were divided into two groups: (a) animals tested in the BB paradigm and 4 hs later in the EPM ($n = 15$), and (b) animals tested only in the EPM at the time equivalent to that of group "a" ($n = 10$). Rats received either a saline or diazepam injection (IP 30 min prior to the EPM test).

Statistics

The Mann-Whitney U -test was used to compare DMI treated animals in each estrous cycle phase with their proper control group (saline treated animals). The comparisons of the proportion of animals displaying burying behavior were done using the Fisher F -test.

For the analysis of the possible interaction between DMI's treatment and the various estrous cycle phases, a two-way ANOVA test was performed.

RESULTS

The results of the pilot study, in which male rats were tested in the EPM with and without a previous experience on the BB, showed that the baseline behavior of rats was not different under the two experimental conditions [% time in open arms: 1.42 ± 0.39 (control) vs. 5.33 ± 1.98 (with BB), NS; open arm entries: 0.82 ± 0.23 (control) vs. 2.05 ± 0.54 (with BB), NS; total arm entries: 9.17 ± 0.08 (control) vs. 8.94 ± 1.27 (with BB), NS]. In addition, the anxiolytic-like effect of the prototypical anxiolytic drug, diazepam (1.0 mg/kg), on the EPM test was not different in rats exposed to both anxiety tests from those who were tested directly in the EPM test [% time in open arms: 12.10 ± 3.16 (control) vs. 13.66 ± 2.93 (with BB), NS; open arm entries: 4.50 ± 1.10 (control) vs. 5.57 ± 1.47 (with BB), NS; total arm entries: 9.12 ± 1.54 (control) vs. 12.0 ± 3.35 (with BB), NS].

Figure 1 shows the action of the long-term treatment with DMI on the EPM and the BB test in ovariectomized rats. In the EPM test, results show that DMI treatment produced significant increases in the percent of time that animals spent in the open arms, number of entries to open arms, and general exploratory behavior (expressed by the total number of crossing to open and closed arms). In the BB test, DMI produced a significant decrease in the cumulative BB, with a concomitant increase in the BB latency that did not reach statistical significance.

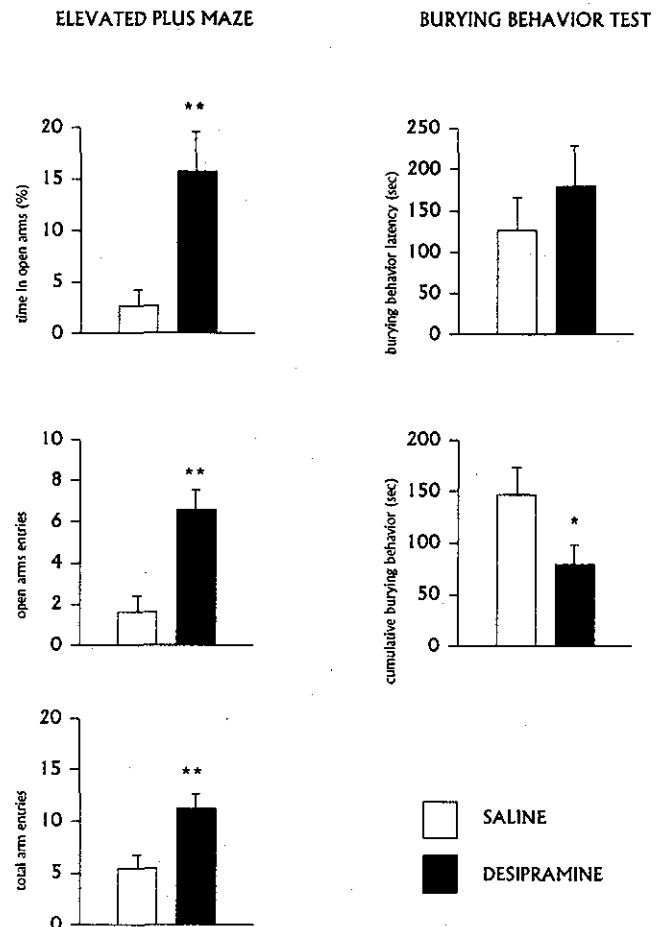


FIG. 1. Effect of chronic desipramine (DMI, 2.5 mg/kg \times 21 days) or saline on ovariectomized rats in two animal models of anxiety: elevated plus maze and burying behavior tests. Mann-Whitney U -test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$.

The actions of DMI on the percentage of animals that expressed BB in the different phases of the estrous cycle are shown in Fig. 2 (panel A). In this graph, it is clear that DMI produced a significant decrease in the proportion of animals that display BB only in the proestrus phase. The analysis of the parameters registered in the BB test according to the different estrous cycle phases are shown in Fig. 2 (panels B and C). Only those animals who expressed burying behavior were considered for the statistical analysis. Thus, this figure compares the burying behavior latency (panel B) and the cumulative time spent burying (panel C) between DMI- and saline-treated female rats along the four estrous cycle phases. The results of the two-way ANOVA test for the BB latency were: treatment $F(1, 106) = 18.92$, $p < 0.001$; estrous cycle phases $F(3, 106) = 0.22$, $p < 0.87$, and in the interaction between both sources of variance $F(3, 106) = 0.85$, $p < 0.85$. A generalized increase in BB latency was observed in DMI-treated rats at all the estrous cycle phases, that was statistically significant only for proestrus and estrus rats when compared to their control saline-treated groups. Figure 2B shows the cumulative BB after chronic DMI in female rats during the various stages of the estrous cycle. Clearly, no differences in the saline-treated groups in this parameter were observed along the endocrine

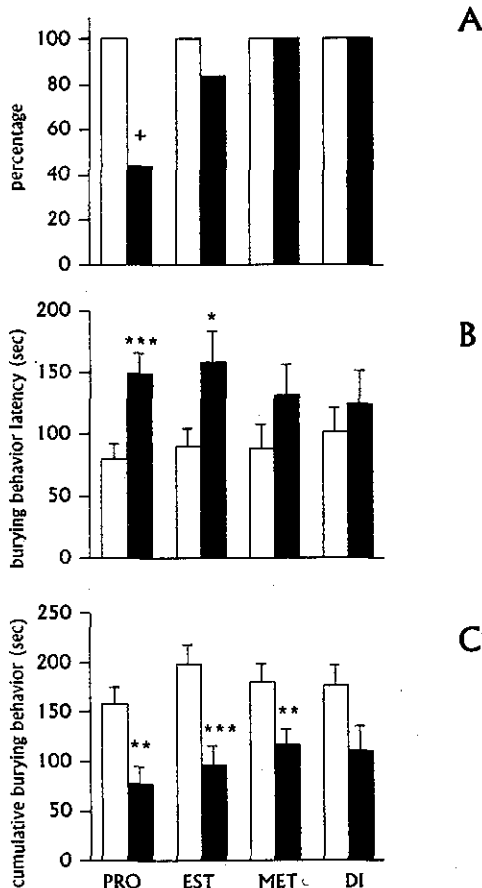


FIG. 2. Effect of chronic desipramine (DMI, 2.5 mg/kg \times 21–26 days, solid bars) or saline (clear bars) in rats tested on the burying behavior paradigm. Percentage of animals displaying burying behavior (A), burying behavior latency (B), and cumulative burying behavior (C). Fisher *F*-test: ⁺ $p < 0.05$; Mann-Whitney *U*-test: ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.02$; ^{***} $p < 0.002$.

cycle. The results of the two-way ANOVA test were: treatment $F(1, 106) = 29.62, p < 0.001$; estrous cycle phase $F(3, 106) = 1.09, p = 0.35$, and the interaction between these two parameters $F(3, 106) = 0.43, p = 0.73$. The comparisons between the treated vs. their proper control (saline-treated) group revealed a statistically significant reduction in burying behavior in the proestrus, estrous, and metestrus phases.

Figure 3 shows the effect of chronically injected DMI or saline on the elevated plus-maze test in female rats for the different phases of the estrous cycle. Two-way ANOVA after DMI treatment revealed no change in any of the parameters registered. Time in open arms: treatment $F(1, 112) = 4.20, p = 0.04$, phase $F(3, 112) = 0.13, p = 0.13$, interaction treatment \times phase $F(3, 112) = 0.38, p = 0.76$. Number of entries to the open arms: treatment $F(1, 112) = 1.10, p = 0.29$, phase $F(1, 112) = 2.05, p = 0.11$, interaction treatment \times phase $F(1, 112) = 3.11, p = 0.55$. Total number of crossings: treatment $F(1, 112) = 0.002, p = 0.96$, phase $F(1, 112) = 1.19, p = 0.31$, interaction treatment \times phase $F(1, 112) = 1.10, p = 0.29$.

The effects of DMI or saline on ambulatory behavior of both ovariectomized and intact female rats are shown in Table 1. DMI clearly reduced the number of counts in all females, independent of their endocrine stage.

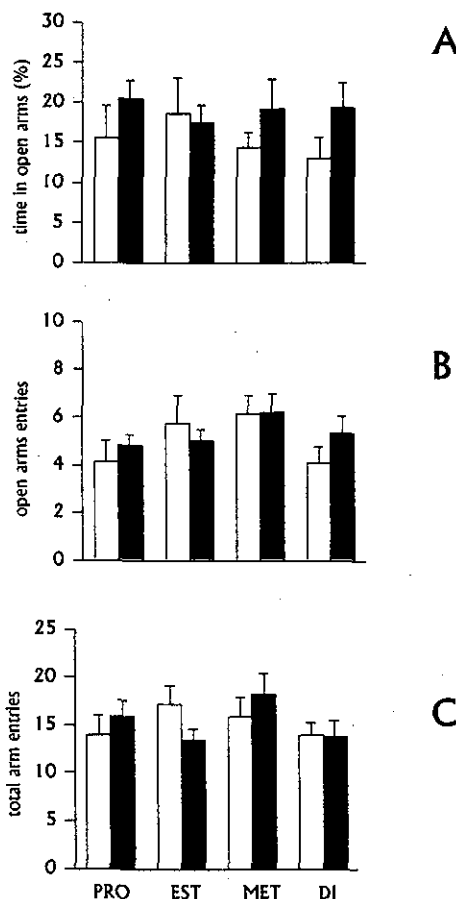


FIG. 3. Effect of chronic desipramine (DMI, 2.5 mg/kg \times 21 days, solid bars) or saline (clear bars) on rats tested on the elevated plus-maze. Percentage of time in open arms (A), open-arm entries (B) and total arm entries (C). Mann-Whitney *U*-test not significant.

DISCUSSION

In the present study, chronic treatment with DMI produces anxiolytic-like actions in ovariectomized female rats in two different anxiety paradigms: the burying behavior (BB) and the elevated plus-maze (EPM) tests. In cycling rats, these anxiolytic-like actions are also observed in the BB test at all estrous cycle phases but diestrus. However, the anxiolytic-like actions of DMI treatment in the EPM disappear in cycling rats.

Stress has been reported to be a potentially important factor that alters drug actions in the EPM test (30,16). For example, chlordiazepoxide anxiolytic-like effects on the EPM are abolished by administration of an electric shock immediately before testing (16). Based on this evidence, we conducted the pilot study to establish if previous exposure to the BB test has an effect on the behavior of animals tested in the EPM. The results obtained allows ruling out the possibility that the previous experience of rats in the BB test affects the results observed in the EPM test. Furthermore, the fact that in ovariectomized rats DMI is able to produce anxiolytic-like actions in both animal models of anxiety (present study) also discards the possibility that DMI actions could be affected by the previous exposure of rats to the BB test.

There is increasing evidence from animal models of anxiety (52) and clinical data (44) that the different classes of

TABLE 1
AMBULATORY BEHAVIOR

Condition	Treatment	No. of Counts (Mean \pm SEM)	<i>n</i>
Ovariectomized	Saline	271.54 \pm 21.86	11
	DMI	193.27 \pm 22.51†	11
Proestrus	Saline	289.71 \pm 17.44	14
	DMI	219.28 \pm 13.14†	14
Estrus	Saline	291.50 \pm 28.11	15
	DMI	212.13 \pm 16.26*	23
Metestrus	Saline	363.93 \pm 32.24	14
	DMI	220.63 \pm 21.70‡	11
Diestrus	Saline	312.13 \pm 23.25	15
	DMI	216.10 \pm 12.93‡	10

Mann-Whitney *U*-test: **p* < 0.05; †*p* < 0.02; ‡*p* < 0.002.

antidepressants drugs, namely the tricyclic antidepressants, the monoamine oxidase inhibitors, and the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) possess anxiolytic-like activity. Present results obtained in ovariectomized rats, chronically treated with DMI, are in line with these findings. In this case, DMI is able to produce anxiolytic-like actions in the BB and the EPM test, both paradigms largely considered as reliable animal models of anxiety (30,53,54). As previously mentioned, antidepressants seem to require long-term administration to produce anxiolytic-like effects (5,44,52). Moreover, it has been reported that acute-treatment with DMI and other antidepressants produces anxiogenic-like actions (5,44). As an account for the paradoxical effects of DMI and other antidepressants (anxiolytic versus anxiogenic actions), it has been proposed that acute administration would produce increased synaptic availability of norepinephrine, due to reuptake blockade, and thus lead to an increased central arousal and peripheral symptoms that might result in anxiogenic-like actions (44). After chronic treatment, stabilization of noradrenergic activity would occur and the changes induced on other neurotransmitter systems (*vide supra*) altogether would account for the anxiolytic-like actions of DMI. It is interesting that, in the present study, the anxiolytic-like actions of DMI seem to be modifiable depending on the estrous cycle phase studied.

The results obtained with DMI or saline treatments in cycling rats show differences according to the estrous cycle phase and the animal model of anxiety used. Thus, in the BB test, almost a 60% of the proestrus rats does not show the BB response. Those showing the response (40%) as well as estrus rats exhibit an increase in BB latency (denoting decreased reactivity) and a reduction in BB (directly denoting anxiety levels). Endocrinologically, these stages are characterized by the presence of estrogen and increasing levels of progesterone (25). We and others have demonstrated that progesterone may induce anxiolytic-like responses in various anxiety paradigms including the burying behavior test (3,4,46). Thus, it could be proposed that DMI interacts with steroids to produce its action on burying behavior. Recent, unpublished data from our laboratory show that DMI interacts with both estrogen and progesterone to induce anxiolytic-like effects. However, present findings showing clear effects of DMI in ovariectomized rats suggest that steroids might modulate DMI's anxiolytic-like effects rather than producing them. In accordance with this interpretation is the fact that DMI induces a trend towards an increase in burying behavior latency

and to a reduction in the total burying behavior in all other phases of the estrous cycle.

The nature of the possible interaction between DMI and steroids, at present, remains unclear. It has been proposed that steroids may affect systems involved in the regulation of anxiety such as GABA-benzodiazepine and serotonin (3, 4,21). Most of the literature data shows that chronic DMI either antagonizes the GABA_A receptor (50), or reduces its number (15). In addition, this antidepressant seems to synergize with picrotoxin and pentylentetrazol to produce a decrease in immobility in the forced swimming test (22). Taken together, these data would argue against the idea of a positive interaction between DMI and an endogenous compound (possible progesterone) acting at the GABA/benzodiazepine system in the mediation of anxiolysis. However, there are also data supporting this positive interaction, i.e., Cannizzaro et al. (10) showed that after the stimulation of the benzodiazepine receptor the antidepressive action of DMI was potentiated. Suranyi-Cadotte et al. (51) reported that long-term desipramine treatment reduced the binding of the GABAergic compound [³⁵S] *t*-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) in rat hippocampus. These authors propose that since TBPS inhibits GABAergic neurotransmission by blocking the GABA-gated chloride channels, the long-term effects of DMI might result in an increased capacity to generate chloride currents. This conclusion is in agreement with the ability of long-term desipramine treatment to increase GAD activity and GABA_A receptors in rat hippocampus (49). Therefore, it is possible that DMI acts at the level of the chloride channel coupled to the GABA receptors to enhance GABAergic neurotransmission and thereby produce its anxiolytic-like activity. Further studies should be done in order to analyze if steroids can modify desipramine actions in GABA-gated chloride channels. Interestingly, Bitran et al. (2) showed that the efficacy of GABA-stimulated chloride transport was reduced in cortical tissue from ovariectomized females when compared to proestrus rats. This experiment supports the idea that the chloride channel associated to the GABA/benzodiazepine receptor complex can also be influenced by steroids. Further experiments should be undertaken to explore the possible association between the GABA/benzodiazepine system and DMI in the mediation of its anxiolytic-like effects.

An interesting observation from the present results is that, in the BB test, chronic DMI-treatment had different effects in ovariectomized rats and diestrus females. One could have expected that these two groups would behave similarly. However, there are differences between both groups that could account for the variation in the behavioral response. Thus, it has been found that ovariectomy induces a decrease in the density of dopamine receptors (6), a progressive increase in [³H] flunitrazepam-specific binding associated with GABA_A receptors (6), and some anatomical changes like a significant reduction in dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells (27). Finally, ovariectomy affects corticosterone levels and adrenal weight (14). It is possible that some of these changes could modify DMI's activity and account for the differential response. However, specific experiments should be done in order to clarify this point.

It is important to mention that within the saline-treated animals no differences, neither in burying behavior latency nor in the time spent burying, were found along the various phases of the estrous cycle. This is in contrast to previous data from our and other laboratories (3,20) showing a reduction in BB at the proestrus phase. Nevertheless, the reasons for such difference could rely on the proestrus stage analyzed, i.e., late

versus early proestrus. In the present study, the hour of the day selected for our observations in the burying behavior test corresponded to the early proestrus, where no clear spontaneous anxiolytic-like actions have been found (20).

The anxiolytic-like actions of DMI observed in the BB paradigm, in some but not all of the estrous cycle phases, contrast with the lack of action of this drug in the EPM test at all estrous cycle phases. The reasons underlying the different anxiolytic-like profile of DMI in the two anxiety paradigms used in the present study remain unclear. However, a possible explanation could be based on the data reported by Handley (29) showing that for the monoaminergic regulation of anxiety, the stimulus that triggers anxiety as well as the nature of the response are of particular relevance. Thus, in the BB test the animal is confronted by an electrified prod that is recognized as an aversive stimulus and in which the expression of an active behavior, such as burying, denotes the anxiety state. Conversely, in the EPM test, curiosity and caution are evoked by a novel situation and the animal, rather than expressing an active behavior to confront the aversiveness (in this case altitude) it chooses to explore the non aversive area (close arms). Broekkamp et al. (9) proposed that the different animal models of anxiety may reflect distinct types of anxiety disorders, which may be dissimilarly regulated. Hence, it is possible that hormones influencing DMI's anxiolytic-like actions could also modify the stress response to the different stimuli provided by distinct animal models of anxiety.

The fact that DMI's anxiolytic-like actions also vary depending on the endocrine state of the rat makes the GABAergic system a good candidate to participate in the mediation of its anxiolytic-like actions. However, because chronic treatment with DMI produces changes in neurotransmitter systems other than GABA, the participation of other systems in the mediation of DMI's anxiolytic-like actions should be considered. For example, an interaction between DMI and the serotonergic system known to participate in the regulation of anxiety (23), could be presumed. Thus, DMI does not act on 5-HT_{1A} receptors (35) that are importantly involved in anxiety (18), but promotes a decrease in the number of 5-HT_{2A} receptors in the cerebral cortex (43), which participation in anxiety seems, at present, controversial (8). However, it is important to mention that these changes in 5-HT_{2A} receptors seem to be related to DMI's antidepressive-like actions (8). Finally, the possible relationship between the noradrenergic and GABAergic systems in the control of anxiety should not be discarded (12,36,37).

From the present data it could be claimed that the effects on burying behavior observed after chronic DMI treatment are due to the reduction of general activity. However, several data argue against this deduction. Firstly, the actions of DMI

on ambulatory behavior are seen in all the estrous cycle phases and not only in proestrus. Second, treatment with DMI does not affect the exploratory behavior tested as the number of total crossings in the elevated plus-maze. Finally, chronic DMI treatment had no actions in a motor coordination test using the rota rod (data not shown). Therefore, the present results suggest that the effects observed with chronic DMI are specific upon some parameters denoting reactivity and anxiety.

It is important to mention that Beardslee et al. in 1990 (1) reported that chronic treatment with imipramine, desipramine, and pargyline to female rats failed to induce anxiolytic-like effects on any measures of defensive burying. These results are in contrast to present data. Although, some important variations between both studies could explain the differential results, such as the dose and the duration of DMI treatment (5 mg/kg for 8 weeks vs. 2.5 mg/kg for 3–4 weeks), the rat's strain (Sprague-Dawley versus Wistar) (53), the shock intensity (3 vs. 0.3 mA) (54), and the experimental cage measures (27 × 16 × 23 cm vs. 40 × 30 × 40 cm) (53), the reasons underlying the difference are most likely to be related to the endocrine stage of cycling females. Thus, in the study performed by Beardslee et al. the estrous cycle was not recorded and, hence, their sample most likely included in both proestrus and diestrus rats (1). This last variation could mask the effect of DMI on the various parameters of burying behavior recorded, because, in the present study, this drug has a robust effect in rats in proestrus and almost lacks an action in diestrus animals. Additionally, it is worth mentioning that in that study only five female rats were included in the DMI experiment. This low number of subjects could also contribute to obscure the actions of this treatment.

In conclusion, the present study shows that the chronic treatment with DMI produces anxiolytic-like actions in the burying behavior and in the elevated plus-maze tests. These anxiolytic-like actions seem to be modifiable, depending on the endocrinological state of female rats. In addition, there are important differences between the two animal models of anxiety. Specifically, the elevated plus-maze test appears to be less sensitive to the anxiolytic-like actions of DMI and only in absence of ovarian hormones makes it possible to observe DMI's anxiolytic-like activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mr. Facundo Moreno for technical assistance and Mr. Victor Flores for animal caring. A special thanks goes to Dr. Rodriguez-Manzo for her comments on the manuscript. This investigation was partially supported by grants from the "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)" to A.F.-G. (Grant No. 2338P) and to C.M.C. (Grant No.2498P). L.M.-M. and E.E.-C. received fellowships from CONACyT.

REFERENCES

1. Beardslee, S. L.; Papadakis, E.; Fontana, D. J.; Commissaris, R. L.: Antipanic drug treatments: Failure to exhibit anxiolytic-like effects on defensive burying behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35:451–455; 1990.
2. Bitran, D.; Hilvers, R. J.; Kellog, C. K.: Ovarian endocrine status regulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of gamma-aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav. Neurosci.* 105:653–662; 1991.
3. Bitran, D.; Dowd, J. A.: Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology (Berlin)* 125:65–73; 1996.
4. Bitran, D.; Shiekh, M.; McLeod, M.: Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA(A) receptors. *J. Neuroendocrinol* 7:171–177; 1995.
5. Bodnoff, S. R.; Suranyi-Cadotte, B.; Quirion, R.; Meaney, M. J.: A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berlin)* 97:277–278; 1989.
6. Bosse, R.; Di Paolo, T.: Dopamine and GABA-A receptor imbalance after ovariectomy in rats: Model of menopause. *J. Psychiatr. Neurosci.* 20:364–371; 1995.
7. Bouthillier, A.; De Montigny, C.: Long-term anti-depressant treatment reduces neural responsiveness to flurazepam: An electrophysiological study in the rat. *Neurosci. Lett.* 73:271–275; 1987.

8. Briley, M.; Chopin, P.; Veigner, M.: The "plus-maze test of anxiety": Validation in different rats strains and effect of a wide variety of antidepressants. *Br. J. Pharmacol.* 87:217; 1986.
9. Broekkamp, C. L. E.; Berendsen, H. H. G.; Jenck, F.; Van Delft, A. M. L.: Animal models for anxiety and response to serotonergic drugs. *Psychopathology* 22:2-12; 1989.
10. Cannizzaro, G.; Flugy, A.; Cannizzaro, C.; Cagliano, M.; Sabatino, M.: Effects of desipramine and alprazolam in the forced swim test in rats after long-lasting termination of chronic exposure to picrotoxin and pentyleneetetrazol. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 3:477-484; 1993.
11. Cannizzaro, C.; Cannizzaro, E.; Cagliano, M.; Mangiapane, N.: Behavioural responsiveness to picrotoxin and desipramine in adult rats prenatally exposed to different benzodiazepine agonists. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 5:523-526; 1995.
12. Charney, D. S.; Heninger, G. R.; Breier, A.: Noradrenergic function in panic anxiety. *Arch. Gen. Psychiatry* 41:751-763; 1984.
13. Curet, O.; DeMontigny, C.; Blier, P.: Effect of desipramine and amphetamine on noradrenergic neurotransmission: Electrophysiological studies in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 221:59-70; 1992.
14. Dagnault, A.; Deshaies, Y.; Richard, D.: Involvement of type I corticosteroid receptor in the effects of ovariectomy on energy balance. *Am. J. Physiol.* 270:R199-R202; 1996.
15. Dennis, T.; Beauchemin, V.; Lavoie, N.: Antidepressant-induced modulation of GABA_A receptors and beta-adrenoreceptors but not GABA_B receptors in the frontal cortex of olfactory bulbectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 262:143-148; 1994.
16. Falter, U.; Gower, A. J.: Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav. Pharmacol.* 3:123-128; 1992.
17. Fernández-Guasti, A.; Roldán-Roldán, G.; Saldívar, A.: Reduction in anxiety after ejaculation in the male rat. *Behav. Brain Res* 32:23-29; 1989.
18. Fernández-Guasti, A.; Hong, E.; López-Rubalcava, C.: Species differences in the mechanism through which the serotonergic agonists indorenate and ipsapirone produces the anxiolytic action. *Psychopharmacology (Berlin)* 107:61-68; 1992.
19. Fernández-Guasti, A.; Picazo, O.: The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37:77-81; 1990.
20. Fernández-Guasti, A.; Picazo, O.: Changes in anxiety along the various phases of the oestrous cycle: Effect of oestrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* 17:681-689; 1992.
21. Fernández-Guasti, A.; Picazo, O.: Flumazenil blocks the anxiolytic action of allopregnanolone. *Eur. J. Pharmacol.* 281:113-115; 1995.
22. Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Boix, F.; Longoni, B.; Corda, M. G.; Tobeña, A.: Imipramine and desipramine decrease the GABA-stimulated chloride uptake, and antigabaergic agents enhance their action in the forced swimming test in rats. *Neuropsychobiology* 23:147-152; 1990.
23. File, S. E.; Johnston, A. L.: Lack of effects of 5-HT₃ receptor antagonists in the social interaction and elevated plus-maze tests of anxiety in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 99:248-251; 1989.
24. File, S. E.: Behavioural detection of anxiolytic action. In: *Experimental approaches to anxiety and depression*. Chichester: Wiley; 1992:25-44.
25. Freeman, M. E.: The ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E.; Neill, J., eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1988:1893-1928.
26. Freeman, H. L.; O'Hanlon, J. F.: Acute and subacute effects of antidepressants on performance. *J. Drug Dev. Clin. Pract.* 7:7-20; 1995.
27. Gould, E.; Woolley, C. S.; Frankfurt, M.; McEwen, B. S.: Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10:1286-1291; 1990.
28. Gray, J.: The neuropsychopharmacology of anxiety: An inquiry into the function of the septo-hippocampal system. *Behav. Brain Sci.* 5:469-534; 1982.
29. Handley, S. L.: Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: Idzikowski, C.; Cowen, P. J., eds. *Serotonin, sleep and mental disorder*. Guildford: Wrightson Biomedical Publishing, Ltd; 1991:89-115.
30. Handley, S. L.; McBlane, J. W.: An assessment of the elevated X-Maze for studying anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 29:129-138; 1993.
31. Khan, M. C.; Bennie, E. H.; Stulemeijer, S. M.; Ravens, M. A.: Mianserin and doxepin in the treatment of outpatient depression with anxiety. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 15:213-218; 1983.
32. Khan, R. J.; McNair, D. M.; Lipman, R. S.: Imipramine and chlordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. 2. Efficacy in anxious outpatients. *Arch. Gen. Psychiatry* 43:79-85; 1986.
33. Laino, C. H.; Córdoba, N. E.; Orsingher, O. A.: Perinatally protein deprived rats and reactivity to anxiolytic drugs in the plus maze test: An animal model for screening antipanic agents?. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46:89-94; 1993.
34. Li, Q.; Levy, A. D.; Cabrera, T. M.; Brownfield, M. S.; Battaglia, G.; Van de Kar, L. D.: Long term fluoxetine, but not desipramine, inhibits ACTH and oxytocin responses to the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in male rats. *Brain Res.* 630:148-156; 1993.
35. Li, M. Y.; Yan, Q. S.; Coffey, L. L.; Reith, M. E.: Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis with cocaine and other monoamine uptake blockers. *J. Neurochem.* 66:559-568; 1996.
36. López-Rubalcava, C.; Saldívar, A.; Fernández-Guasti, A.: Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:433-440; 1992.
37. López-Rubalcava, C.; Fernández-Guasti, A.: Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effect of 5-HT_{1A} agonists. *Behav. Pharmacol.* 5:42-51; 1994.
38. Lund, A.; Mjelle-Joly, N.; Hole, K.: Desipramine, administered chronically influences 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors, as measured by behavioural tests and receptor binding in rats. *Neuropharmacology* 31:25-32; 1992.
39. Lydiard, R. B.; Morton, W. A.; Emmanuel, N. P.; Zealberg, J. J.; Laraia, M. T.; Stuart, G. W.; O'Neil, P. M.; Ballenger, J. C.: Preliminary report: Placebo-controlled, double-blind study of the clinical and metabolic effects of desipramine in panic disorder. *Psychopharmacol. Bull.* 29:183-188; 1993.
40. McDougle, C. J.; Goodman, W. K.; Price, L. H.: The pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacopsychiatry* 26(Suppl. 1):24-29; 1993.
41. Molewijk, H. E.; Hartog, K.; van der Poel, A. M.; Mos, J.; Olivier, B.: Reduction of guinea pig pup isolation calls by anxiolytic and antidepressant drugs. *Psychopharmacology (Berlin)* 128:31-38; 1996.
42. Molina, M.; Diaz-Meza, J. L.; Saavedra, M.; Ortíz, M.; Contreras, C. M.: Raphe-septal neurons changes in sensitivity to desipramine following an early septal lesion in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 20:1427-1434; 1996.
43. Mudunkotuwa, M. T.; Horton, R. W.: Desipramine administration in the olfactory bulbectomized rat: Changes in brain β -adrenoceptor and 5-HT₂ binding sites and their relationship to behaviour. *J. Pharmacol.* 117:1481-1486; 1996.
44. Nutt, D. J.; Glue, P.: Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: A psychopharmacological perspective. In: File, S. E., ed. *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. Elmsford, NY: Pergamon Press; 1991:1-28.
45. Picazo, O.; Fernández-Guasti, A.: Changes in experimental anxiety along pregnancy and lactation. *Physiol. Behav.* 54:295-299; 1993.
46. Picazo, O.; Fernández-Guasti, A.: Antianxiety effect of progesterone and some of its reduced metabolites: An evaluation using the burying behaviour test. *Brain Res.* 680:135-141; 1995.
47. Rodgers, R. J.; Cole, J. C.: The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J.; Hendrie, C.A., eds. *Ethology and psychopharmacology*. London: Wiley and Sons Ltd; 1994:9-44.
48. Sarai, K.; Frazer, A.; Brunswick, D.; Mendels, J.: Desmethylimipramine induces decrease in β -adrenergic receptor binding in rat cerebral cortex. *J. Biochem. Pharmacol.* 27:179-184; 1978.
49. Scatton, B.; Lloyd, K. G.; Zivkovic, B.; Dennis, T.; Claustre, Y.; Debek, J.; Arbilla, S.; Langer, S. Z.; Bartholini, G.: Fengabine, a

- novel antidepressant GABAergic agent. II. Effect on cerebral noradrenergic, serotonergic and GABAergic transmission in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:251-257; 1987.
50. Squires, R.; Saederup, E.: Antidepressants and metabolites that block GABA-A receptor coupled to S-t-butylbicyclophosphorionate binding sites in rat brain. *Brain Res.* 441:15-22; 1988.
51. Suranyi-Cadotte, B. E.; Dam, T. V.; Quiron, R.: Antidepressant-anxiolytic interaction: Decreased density of benzodiazepine receptors in rat brain following chronic administration of antidepressants. *Eur. J. Pharmacol.* 106:673-675; 1984.
52. Suranyi-Cadotte, B. E.; Bodnoff, S. R.; Welner, S. A.: Antidepressant-anxiolytic interactions: Involvement of the benzodiazepine-GABA and serotonin systems. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 14:633-654; 1990.
53. Treit, D.; Pinel, J. P. J.; Fibiger, H. C.: Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15:619-626; 1981.
54. Treit, D.: Animal models for the study of antianxiety agents: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9:203-222; 1985.

5.4 Martínez-Mota L, Estrada-Camarena E, López-Rubalcava C, Contreras CM, Fernández-Guasti A. Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 25: 109-120, 2000.



Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety

Lucía Martínez-Mota ^{a,b,c}, Erika Estrada-Camarena ^{a,b,c},
Carolina López-Rubalcava ^{a,d}, Carlos M. Contreras ^{b,c},
Alonso Fernández-Guasti ^{a,d,*}

^a Departamento de Farmacología, Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV,
P.O. Box 22026, 14000 Mexico D.F., Mexico

^b Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico D.F., Mexico

^c Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico

^d División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, México D.F., Mexico

Received 6 November 1998; accepted 17 June 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract

The present study analyzes if estradiol benzoate and/or progesterone interact with desmethylimipramine (DMI) to diminish experimental anxiety. The animal model of anxiety used was the conditioned defensive burying test. Dose response curves for DMI (0.625, 1.25 and 2.5 mg/kg, every 24 h, during 21 days), estradiol benzoate (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 µg/rat, 48 h) and progesterone (0.5, 1.0 and 2.0 mg/rat, -4 h) were made in ovariectomized rats. DMI per se decreased dose dependently the cumulative burying time, an effect considered as anxiolytic-like. Progesterone produced a decrease in burying at the highest dose, while estradiol benzoate had no effect on defensive burying. Both, progesterone (0.5 mg/rat) and estradiol benzoate (4.0 µg/rat) were able to decrease the cumulative burying behavior when injected with a subthreshold dose of DMI (1.25 mg/kg). In addition, the effect of DMI (1.25 mg/kg) plus the combination of estradiol benzoate and progesterone, sequentially administered (48 h and 4 h before the tests, respectively), also produced a synergistic decrease in burying behavior. In general, the treatments produced no changes in burying behavior latency, neither in spontaneous ambulation or in nociception. It is concluded that DMI synergizes its anxiolytic-like effect when administered with estradiol alone or in combination with progesterone. Present data provide experimental evidence suggesting an interaction between hormones and antidepressants. Results are discussed on the basis of the interaction

* Corresponding author. Tel./fax: + 52-5-513-0432.

E-mail address: fegu@neuroserver.imp-neuro.edu.mx (A. Fernández-Guasti)

between steroids and serotonergic or GABAergic receptors. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Burying behavior; Desipramine; Estradiol; Anxiety; Progesterone

1. Introduction

It has been reported that some women display a series of symptoms related to their menstrual cycle, such as the premenstrual dysphoric disorder characterized by anxiety, depression, irritability, dysphoria and tension (Halbreich et al., 1986; Endicott and Halbreich, 1988). The fluctuation in the levels of steroid hormones, may at least partly, explain the changes in mood observed during the menstrual cycle (Pearlstein, 1995). In female rodents, naturally occurring changes in experimental anxiety have been observed. Thus, several authors have reported that anxiety decreases during the late proestrus and estrous phases (Bitran et al., 1991; Fernández-Guasti and Picazo, 1992), stages typified by the presence of high levels of estradiol and progesterone (Freeman, 1988).

In addition to the physiological actions of endogenous steroid secretions on the female emotionality, other experiments have demonstrated that the anxiolytic effect of diazepam and some 5-HT_{1A} agonists varies through the estrous cycle. These effects were more pronounced in proestrus as compared with diestrus (Fernández-Guasti and Picazo, 1990; Bitran et al., 1991), suggesting an interaction between anxiolytics and steroids (Fernández-Guasti and Picazo, 1990; Bitran and Dowd, 1996). Clinically, De Wit and Rusktalis (1997) demonstrated that the effects of antidepressants and anxiolytics vary during the menstrual cycle being stronger during the luteal phase.

Desmethylimipramine (DMI) is one of the most commonly used drugs in the treatment of depression (Nutt and Glue, 1991). As an additional clinical property, the chronic administration of DMI decreases anxiety on patients suffering from panic and generalized anxiety (Nutt and Glue, 1991; McDougale et al., 1993; Lydiard et al., 1995). Interestingly, the anxiolytic-like effect of DMI is observed in several animal tests after chronic, but not acute, administration (Bodnoff et al., 1988; Laino et al., 1993; Fernández-Guasti et al., 1999).

In a previous work we evaluated the anxiolytic-like effect of DMI in cycling female rats finding a stronger action in proestrus and estrus (Fernández-Guasti et al., 1999). The role that estradiol or progesterone, play in such potentiative effect of DMI is unknown. Therefore, the present study explores the possible interaction of DMI with either estradiol and/or progesterone in its anxiolytic-like action. Initially, dose-response curves for each treatment were established. On these bases, sub-threshold doses were selected to analyze putative interactions.

To evaluate the experimental anxiety, the burying behavior test was selected. Previous experiments demonstrate that this paradigm is sensitive to either pharmacological (Treit, 1985) or physiological changes in experimental anxiety (Fernández-Guasti and Picazo, 1990; López-Rubalcava et al., 1996). An ambulatory behavior

test was also performed in order to exclude putative unspecific drug actions in the burying behavior paradigm. In addition a nociceptive test (tail pinch) was performed to ruled out behavioral actions mediated via analgesic drug or hormones effects.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult female Wistar rats (200–250 g) were used in this study. All animals were housed in a room under a 12/12 h controlled light-dark cycle (lights on at 2200 h) and grouped five per cage. Six days previous to the anxiety test, subjects were individually separated. All animals had ad libitum access to water and food throughout the experiments. The behavioral tests were conducted during the dark phase, between 1200 and 1400 h. All experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals.

2.2. Ovariectomy

The animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (35 mg/kg) and a ventral incision made to expose and remove the ovaries. After suturing muscles and skin, animals were allowed a 2 week recovery period after which they were randomly assigned to the different groups that consisted of 8–10 animals.

2.3. Compounds and treatments

All compounds were purchased from Sigma Chemicals, St. Louis, MO. Estradiol benzoate and progesterone were dissolved in few drops of dichloromethane followed by corn oil and subcutaneously injected in a volume of 0.2 ml/rat 48 or 4 h before the test, respectively. Desmethylimipramine (DMI) was dissolved in saline solution and intraperitoneally injected for 21 consecutive days in a volume of 2.0 ml/kg. The last DMI injection was made 2 h before the anxiety test. The time of administration and the doses were selected according to previous reports (Fernández-Guasti et al., 1999). Control groups for steroid hormone-treatments received oil and for DMI, saline solution.

In an initial series of experiments a dose response curve for estradiol benzoate (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$), progesterone (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/rat) and chronic DMI (0.0, 0.625, 1.25 and 2.5 mg/kg) were made. In the second series the possible interaction between subthreshold doses of either estradiol benzoate (4.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$) or progesterone (0.5 mg/rat), as previously selected, and DMI (0.625, 1.25 and 2.5 mg/kg) was analyzed. Finally, the effect of the combined

sequential treatment with estradiol benzoate (4.0 µg/rat) and progesterone (0.5 mg/rat) with DMI (1.25 mg/kg) was studied.

2.4. *Burying behavior test*

The burying behavior test was performed in an acrylic cage measuring 27 × 16 × 23 cm, with a bed of 5 cm of fine sawdust. The experimental cage contained an electrified prod (7 cm long) that emerged from one of its walls, 2 cm above the bedding material. Every time the animal touched the prod it received an electric shock of 0.3 mA. The source of the shock was a constant current shocker (La Fayette Instruments Co., model 5806). Immediately after the placement of the animal in the cage, its behavior was registered for 10 min. Once the animal received the shock, it typically moved towards the prod recognizing it as the aversive stimulus. The animal then sprayed and pushed a pile of bedding material ahead with rapid alternating movements of its forepaws. The parameters registered were the cumulative burying behavior (cumulative time (s) that animals spend burying the prod) and the burying behavior latency (time in seconds from the first shock to the burying behavior display). Cumulative burying behavior indicated the experimental anxiety levels while the burying behavior latency was interpreted as a reactivity index.

2.5. *Tail pinch test*

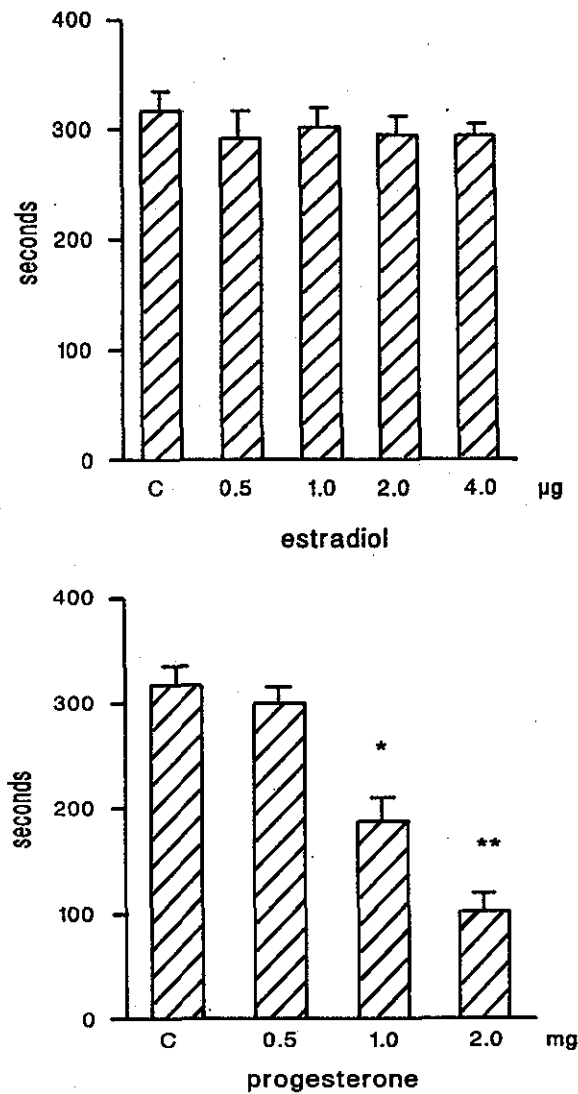
This test has been proposed as a behavioral method for studying analgesic activity (Green and Young, 1951; Bianchi and David, 1960) and consists in applying an alligator clip 3 cm from the tip of the rat's tail. The latency (expressed in seconds) to the first tail flick was recorded. A tail flick was defined as a rapid continuous movement of the tail from below to above the horizontal and down again. In this test groups consisted of at least eight rats. Several reports indicate that various analgesic treatments increase the tail flick latency (Bianchi and David, 1960; Pertovaara et al., 1991; Kuniyama et al., 1992), thus greater latencies are interpreted as a sign of analgesia. The criterion used to test a given group for analgesic effects was that the pharmacological treatment applied reduced burying behavior.

2.6. *Ambulatory behavior test*

All rats were tested for ambulatory behavior that was evaluated in a transparent acrylic box (44 × 33 × 19 cm) placed over a sensitive plate (48 × 40 cm) of an activity meter (Stoelting Co., Chicago, IL) and connected to an automatic counter (Stoelting). Each animal was placed in the cage and the number of counts recorded after a 10 min period. The data are expressed as mean number of counts in 10 min.

2.7. Statistical analysis

A Kruskal–Wallis one-way ANOVA test was used to analyze the results of all experiments. When the variance analysis showed statistically significant differences smaller than $P < .05$, post hoc paired comparisons against one control group were performed using the Dunn's test. Specific paired comparisons were made using the Mann–Whitney U -test.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1. Doses-response curves of of estradiol benzoate (upper panel) and progesterone (lower panel) on the cumulative burying behavior. Dunn's test, * $P < .05$, ** $P < .001$.

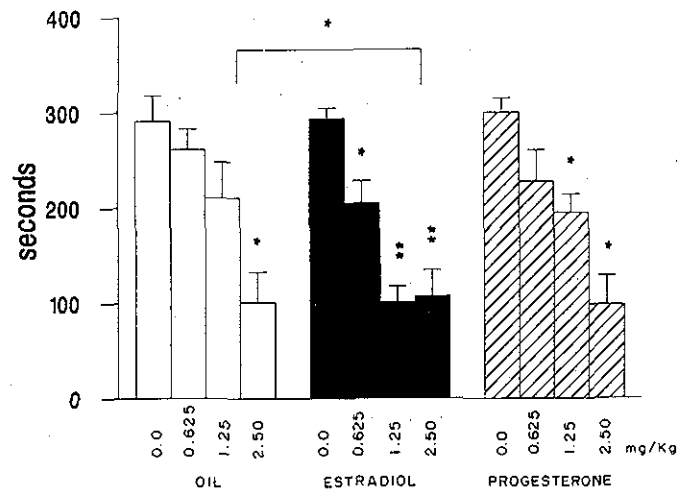


Fig. 2. Doses-response curves of DMI alone (clear bars), plus estradiol benzoate 4.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (dark bars) or plus progesterone 0.5 mg/rat (dashed bars) on the cumulative burying behavior. Dunn's test, * $P < .001$, ** $P < .0001$. Bracket comparison by Mann-Whitney U -test, * $P < .05$.

3. Results

Figure 1 illustrates the effect of different doses of estradiol benzoate (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$, upper panel) and progesterone (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/rat, lower panel) on the cumulative burying behavior in ovariectomized rats. Neither the cumulative burying behavior nor the burying behavior latency (data not shown) was modified by estradiol benzoate injection. Conversely, progesterone induced a reduction of the cumulative burying behavior ($H = 27.5$, $df3$, $P = .001$), which was statistically significant at the doses of 1.0 and 2.0 mg/rat.

Figure 2 compares the dose response curve to DMI alone or in combination with estradiol benzoate (4.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$) or progesterone (0.5 mg/rat) on the cumulative burying behavior in ovariectomized rats. Long-term treatment with DMI significantly decreased the cumulative burying behavior ($H = 13.8$, $df3$, $P = .003$), only at the highest dose (2.5 mg/kg) a difference with respect to the saline-treated group was observed.

Treatment with estradiol benzoate (4.0 $\mu\text{g}/\text{rat}$) in combination with all doses of DMI drastically reduced the cumulative burying behavior ($H = 22.9$, $df3$, $P = .0001$). All doses of DMI when combined with estradiol benzoate produced a statistically significant reduction in cumulative burying behavior when compared to the control group. Interestingly, DMI at 1.25 mg/kg synergizes with estradiol on the cumulative burying behavior; accordingly, this reduction was also statistically different when compared with the DMI-alone group.

Progesterone combined with DMI decreased the cumulative burying behavior ($H = 19.3$, $df3$, $P = .0004$). This effect was statistically significant for the doses of 1.25 and 2.5 mg/kg. However, since no differences between any of the DMI plus

progesterone treated groups versus the DMI-alone groups were found, no synergism of DMI with this steroid can be proposed.

Figure 3 compares the effect of the sequential combination of estradiol benzoate (4.0 µg/rat, -48 h) plus progesterone (0.5 mg/rat, -4 h) in ovariectomized rats treated chronically with DMI (1.25 mg/kg). In the cumulative burying behavior, the Kruskal–Wallis ANOVA test showed significant differences among the treatments ($H = 13.2$, $df3$, $P = .004$). The combination of estradiol and progesterone in rats chronically treated with DMI significantly decreased this parameter with respect to the control groups. It is worth mentioning that the combined administration of estrogen and progesterone plus DMI produced a reduction in burying behavior that was statistically different from that produced by progesterone plus DMI ($P < .05$, a Mann–Whitney U -test) but not from that by estradiol plus DMI ($P = .27$, Mann–Whitney U -test).

Only the low dose of DMI (0.625 mg/kg) in combination with estradiol benzoate ($H = 9.26$, $df3$, $P = .02$) produced a reduction in ambulatory behavior (Table 1).

The results obtained in a nociceptive test with those treatments that reduced burying behavior showed that none of them produced analgesic effects. Thus, the tail flick latency expressed in seconds were (mean \pm SE): saline 10.73 \pm 4.9; progesterone (2.0 mg/rat), 4.80 \pm 1.52; DMI (2.5 mg/kg), 8.75 \pm 2.97; and estradiol (4 µg/rat) and progesterone (0.5 mg/rat) plus DMI (1.25 mg/kg), 7.40 \pm 3.46. Kruskal–Wallis ANOVA, $H = 0.38$, $df3$, $P = .94$.

Finally, no treatment affected the burying behavior latency (data not shown).

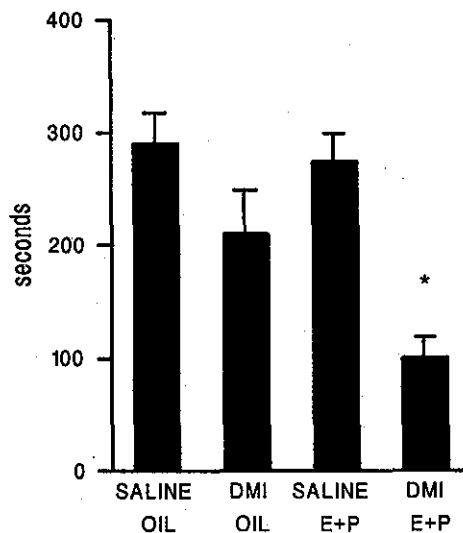


Fig. 3. Interaction of DMI (1.25 mg/kg) plus the steroid combination of estradiol benzoate (4.0 µg/rat, E) and progesterone (0.5 mg/rat, P) on the cumulative burying behavior. Dunn's test, * $P < .05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1

Effect of DMI alone or in combined treatment with estradiol benzoate (EB) or progesterone (P) on ambulatory behavior^a

Hormones	Chronic treatment			
	Saline	DMI (mg/kg)		
		0.625	1.25	2.5
–	273 ± 27	346 ± 34	346 ± 41	246 ± 19
EB	316 ± 17	196 ± 19*	322 ± 35	290 ± 29
P	323 ± 23	226 ± 23	313 ± 17	260 ± 28

^a Table shows mean ± SE values. Statistical comparisons were made versus the control saline group by means of the Kruskal–Wallis one way-ANOVA (data in text) followed by the Dunn's test, * $P < .05$.

4. Discussion

In the present study, DMI produced an anxiolytic-like effect in the burying behavior paradigm, which was synergized by estradiol benzoate alone or in combination with progesterone.

The tricyclic antidepressant, DMI is frequently used in the therapy of several anxiety disorders (Nutt and Glue, 1991; Lydiard et al., 1995). At the experimental level, DMI produces anxiolytic-like effects in various paradigms including food intake in a novel environment (Suranyi-Cadotte et al., 1990), emission of ultrasonic vocalizations (Molewijk et al., 1996), exploration in the elevated plus maze (Laino et al., 1993) and defensive burying behavior (Fernández-Guasti et al., 1999). In addition, Bodnoff et al. (1989) have demonstrated that long-term treatment with DMI induces anxiolytic actions similar to those produced by diazepam.

The initial effects of DMI include, within others, the blocking of the chloride channel coupled to the GABA_A-BZ-chloride ionophore receptor complex (Squires and Saederup, 1988; Fernández-Teruel et al., 1990). However, after chronic treatment, this drug produces an increased capacity to generate chloride currents (Petty and Sherman, 1981). On the basis of behavioral results, Suranyi-Cadotte et al. (1990) suggested that this last mechanism could mediate the anxiolytic activity of some antidepressants. However, other possible explanation could include that the chronic administration of tricyclic antidepressants results in a down-regulation of 5-HT₂ receptors (Peroutka and Snyder, 1980; Schreiber and De Vry, 1993) and a sensitization or up-regulation of 5-HT_{1A} receptors (Lund et al., 1992), which have been also implicated in anxiety disorders (Schreiber and De Vry, 1993). Therefore, in addition to the GABAergic system, it is possible to suggest that the anxiolytic-like effects produced by DMI are mediated through a serotonergic mechanism.

Priming with low doses of estradiol does not commonly produce anxiolytic activity (Bitran et al., 1991; Fernández-Guasti and Picazo, 1992; present data). When estradiol benzoate was administered in rats chronically treated with sub-threshold doses of DMI, a drastic anxiolytic-like effect was observed. The mecha-

nism underlying such synergism could include the effect of both, estrogens and DMI on the sensitivity of 5-HT_{1A} receptors (Lakoski, 1989; Lund et al., 1992; Salamanca and Uphouse, 1992; Österlund and Hurd, 1998). The nature of this sensitization seems to be inverse. Thus, while estrogens produce a down-regulation, chronic DMI treatment results in an up-regulation. Such inverse actions, however, could explain a synergistic action of estrogen and DMI by a differential action on either pre- or post-synaptic 5-HT_{1A} receptors. Another non-exclusive interpretation involves the GABAergic system. Thus, Pérez et al. (1987) have reported that estrogen treatment produces an increase in the number of binding sites to muscimol, diazepam and the chloride ionophore agonist, *t*-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) without modifying their affinity. These data, together with those reported by Suranyi-Cadotte et al. (1990) (*vide supra*) indicating a relation of DMI and the GABA_A-BZD receptor complex, suggest that the site at which DMI act to produce its anxiolytic-like effects could be multiplied by estrogen priming.

Some authors have reported progesterone as a hormone with anesthetic, sedative and anxiolytic properties (Majewska, 1992; Bitran et al., 1993, 1995). The present study confirms the anxiolytic-like effect of progesterone. As previously suggested the mechanism proposed for such actions involves the GABA_A receptor (Majewska et al. 1986; Bitran and Dowd, 1996). In the present study, subthreshold doses of progesterone (0.5 mg/rat) and DMI (1.25 mg/kg) produced anxiolytic-like effects that could be explained by the summed action of progesterone and DMI on the GABA_A-BZD complex.

The sequential administration of estradiol and progesterone may cause anxiolysis in a conflict paradigm (Rodríguez-Sierra et al., 1984), but lacks an anxiolytic-like effect in the burying behavior (Fernández-Guasti and Picazo, 1992; present data) and plus maze tests (Bitran and Dowd, 1996). Such sequential hormonal treatment in combination with a subthreshold dose of DMI (1.25 mg/kg) produced a significant synergistic decrease in burying behavior. Since these effects were similar to those produced by estradiol plus DMI but stronger than those of progesterone plus DMI, it is proposed that in the synergism observed, estradiol is the crucial hormone.

In a previous work we reported that the anxiolytic-like effect of DMI was more robust during the proestrus-estrus phases (Fernández-Guasti et al., 1999). However, in that study we were unable to determine the steroid hormones underlying such effect. Present results suggest that DMI interacts primarily with estrogens secreted by the ovary during the estrous cycle.

The lack of effect of most of these treatments on ambulation indicates that the reductions in burying behavior can be interpreted as specific anxiolytic-like effects. However, the combined treatment with the low-, but not the medium- or high-dose of DMI and estradiol resulted in a diminished ambulatory behavior, therefore masking possible anxiolytic-like actions of these combinations. Additionally, it could be argued that the reductions in burying behavior observed after some treatment are mediated via an antinociceptive drug action (Hersh and Kaplan, 1990; Caba et al., 1994; Dawson-Basoa and Gintzler, 1996). However, since in the tail pinch test, no treatment produced antinociception, this possibility can be ruled

out and further sustains that the reductions in burying behavior reflect specific anxiety-like responses. Finally, the burying behavior latency that has been interpreted as an index of reactivity was unaffected by the treatments here used.

Although controversial some clinical data have reported that in postmenopausal women there is a positive effect of the combination of antidepressants plus estrogens on the antidepressant treatment response (Stahl, 1998). Thus, for example, treatment with fluoxetine to postmenopausal patients with major depression produced an efficacy of 32% compared with a placebo rate of 18%. However, among women who had been receiving estrogen replacement therapy, the difference between drug and placebo was three times greater (Stahl, 1998). Present data provide the first experimental evidence suggesting an interaction between hormones and antidepressants in their anxiolytic action.

In conclusion, it is proposed that DMI interacts with estradiol, progesterone and the hormonal combination. The most striking interactions were observed with the combination of estradiol and DMI.

Acknowledgements

Authors wish to thank Víctor Flores for animal caring and Facundo Moreno for technical assistance. This work was partially supported by a grant to C.L.-R. from CINVESTAV (JIRA-97/026). E.E.-C. and L.M.-M. received a fellowship from the 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología' (96338 and 96134) and the 'Sistema Nacional de Investigadores' (3500).

References

- Bianchi, C., David, A., 1960. Analgesic properties of 4-ethoxycarbonyl-1-(2-hydroxy-3-phenoxypropyl)-4-phenylpiperidine (B.D.H.200) and some related compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 12, 449–459.
- Bitran, D., Hilvers, R.J., Kellogg, C.K., 1991. Ovarian endocrine status regulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of γ -aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav. Neurosci.* 105, 653–662.
- Bitran, D., Purdy, R.H., Kellogg, C.K., 1993. Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABA receptor function. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 423–428.
- Bitran, D., Shiekh, M., McLeod, M., 1995. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnenolone at brain GABA_A receptors. *J. Neuroendocrinol.* 7, 171–177.
- Bitran, D., Dowd, J.A., 1996. Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology* 125, 573–583.
- Bodnoff, S.R., Suranyi-Cadotte, B., Aitken, D.H., Quirion, R., Meaney, M.J., 1988. The effect of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 95, 298–302.
- Bodnoff, S.R., Suranyi-Cadotte, B., Quirion, R., Meaney, M.J., 1989. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical antidepressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 97, 277–279.
- Caba, M., González-Mariscal, G., Beyer, C., 1994. Perispinal progestins enhance the antinociceptive effects of muscimol in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47, 177–182.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Dawson-Basoa, M.E., Gintzler, A.R., 1996. Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. *Pain* 64, 608–615.
- De Wit, H., Rukstalis, M., 1997. Acute effects of triazolam in women: relationship with progesterone, estradiol and allopregnanolone. *Psychopharmacology* 130, 69–78.
- Endicott, J., Halbreich, U., 1988. Clinical significance of premenstrual dysphoric changes. *J. Clin. Psychiatry* 49, 486–489.
- Fernández-Guasti, A., Picazo, O., 1990. The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 77–81.
- Fernández-Guasti, A., Picazo, O., 1992. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effects of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* 17, 681–689.
- Fernández-Guasti, A., Contreras, C.M., Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., López-Rubalcava, C., 1999. Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle dependent anxiolytic action in the burying behavior but not in the plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63, 13–20.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Boix, F., Longoni, B., Corda, M.G., Tobeña, A., 1990. Imipramine and desipramine decrease the GABA-stimulated chloride uptake, and antiGABAergic agents enhance their action in the forced swimming test in rats. *Neuropsychobiology* 23, 147–152.
- Freeman, M.E., 1988. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 2. Raven Press, New York, pp. 1893–1928.
- Green, A.F., Young, P.A., 1951. A comparison of heat and pressure analgesiometric methods in rats. *Br. J. Pharmacol.* 6, 572–585.
- Halbreich, U., Endicott, J., Goldstein, S., Nee, J., 1986. Premenstrual changes and changes in gonadal hormones. *Acta Psychiatr. Scand.* 74, 576–586.
- Hersh, E.V., Kaplan, P., 1990. Antinociceptive action of tricyclic antidepressants in the rat. *Anesth. Prog.* 37, 186–189.
- Kunihara, M., Ohyama, M., Nakano, M., 1992. Central monoaminergic mechanisms in mice and analgesic activity of spiradoline mesylate, a selective kappa-opioid receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 214, 111–118.
- Laino, C.H., Cordoba, N.E., Orsingher, O.A., 1993. Perinatally protein-deprived rats and reactivity to anxiolytic drugs in the plus-maze test: an animal model for screening antipanic agents? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 89–94.
- Lakoski, J.M., 1989. Cellular electrophysiological approaches to the central regulation of female reproductive aging. In: Lakoski, J.M., Perez-Polo, J.L., Rassin, D.K. (Eds.), *Neurology and Neurobiology, Neural Control of Reproductive Function*, vol. 50. Liss, New York, pp. 209–220.
- López-Rubalcava, C., Fernández-Guasti, A., Urbá-Holmgren, R., 1996. Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT_{1A} compounds. *Dev. Psychobiol.* 29, 157–169.
- Lund, A., Mjelle-Holy, N., Hole, K., 1992. Desipramine, administered chronically influences 5-hydroxytryptamine 1A-receptors as measured by behavioral tests and receptor binding in rats. *Neuropharmacology* 31, 25–32.
- Lydiard, R.B., Morton, W.A., Emmanuel, N.P., Zealberg, J.J., Laraia, M.T., Stuart, G.W., O'Neil, P.M., Ballenger, J.C., 1995. Preliminary report: placebo-controlled, double-blind study of the clinical and metabolic effects of desipramine in panic disorder. *Psychopharmacol. Bull.* 29, 183–188.
- Majewska, M.D., Harrison, W.L., Schwartz, R.A., Barker, M., Paul, S.M., 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004–1007.
- Majewska, M.D., 1992. Neurosteroids. Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor: mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38, 379–395.
- McDougle, C.J., Goodman, W.K., Price, L.H., 1993. The pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacopsychiatry* 26 (Suppl 1), 24–29.
- Molewijk, H.E., Hartog, K., van der Poel, A.M., Moss, J., Olivier, B., 1996. Reduction of guinea pig pups isolation calls by anxiolytic and antidepressant drugs. *Psychopharmacology* 128, 31–38.
- Nutt, D.J., Glue, P., 1991. Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: a psychopharmacological perspective. In: Bowman, W.C. (Ed.), *Psychopharmacology of Anxiolytics and Antidepressants*. Pergamon, Glasgow, pp. 1–15.

- Österlund, M., Hurd, Y.E., 1998. Acute 17 β -estradiol treatment down-regulates serotonin 5-HT_{1A} receptor mRNA expression in the limbic system of female rats. *Mol. Brain Res.* 55, 169–172.
- Pearlstein, T.B., 1995. Hormones and depression: what are the facts about premenstrual syndrome, menopause, and hormone replacement therapy? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173, 646–653.
- Pérez, J., Zucchi, Y., Maggi, A., 1987. Estrogen modulation of the γ -amino butyric acid receptor complex in the central nervous system of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 1005–1010.
- Peroutka, S.J., Snyder, S.H., 1980. Long-term antidepressant treatment lowering spiperidol labeled serotonin receptor binding. *Science* 210, 88.
- Pertovaara, A., Mecke, E., Carlson, S., 1991. Attempted reversal of cocaine-induced antinociceptive effect with naloxone, and opioid antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 192, 349–353.
- Petty, F., Sherman, A.D., 1981. GABAergic modulation of learned helplessness. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 567–570.
- Rodríguez-Sierra, J.F., Howard, J.L., Pollard, G.T., Hendricks, S.E., 1984. Effect of ovarian hormones on conflict behavior. *Psychoneuroendocrinology* 9, 293–300.
- Salamanca, S., Uphouse, L., 1992. Estradiol modulation of the hyperphagia induced by the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 953–956.
- Schreiber, R., De Vry, J., 1993. 5-HT_{1A} receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanism of action? *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 17, 87–104.
- Squires, R.F., Saederup, E., 1988. Antidepressants and metabolites that block GABA_A receptors coupled to 35S-*t*-butyl-bicyclophosphorothionate binding sites in rat brain. *Brain Res.* 441, 15–22.
- Stahl, S.M., 1998. Basic pharmacology of antidepressants, Part 22: estrogen as an adjunct to antidepressant treatment. *J. Clin. Psychiatry* 59 (Suppl 4), 15–25.
- Suranyi-Cadotte, B.E., Bodnoff, S.R., Welner, S.A., 1990. Antidepressant-anxiolytic interactions: involvement of the benzodiazepine-GABA and serotonin systems. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 14, 633–654.
- Treit, D., 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 203–222.

CAPITULO VI

Discusión General y Conclusiones

Los resultados de la presente investigación son los siguientes: en la prueba de nado forzado, las ratas hembras en proestro-estro tuvieron mayor latencia a la inmovilidad (120 % comparado con metaestro-diestro) y menor tiempo de inmovilidad, lo cual se semeja a un efecto antidepresivo. Un segundo experimento demostró que la administración de progesterona a ratas ovariectomizadas reduce el tiempo de inmovilidad (75 % con respecto al control), lo que confirma la participación de este esteroide sobre los efectos encontrados en las ratas en proestro-estro. *Por otra parte, las acciones antidepresiva y ansiolítica producidas por la desmetilimipramina fueron modificadas dependiendo de factores tales como el modelo experimental utilizado (depresión o ansiedad) y el estado endocrino de los animales (ovariectomía o las diferentes fases de ciclo estral).* Así, en las ratas intactas forzadas a nadar, la desmetilimipramina produjo acciones antidepresivas evidenciadas por un aumento en la latencia al primer periodo de inmovilidad (150 % en comparación con salina) y dicho efecto fue independiente de la fase del ciclo estral. Este mismo tratamiento redujo la ansiedad en ratas ovariectomizadas, evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo y en el laberinto elevado en cruz. En las ratas clasificadas por fase de ciclo, el efecto de la desmetilimipramina dependió del modelo de ansiedad: se observó una carencia de efecto en el laberinto elevado en cruz en tanto que un efecto ansiolítico se produjo en la prueba de enterramiento defensivo, principalmente en las ratas en proestro (50 % con respecto al control), una fase del ciclo que se caracteriza por concentraciones elevadas de estrógenos y progesterona. Un experimento posterior demostró que tanto el estradiol como la progesterona o la combinación de ambas hormonas facilitaron el efecto ansiolítico de dosis sub-umbrales de la desmetilimipramina en la prueba de enterramiento defensivo. De ambas hormonas, el estradiol destacó como la más relevante, ya que facilitó las acciones ansiolíticas de la desmetilimipramina a la dosis más baja

utilizada para los experimentos de ansiedad (0.625 mg/kg). En resumen, estos resultados apoyan la idea de la participación del estradiol y la progesterona en la regulación de aquellas conductas que se considera, reflejan depresión y ansiedad experimentales en la rata.

6.1. Prueba de nado forzado y parámetros evaluados

El método de registro clásico para evaluar el efecto de los antidepresivos en la prueba de nado es básicamente la medición del tiempo total de inmovilidad (Porsolt y cols., 1979; Borsini y cols., 1986; Borsini y Meli, 1988; Contreras y cols., 1995). En nuestro primer experimento (sección 5.1) cuantificamos la latencia al primer periodo de inmovilidad, la cual fue definida como el tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba hasta que se presentó por primera vez la inmovilidad. De acuerdo con nuestras observaciones, esta latencia se correlacionó negativamente con el tiempo de inmovilidad, es decir, la desmetilimipramina produjo una mayor latencia a la primer inmovilidad y una disminución del tiempo. Por lo tanto, estos cambios producidos en ambas variables son indicadores de un efecto antidepresivo. Tal interpretación se fundamenta en el esfuerzo que los animales realizan antes de abatirse por la situación apremiante, que en el caso particular del modelo de nado forzado, se produce por la restricción de espacio, la temperatura y la profundidad del agua. De esta forma, la latencia al primer periodo de inmovilidad refleja el tiempo que los animales se esfuerzan por resolver una situación apremiante, por lo que un animal muy "motivado" se esforzará por más tiempo antes de permanecer inmóvil (Contreras y cols., 1995; Espejo y Minano, 1998).

6.2. Efecto de la fase del ciclo estral en la prueba de nado forzado

El propósito de este experimento fue explorar la posible asociación entre las fluctuaciones de las hormonas ováricas de la rata y los niveles de depresión experimental (sección 5.1). Para ello, los animales fueron agrupados de acuerdo a la fase del ciclo estral, tomando en consideración que cada una de estas etapas tiene una correspondencia con ciertos

niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona (Freeman, 1988). Encontramos que la latencia al primer periodo de inmovilidad fue mayor durante las fases de proestro y estro (120 %) con respecto a las otras fases de ciclo, en paralelo con una menor inmovilidad. Asimismo, no se observaron cambios en la actividad ambulatoria de los animales en las diferentes fases del ciclo, por lo que los cambios en la inmovilidad en la prueba de nado no estuvieron influenciados por alteraciones motoras. Los resultados obtenidos en la prueba de nado sugieren que durante el proestro y el estro de la rata es más difícil provocar desesperanza, un efecto posiblemente ligado a las concentraciones elevadas de estrógenos y de progesterona presentes en tales fases del ciclo reproductivo. Esta afirmación se basa en las siguientes evidencias: a) el estrés agudo (choques eléctricos en las patas) favorece un incremento de la inmovilidad en las ratas en diestro, un efecto que no se produce en las ratas en estro (Marván y cols., 1997); b) la ansiedad es menor durante el proestro tardío, un efecto mediado principalmente por la progesterona (Fernández-Guasti y cols., 1992); c) la ansiedad es menor durante la gestación, un efecto atribuido al aumento de la concentración de estrógenos y progesterona (Picazo y Fernández-Guasti, 1993); d) durante la gestación se produce un aumento de la frecuencia de reforzamiento en el paradigma diferencial de frecuencia de reforzamiento baja, interpretado como un efecto antidepresivo. Esto sugiere que la concentración mayor de hormonas ováricas en el proestro y el estro protege contra algunas consecuencias del estrés, como el aumento del tiempo de inmovilidad en la prueba de nado. El mecanismo para tal regulación es desconocido, sin embargo, podemos sugerir que se establece por acciones de ambas hormonas sobre el funcionamiento de algunos sistemas de neurotransmisión, por ejemplo, los sistemas GABAérgico y serotoninérgico (Lu y cols., 1999).

Majewska (1992) y Pearlstein (1995) han propuesto que los trastornos del estado de ánimo asociados al parto y al final de la fase lútea son consecuencia de la abstinencia a las concentraciones elevadas de progesterona presentes en estas etapas. Algunas evidencias

experimentales apoyan esta inferencia. El tratamiento con progesterona en dosis consideradas fisiológicas reduce la ansiedad experimental en la rata; por el contrario, suprimir la administración de la hormona después de haberla administrado en dosis elevadas induce un incremento de la ansiedad durante el periodo de supresión hormonal (Gallo y Smith., 1993). Este esquema de administración-supresión de progesterona pretende imitar los cambios hormonales ocurridos en las mujeres, los cuales son parcialmente responsables del síndrome premenstrual. El mismo efecto sobre la ansiedad (elevación) se logra cuando se ovariectomizan ratas a las cuales se les ha inducido un estado de pseudogestación caracterizado por concentraciones elevadas de progesterona plasmática (Smith y cols., 1998a; 1998b). Hasta el momento, no se han descrito resultados semejantes usando modelos animales de depresión. No obstante, en nuestro trabajo encontramos una menor latencia a la inmovilidad en las ratas en diestro-metaestro en comparación con el proestro-estro (sección 5.1) y un incremento de la inmovilidad durante el periodo de lavado de progesterona (sección 5.2), lo cual podría reflejar una alteración conductual asociada al decremento del nivel plasmático de las hormonas ováricas.

6.3. Efecto de la progesterona y el estradiol en la prueba de nado forzado

El propósito del segundo experimento fue determinar la participación de la progesterona en la reducción de la inmovilidad observada en las ratas en proestro-estro (5.2). Para ello, se administraron diferentes dosis de progesterona a ratas ovariectomizadas, basándonos en aquellas reportadas como efectivas para inducir receptividad sexual en las ratas ovariectomizadas tratadas previamente con estradiol (Feder, 1981; Freeman, 1988). Encontramos que la progesterona disminuyó el tiempo de inmovilidad de manera dosis-dependiente, sin modificar la actividad ambulatoria. El efecto anti-inmovilidad de la progesterona se produjo a partir de la dosis de 0.4 mg/kg, es decir, a una dosis menor que la que induce receptividad sexual. La explicación del efecto anti-inmovilidad producido por la progesterona

está relacionado con las acciones de esta hormona sobre sus receptores intracelulares así como sobre los membranales del sistema nervioso central. La progesterona produce diferentes efectos en el organismo de los mamíferos dependiendo del tejido blanco y del mecanismo de acción (Brann y cols., 1995; Mahesh y cols., 1996). Así, las acciones genómicas de la progesterona dependen de la secreción o administración previa de estrógenos, los cuales inducen la producción de receptores a progesterona (McEwen, 1991). Por otra parte, las acciones membranales de la progesterona son de instauración rápida (McEwen y Parsons, 1982; McEwen, 1991). En nuestro trabajo, el efecto anti-inmovilidad de la progesterona se produjo dos horas después de la última inyección. Dado que las ratas no fueron pre-tratadas con estradiol, es probable que las acciones anti-inmovilidad de la progesterona en la prueba de nado forzado estén reguladas por un mecanismo no-genómico, en donde el candidato más fuerte es el complejo GABA_A-benzodiazepina-ionóforo de cloro (Majewska, 1992; Lambert y cols., 1995; Rupprecht, 1997). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el efecto antidepresivo de la progesterona esté mediado por los receptores intracelulares (McEwen, 1991).

La progesterona y otras progestinas más potentes, como su metabolito reducido alopregnanolona, se unen a un sitio de unión a neuroesteroides que posee el receptor GABA_A (Gee y cols., 1988; Lan y cols., 1990); en consecuencia, estas hormonas son capaces de aumentar la hiperpolarización neuronal producida por el GABA (McEwen, 1991). Por lo que es posible que el efecto anti-inmovilidad producido por la progesterona en la prueba de nado se deba a la interacción de la hormona con dicho receptor. Tal interpretación es apoyada indirectamente por las siguientes observaciones: a) los pacientes deprimidos así como las ratas desesperanzadas tienen bajos niveles del GABA en el líquido cefalorraquídeo (Petty, 1995; Petty y Sherman, 1982); b) el alprazolam, un derivado de las benzodiazepinas, se prescribe como tratamiento en pacientes deprimidos (Petty y cols., 1995) y reduce la inmovilidad en la

prueba de nado forzado (Cannizzaro y cols., 1995); c) la administración de progesterona directamente en el núcleo septal lateral promueve un efecto anti-inmovilidad que es bloqueado por la inyección sistémica de picrotoxina (Estrada-Camarena y cols., 2002a). La picrotoxina es un antagonista del canal de cloro acoplado al receptor GABA_A, por lo que se concluye que dicho complejo participa en el efecto antidepresivo de la progesterona (Estrada-Camarena y cols., 2002a). Tomando como referencia estos resultados, es probable que el efecto antidepresivo producido por la administración sistémica de progesterona esté mediado por el complejo GABA_A-benzodiazepina-ionóforo de cloro.

Otro punto a considerar en el efecto anti-inmovilidad producido por la progesterona son los productos de su metabolismo. Esta hormona es precursora de la alopregnanolona, un metabolito reducido con mayor potencia fisiológica que la progesterona (McEwen, 1991) y que se conoce por sus acciones sedantes, anti-convulsivas y ansiolíticas (Bitran y cols., 1991b; Fernández-Guasti y Picazo, 1995). De hecho, tales propiedades farmacológicas se relacionan con la capacidad de este metabolito de modular positivamente al canal de cloro del receptor GABA_A (McEwen, 1991) y algunos autores han propuesto que su presencia en el sistema nervioso central parece cumplir una función de protección ante ciertas situaciones aversivas (Barbaccia y cols., 1996; 1997). Frye y Walf (2002) demostraron que la aplicación intrahipocampal o sistémica de finasteride, un inhibidor de la 5 α -reductasa, la enzima que metaboliza a la progesterona, provoca un aumento de la ansiedad así como de la desesperanza determinada en la prueba de nado forzado en ratas en proestro a las cuales se les había dectado concentraciones altas de alopregnanolona. Por lo tanto, es probable el efecto anti-inmovilidad de la progesterona encontrado en nuestro estudio también se deba a la acción del metabolito reducido.

En nuestros experimentos de nado forzado no evaluamos el efecto de los estrógenos

sobre la conducta de inmovilidad. Sin embargo, otros autores han encontrado que la administración crónica (por 7 días) o aguda (48 h antes del registro), de estrógenos naturales reducen la inmovilidad en la prueba de nado forzado e incrementa la conducta de nado (Estrada-Camarena y cols., 2002b; Rachmann y cols., 1998) de manera semejante a como lo hacen los antidepresivos con afinidad por el sistema serotoninérgico (Detke y cols., 1995). Estrada-Camarena y cols. (2002b) encontraron que la reducción de la inmovilidad producida por los estrógenos se bloquea con WAY 100635 y con RU 58688, antagonista a los receptores 5-HT_{1A} y a estrógenos, respectivamente. Por lo tanto, ambos receptores, el primero de ellos de tipo membranal y el segundo de tipo intracelular, participan en el efecto antidepresivo de los estrógenos en la prueba de nado forzado.

6.4. Efecto de la Desmetilimipramina en la prueba de nado forzado.

El propósito de este experimento fue explorar las posibles variaciones del efecto antidepresivo de la desmetilimipramina durante las diferentes fases del ciclo estral (5.1). La dosis del antidepresivo (2.5 mg/kg, i.p, por 21 días) se eligió a partir de un trabajo previo, en el que el tratamiento de largo plazo con desmetilimipramina incrementó la tasa de disparo de las neuronas del núcleo septal lateral (Molina y cols., 1996). Esta estructura cerebral es de particular importancia para el fenómeno de la depresión dado que participa en las acciones farmacológicas de diversas terapias antidepresivas (Contreras y cols., 1989; 1990; 1992). En nuestro estudio conductual, la desmetilimipramina incrementó (150 %) la latencia al primer periodo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, un efecto considerado como antidepresivo (*vide supra*). Se ha establecido que las acciones anti-inmovilidad de la desmetilimipramina en la prueba de nado forzado se producen principalmente por cambios en el sistema noradrenérgico (Page y cols., 1999). La desmetilimipramina es un inhibidor potente de la recaptura de NA y su administración de largo plazo promueve la regulación a la baja de los receptores β 1- y α 2-adrenérgicos (Bergstrom y Kellar, 1979; Argenti y D'Mello, 1994). Mediante experimentos con

los modelos animales de depresión de bulbectomía y de desesperanza aprendida, se ha demostrado que estos cambios a nivel de receptores son subyacentes al efecto antidepresivo de la desmetilimipramina (Martin y cols., 1989; Mudunkotwa y Horton, 1996).

Otros sistemas de neurotransmisión, tales como el dopaminérgico, el serotoninérgico y el GABAérgico, también participan en las acciones antidepresivas de la desmetilimipramina. Se ha reportado que este tricíclico produce liberación de la DA en la corteza frontal de la rata (Tanda y cols., 1994) y su efecto antidepresivo evaluado en la prueba de nado forzado es bloqueado parcialmente por la lesión de las terminales dopaminérgicas (Cervo y Samanin, 1987). El efecto antidepresivo de la desmetilimipramina en la prueba de nado también es bloqueado por antagonistas para los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}, (Detke y cols., 1995a; Redrobe y cols., 1996) y sus acciones de regulación a la baja de los receptores 5-HT₂ son bloqueadas por la lesión de las terminales serotoninérgicas (Bergstrom y Kellar, 1979). Por lo tanto, la desmetilimipramina modifica algunos componentes de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico para producir sus acciones antidepresivas.

Por otra parte, se ha establecido una relación entre el efecto antidepresivo de la desmetilimipramina y los receptores GABAérgicos. Loyd y cols. (1985) describen que el tratamiento crónico con este antidepresivo tricíclico (18 días) incrementa la unión de [³H]GABA en la corteza frontal de la rata, un efecto producido por un aumento en la densidad de los receptores GABA_B. De acuerdo con los autores, los cambios en la densidad de estos receptores podrían ser considerados como un indicador de las acciones de los antidepresivos. Tal afirmación es apoyada por estudios, ya que la administración de reserpina, un inductor de depresión, disminuye la densidad de los receptores GABA_B, en tanto que otros fármacos sin actividad pro- o antidepresiva carecen de efecto sobre la densidad de estos receptores (Loyd y cols., 1985). En resumen, el efecto antidepresivo producido por la desmetilimipramina en las

ratas forzadas a nadar se produce principalmente por sus acciones farmacológicas sobre el sistema noradrenérgico, con la participación de otros neurotransmisores.

6.5. Desmetilimipramina y las fases de ciclo estral: efectos en la prueba de nado

El propósito de este experimento fue explorar los posibles cambios del efecto antidepresivo de la desmetilimipramina por influencia del ciclo estral. Nuestros resultados indicaron el efecto antidepresivo producido por este compuesto fue de igual magnitud en todas las ratas hembras sin importar la fase del ciclo en que se encontraban (sección 5.1). La explicación de la falta de interacción entre ambos factores posiblemente se relaciona con la dosis utilizada, la cual fue efectiva para reducir el tiempo de inmovilidad y aumentar la latencia a la primer inmovilidad aún en las fases del ciclo caracterizadas por bajas concentraciones hormonales ováricas. Este resultado puede representar una ventaja terapéutica, dado que es posible que el efecto antidepresivo de la desmetilimipramina llegue a establecerse sin importar la condición endocrina, sin embargo, se requiere de otros experimentos para establecer la relación precisa entre las hormonas ováricas y los tratamientos antidepresivos en los modelos animales de depresión.

6.6. Efecto ansiolítico de la Desmetilimipramina en dos modelos de ansiedad: la prueba de enterramiento defensivo y el laberinto elevado en cruz.

La desmetilimipramina es un antidepresivo tricíclico que tiene adicionalmente propiedades ansiolíticas hasta ahora sólo evaluadas en ratas macho (Bodnoff y cols., 1988; 1989; Fontana y cols., 1999; Hascoet y cols., 2000; Laino y cols., 1993). Para nuestro experimento, exploramos el efecto ansiolítico de la desmetilimipramina en ratas hembras ovariectomizadas e intactas con el propósito de detectar los posibles cambios en estas acciones por influencia de las hormonas ováricas (sección 5.3). Encontramos que la desmetilimipramina (2.5 mg/kg, por 21 días) redujo la ansiedad en las hembras ovariectomizadas, tanto en el

laberinto elevado en cruz como en la prueba de enterramiento defensivo. Es importante mencionar que el efecto del tratamiento agudo con la desmetilimipramina es ansiogénico (Suranyi-Cadotte, 1990) en contraposición al tratamiento crónico, que es ansiolítico (Bodnoff y cols., 1988; 1989; Laino y cols., 1993). Dado que este compuesto tricíclico bloquea la recaptura de NA, la administración aguda incrementa la disponibilidad del neurotransmisor, promoviendo así el aumento del estado de alerta, así como los síntomas periféricos de la ansiedad (taquicardia, sobresalto, entre otros). Con el tratamiento de largo plazo se produce la estabilización del sistema noradrenérgico, mediante la regulación a la baja de los receptores β 1- y α 2-adrenérgicos (Stahl, 1998a). Es posible que este cambio sea el que subyazca, al menos de manera parcial, al efecto ansiolítico de la desmetilimipramina. Otras posibles vías de acción involucran la interacción del tricíclico con el sistema GABAérgico, el cual está íntimamente relacionado con la ansiedad (*vide infra*).

En el laberinto elevado en cruz, la desmetilimipramina careció de acciones ansiolíticas en las hembras en las diferentes fases del ciclo estral (sección 5.3); sin embargo, en el grupo control (inyectado con el vehículo NaCl 0.9 %) se encontró una diferencia entre las hembras ovariectomizadas y las ratas intactas. Las hembras ovariectomizadas permanecieron un tiempo breve en los brazos abiertos (<5 %) en tanto que las hembras intactas permanecieron aproximadamente el 15 % del tiempo de prueba en el brazo abierto del laberinto. Tal diferencia hace suponer que las hormonas secretadas por los ovarios ofrecen alguna protección ante situaciones apremiantes, que en este modelo están dadas por los brazos del laberinto que carecen de protección (Handley, 1991). Por otro lado, una posible explicación para la carencia de efecto ansiolítico de la desmetilimipramina en las hembras intactas puede relacionarse con la intensidad del estímulo generador de ansiedad, así como con el tipo de respuesta emitida por los animales de acuerdo al paradigma utilizado. De acuerdo con Handley (1991), la presencia de un estímulo muy agresivo, como los choques eléctricos, favorece la detección de los efectos

ansiolíticos de una gama de compuestos más amplia. En la prueba de enterramiento defensivo, los animales son confrontados con un electrodo que es reconocido como un elemento aversivo, desencadenando la expresión de una conducta activa -el enterramiento- que refleja el estado ansioso (Handley, 1991). En el laberinto elevado, los animales son colocados en un ambiente extraño que les provoca curiosidad, sin embargo, la escasa protección de los brazos abiertos les induce a explorar sólo el área cubierta. El estímulo aversivo del espacio es menos agresivo que el de un choque eléctrico. Estas diferencias podrían explicar la ausencia de efecto ansiolítico de los agonistas serotoninérgicos (Handley, 1991) y de la desmetilimipramina en el laberinto elevado en cruz (sección 5.3).

En el modelo de enterramiento defensivo, la desmetilimipramina administrada crónicamente provocó que un porcentaje alto (60 %) de las ratas en proestro no desplegaran la conducta de enterramiento. El 40 % restante tuvo niveles bajos de ansiedad experimental (disminución del tiempo de enterramiento), en paralelo con una disminución de la reactividad (aumento de la latencia de enterramiento). En el estro, los resultados siguieron la misma tendencia aunque con menor magnitud. Dado que en esta fase del ciclo, así como en el proestro, existe una maximización de los efectos de la desmetilimipramina, la participación de las hormonas ováricas en tales acciones parece ser relevante (*vide infra*). La dosis de desmetilimipramina utilizada redujo la actividad ambulatoria de todos los animales independientemente de su estado endócrino. Sin embargo, este tratamiento no afectó la coordinación motora (sección 5.3), por lo que podemos asegurar que la desmetilimipramina produjo acciones ansiolíticas sin efectos inespecíficos sobre el sistema motor.

6.7. Modulación hormonal ovárica del efecto ansiolítico de la desmetilimipramina: papel del estradiol y de la progesterona.

En el último experimento realizado (sección 5.4) observamos que la progesterona facilitó

el efecto ansiolítico de dosis sub-umbrales de la desmetilimipramina, lo cual se puso de manifiesto con una reducción de la conducta de enterramiento defensivo. Varios autores han demostrado que los efectos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivantes de la progesterona están regulados por la estimulación del receptor GABA_A (Bitran y cols., 1993; 1995; Majewska, 1992). Así mismo, Suranyi-Cadotte y cols. (1984) han reportado que la desmetilimipramina administrada crónicamente reduce la unión específica de [³⁵S]-t-butil-biciclofosforotionato al canal de cloro, por lo que proponen que el efecto ansiolítico de la desmetilimipramina está mediado por un aumento en la capacidad del complejo-receptor GABA_A-benzodiazepina para generar corrientes de cloro (Suranyi-Cadotte, 1990). Con estas bases, podemos sugerir que la facilitación del efecto ansiolítico de la desmetilimipramina por la progesterona está posiblemente mediado por el sistema GABAérgico.

Otra explicación involucra la regulación que los esteroides ováricos ejercen sobre la actividad secretora del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Los modelos animales de ansiedad se basan en la aplicación de un estímulo estresante que incrementa la actividad de dicho eje, comenzando por un aumento de la secreción del Factor Liberador de Corticotropina (Takahashi y cols., 1995; Koob, 1999; Korte, 2000). Este péptido genera ansiedad cuando es administrado por vía i.c.v. y sus efectos se abaten con ansiolíticos, antidepresivos como la desmetilimipramina y por las hormonas esteroides (Owens y Nemeroff, 1991; Korte, 2000). De estas últimas, se ha demostrado que la alopregnanolona contrarresta la ansiedad producida por el Factor Liberador de Corticotropina, a través de una regulación a la baja del RNA mensajero que codifica para este péptido y, en consecuencia, de la cantidad del péptido liberada (Patchev y cols., 1994). Por ello, es probable que la progesterona -y su metabolito reducido- haya facilitado las acciones ansiolíticas de la DMI vía la regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Este mecanismo también pudiera subyacer a las acciones antidepresivas de la progesterona (sección 5.2), ya que en el modelo de nado forzado el estrés generado durante

la pre-prueba hace que se parta de un sistema con un eje hipotálamo-hipófisis-adrenal hiperactivo (Kirby y cols., 1995; 1996; 1997) y susceptible de ser modificado por la progesterona.

En contraste con la progesterona, los estrógenos *per se* carecen de actividad ansiolítica (Bitran y cols., 1991; Fernández-Guasti y Picazo, 1992). Sin embargo, el estradiol facilitó el efecto ansiolítico de dosis sub-umbrales de la desmetilimipramina sin alterar la reactividad al estímulo aversivo (sección 5.4). Tal facilitación fue de mayor magnitud que la producida por progesterona. Estos resultados sugieren, que además de la progesterona, el estradiol también participa en el aumento del efecto ansiolítico producido por la desmetilimipramina durante las fases de proestro y estro de la rata. En nuestro estudio, la administración secuencial de estradiol (4 µg) y progesterona (0.5 mg), en un esquema de tratamiento que produce en las hembras el estro conductual, careció de efecto ansiolítico en el modelo de enterramiento defensivo. Como sucedió en el caso del estradiol, tal combinación hormonal también facilitó las acciones ansiolíticas de la desmetilimipramina (1.25 mg/kg, ver sección 5.4). Dado que esta respuesta fue semejante a aquella generada por la combinación de estradiol más el tricíclico (1.25 mg/kg) y mayor que la producida por progesterona y la desmetilimipramina, podemos sugerir que en la combinación hormonal, el estradiol es la hormona determinante.

El mecanismo responsable del efecto ansiolítico de la combinación de estradiol y la desmetilimipramina (sección 5.4) posiblemente involucra a diferentes tipos de receptores neuronales, por ejemplo, los receptores a estrógenos y a algunos neurotransmisores que participan en la regulación de la ansiedad. El mecanismo de acción de los estrógenos inicia con la unión de la hormona a sus receptores los cuales están ubicados en el citoplasma de las células. Una vez unido, el complejo hormona-receptor llega al núcleo y mediante un mecanismo genómico, favorece la síntesis de nuevas proteínas (Bethea y cols., 1999). Para nuestro

experimento, los animales fueron tratados por 21 días con desmetilimipramina (0.625 ó 1.25 mg/kg) y 44 hrs antes del registro (día 19 del tratamiento con el tricíclico) se administró estradiol. De acuerdo con la literatura, este periodo es suficiente para inducir la síntesis de nuevas proteínas, entre las cuales están incluidos los receptores a progesterona (Bethea y cols., 1999), así como receptores GABA_A (Canonaco y cols., 1993), 5-HT₁ (Biegon y cols., 1982; 1986) y 5-HT₂ (Sumner y Fink, 1995). Por lo tanto, es posible que la facilitación del efecto ansiolítico de la desmetilimipramina a la dosis más baja utilizada (0.625 mg/kg) se deba a que los estrógenos indujeron la síntesis de nuevos sitios de unión para la desmetilimipramina, a través de sus acciones genómicas. Para comprobar dicha hipótesis es necesario evaluar la combinación de estos tratamientos, estrógenos más desmetilimipramina, en animales que reciban además un bloqueador de los receptores a estrógenos, como el RU 58688.

En esta línea de evidencias, se ha descrito que el tratamiento con estrógenos incrementa los sitios de unión específicos a muscimol, diacepam y terbutil-biciclo-fosforotionato, sin modificar su afinidad, es decir, el estradiol aumenta el número de receptores GABA_A (Pérez y cols., 1987; O'Connor y McEwen, 1988). Si consideramos que la desmetilimipramina administrada crónicamente incrementa la capacidad del GABA para generar corrientes (Suranyi-Cadotte, 1990), podemos especular que el tricíclico encontró más receptores GABA_A sobre los cuales ejercer sus acciones y en consecuencia, promover un efecto ansiolítico más significativo.

Por otro lado, tanto la desmetilimipramina como el estradiol modulan el funcionamiento de las monoaminas a diferentes niveles. Se ha descrito que los estrógenos inhiben la actividad de la monoaminoxidasa, la enzima que degrada a las monoaminas, lo cual favorece la permanencia de los neurotransmisores en la sinapsis (Chakravorty y Halbreich, 1997; Rubinow y cols., 1998). Así mismo, la inyección sistémica y aguda de estradiol incrementa

temporalmente la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (paso limitante para la síntesis de catecolaminas) en el hipotálamo de la rata (Kizer y cols., 1974). En el cobayo, el tratamiento de largo plazo (28 días) con estradiol incrementa la cantidad de la enzima triptofano hidroxilasa (paso limitante para la síntesis de 5-HT) y este efecto no es mayor con la administración secuencial de estrógenos y progesterona (Lu y cols., 1999). Por lo tanto, los estrógenos modulan tanto la síntesis como la degradación de la monoaminas cerebrales, procesos que, a su vez, son alterados por el tratamiento crónico con desmetilimipramina. Estos cambios bioquímicos podrían ser parcialmente responsables del incremento de la potencia ansiolítica de la desmetilimipramina por acción de los estrógenos (sección 5.4).

La interacción entre los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico también resulta de interés. Se ha descrito que el tratamiento crónico con desmetilimipramina produce una hiposensibilidad de los receptores α_2 -adrenérgicos del hipocampo de la rata. La estimulación de estos receptores inhibe la liberación de 5-HT, por lo que el tratamiento crónico con este antidepresivo tricíclico favorece un aumento de la liberación de la 5-HT en el hipocampo (Yoshioka y cols., 1995). De manera semejante, la administración repetida de clonidina, un antagonista α_2 -adrenérgico, genera hipoactividad motora como consecuencia de la desensibilización de estos receptores adrenérgicos. La administración conjunta de clonidina y estrógenos acorta el tiempo en que se da dicha respuesta, sin modificar la intensidad del efecto producido por la clonidina (Heal y cols., 1988). Por lo tanto, podría pensarse que el tratamiento estrogénico aplicado a las ratas impregnadas con desmetilimipramina modula la expresión de la ansiedad experimental (sección 5.4) a través de interacciones entre los neurotransmisores NA y 5-HT. Esta posibilidad será explorada a futuro.

Los resultados conductuales producto de las interacciones ocurridas entre las hormonas ováricas, los antidepresivos y los efectos producidos por ambos, pueden ser explicados a la luz

de la teoría de Duman (1997). Conocemos que las terapias antidepresivas de tipo farmacológico así como la terapia electroconvulsiva producen un aumento del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro y de la expresión de su receptor (*trkB*) en el hipocampo de la rata (Nibuya y cols., 1995). Estos cambios se relacionan directamente con el efecto antidepresivo, ya que la administración del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro produce un efecto antidepresivo en algunos modelos animales como la prueba de nado forzado y el modelo de desesperanza aprendida (Siuciak y cols., 1997; Shirayama y cols., 2002). A nivel neuronal, este factor de crecimiento aumenta el crecimiento de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas y las protege contra el daño producido por neurotoxinas (Mamounas y cols., 1995). Por lo tanto, es probable que los efectos ansiolítico y antidepresivo producidos por el tratamiento de largo plazo con desmetilimipramina se deban a los cambios neuronales llevados a cabo mediante este mecanismo. De manera similar, los estrógenos incrementan la expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro en tanto que la ovariectomía la disminuye en el hipocampo y en la corteza frontal (Singh y cols., 1995). Notablemente, este efecto intracelular producido por los estrógenos se obtiene con la administración aguda de la hormona, lo cual coincide en cuanto a temporalidad con los resultados de nuestros experimentos. Así, el efecto ansiolítico del tratamiento de largo plazo con desmetilimipramina fue obtenido después de tres semanas de tratamiento y facilitado en mayor grado por el estadiol y en menor grado por la progesterona, posiblemente vía este mecanismo.

Los resultados obtenidos en los experimentos de esta tesis nos permitieron conocer las variaciones conductuales producidas por las hormonas ováricas, en la ansiedad y la depresión experimentales. Las concentraciones altas de estradiol y progesterona típicas de las fases de proestro y estro favorecieron la disminución de la depresión experimental, en tanto que los niveles hormonales bajos no produjeron el mismo efecto. Estos resultados en conjunto con los de la literatura permiten sugerir que las hormonas ováricas protegen al organismo de las

consecuencias de algunos eventos estresantes o dañinos. Por otra parte, las acciones de la desmetilimipramina sobre la depresión y la ansiedad experimentales en ratas hembras intactas, variaron de acuerdo con el modelo animal utilizado. Los efectos farmacológicos oscilaron desde la ausencia (laberinto de brazos elevados) pasando por un efecto positivo sin interacción hormonal (prueba de nado) hasta un efecto positivo con interacción hormonal (enterramiento defensivo). Estos resultados evidencian que el estradiol y la progesterona, presentes de manera natural en las ratas hembra o administrados de forma exógena, modifican los efectos de este compuesto. Tal hecho resulta de interés si se considera que una gran proporción de los individuos que consumen estos medicamentos son mujeres, quienes tradicionalmente reciben dosis de antidepresivos determinadas en los hombres para la terapia de los trastornos afectivos. Estos resultados invitan a realizar ajustes en la dosificación de aquellos fármacos prescritos para el tratamiento de los desórdenes afectivos en pacientes del sexo femenino.

6.8. Conclusiones

1. Las hormonas ováricas participan en la desesperanza conductual en la rata determinada mediante el uso de un modelo útil para ensayar antidepresivos y que se basa en la producción de desesperanza. Así, el aumento en la concentración plasmática de estrógenos y progesterona, como ocurre en el proestro, propicia niveles bajos de desesperanza.
2. La desmetilimipramina produce un efecto anti-inmovilidad en las ratas hembras, que es independiente de los cambios en la concentración de las hormonas ováricas.
3. La progesterona participa en la reducción de la desesperanza que se manifiesta espontáneamente en las fases del proestro y estro.

4. El tratamiento crónico con la desmetilimipramina produce un efecto ansiolítico que no depende de la condición endocrina.

5. Las hormona ováricas modulan la magnitud del efecto ansiolítico de la desmetilimipramina en el modelo de enterramiento defensivo. De tal forma que, la elevación espontánea de la concentración de estradiol y progesterona (estro conductual) incrementa dicho efecto.

6. El estradiol, la progesterona o la combinación de ambas hormonas en un esquema de administración que simula el estro conductual, facilitan el efecto ansiolítico de la desmetilimipramina, de tal forma que una dosis sub-umbral se convierte en una dosis efectiva.

7. El estradiol es la hormona crucial para facilitar el efecto ansiolítico de la desmetilimipramina.

APENDICE I

Fármacos antidepresivos

Los fármacos antidepresivos están clasificados en 7 categorías dependiendo del mecanismo de acción a través del cual producen su efecto farmacológico. Existen dos tipos de antidepresivos clásicos: los tricíclicos y los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO's). Las cinco clases de nuevos antidepresivos incluyen a los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT, los inhibidores (mixtos) de la recaptura de NA/5-HT, los inhibidores de la recaptura de 5-HT/NA/DA, los antagonistas 5-HT₂/inhibidores de la recaptura de 5-HT y los antagonistas α 2-adrenérgicos/antagonistas 5-HT₃ y 5-HT₂ (Stahl, 1998a). A continuación se describen las generalidades de cada tipo de antidepresivos.

Antidepresivos tricíclicos

Estos compuestos reciben su nombre por las características de su estructura química, formada por tres anillos. Químicamente se clasifican en iminodibenzilos (imipramina, desipramina y clorimipramina) y en los dibenzocicloheptadienos, como la amitriptilina, la nortriptilina y la protriptilina (Baldessarini, 1996). Estos compuestos son clínicamente efectivos y la mayor parte de ellos han sido ensayados en modelos animales de depresión, lo que ha permitido discernir su mecanismo de acción. Por ejemplo, la imipramina es un inhibidor de la recaptura de 5-HT y en menor grado de NA y DA, la desipramina es un potente inhibidor de la recaptura de NA pero con algunos efectos sobre DA, 5-HT (Blier y de Montigny, 1997; Zangen y cols., 1997) y GABA (Squares y Saederup, 1988). Este tipo de antidepresivos provocan efectos colaterales severos, tales como aumento del peso corporal, constipación, visión borrosa, hipotensión y sequedad de la boca. Estos efectos son producto de sus acciones como anti-colinérgicos y bloqueadores de los receptores histaminérgicos H₁. Además, la inhibición de los canales de sodio por sobredosis de antidepresivos tricíclicos causa arritmias y efectos cardíacos que pueden ser letales (Stahl, 1998a).

Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)

Estas drogas forman un grupo químicamente heterogéneo que comparte la propiedad de unirse a la enzima monoamino-oxidasa (MAO) impidiendo la degradación de las monoaminas 5-HT, DA y NA. La MAO se localiza en la membrana de las mitocondrias de las terminales sinápticas y del hígado. Algunos IMAOs, como la tranilcipromina, la fenelzina y la isocarboxazida, se unen de manera irreversible a la MAO, en tanto que otros, como la moclobemida y el deprenil, se unen de forma reversible (Baldessarini, 1996). Durante muchos años, los IMAOs junto con la imipramina, fueron los únicos medicamentos disponibles con acciones antidepresivas; sin embargo, los efectos tóxicos de los primeros, asociados a la ingesta de alimentos ricos en tiramina, provocaron muchas muertes por crisis hipertensivas.

Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS).

Los ISRS son en la actualidad los fármacos de mayor prescripción para el tratamiento de los desórdenes depresivos (Stahl, 2000). Los ISRS que están en el mercado son la fluoxetina, la paroxetina, la sertralina, la fluvoxamina y el citalopram, los cuales tienen la enorme ventaja de contar con un amplio margen de seguridad y de producir pocos efectos colaterales, como disminución del apetito, pérdida de peso, disminución de la libido, disfunción sexual, disturbios del sueño y ansiedad, que se atribuyen a la estimulación de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃. (Stahl, 2000) El mecanismo de acción de los ISRS es a través de inhibir selectivamente al transportador de 5-HT. Esta acción causa un repentino incremento en la cantidad de 5-HT disponible en el espacio intersináptico a nivel de los núcleos del rafe, provocando una desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos. El tratamiento a largo plazo facilita la transmisión serotoninérgica que llega a diferentes estructuras cerebrales, entre ellas a las relacionadas con la depresión (Blair y de Montigny, 1997; 1998).

Inhibidores de la recaptura de NA/DA ó 5-HT/NA/DA

El bupropión es un fármaco antidepresivo que inhibe la recaptura de las catecolaminas pero no afecta la transmisión serotoninérgica (Vetulani y Nalepa, 2000). Por sus acciones sobre el sistema dopaminérgico, este antidepresivo restablece las funciones reguladas por este neurotransmisor, por ejemplo, la función sexual, el patrón de sueño, la lentitud cognitiva y la locomoción. Dado que la dopamina está involucrada en la motivación, el bupropión es útil para revertir la anhedonia, un síntoma medular en los desórdenes depresivos; así mismo, puede ser usado como un medicamento de apoyo para aquellos individuos fumadores, que se encuentran en el periodo de abstinencia a la nicotina. La inhibición de la recaptura de NA puede ocasionar náuseas e insomnio (Stahl, 1998a). Por otro lado, el antidepresivo que inhibe la recaptura de 5-HT/NA/DA es la venlafaxina, que a dosis bajas promueve el bloqueo de la recaptura de 5-HT, en tanto que el incremento gradual de la dosis bloquea la recaptura de NA y posteriormente de DA (Beique y cols., 1999). El mecanismo de acción así como los efectos colaterales son los mismos que para los ISRS o para el bupropión.

Antidepresivos atípicos

Antagonismo del 5-HT₂ e inhibición de la recaptura de 5-HT

Son ejemplos clásicos la trazodona y la nefazodona. Además de la desinhibición de la transmisión serotoninérgica, estos fármacos bloquean a los receptores post-sinápticos 5-HT₂. Esta diferencia es importante al compararla con los ISRS, los cuales estimulan a los receptores 5-HT₂, una acción responsable de los efectos colaterales de los ISRS (Vetulani y Nalepa, 2000; Stahl, 2000).

Antagonismo α_2 /antagonista 5-HT₂ y 5-HT₃

La mirtazapina es un compuesto cuya acción principal es bloquear el receptor α_2 -adrenérgico, lo que a su vez facilita la transmisión de 5-HT y NA. Este fármaco no produce

efectos adversos sobre el sistema gastrointestinal, ni alteraciones del sueño o de las funciones sexuales, lo cual está mediado por sus acciones antagónicas en los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃. Un efecto colateral es el aumento de peso, lo cual se propicia por las propiedades antihistamínicas de la mirtazapina (Stahl, 1998a; 2000).

APENDICE II

Fármacos ansiolíticos

La ansiedad es susceptible de disminuir después de la administración de los fármacos ansiolíticos. Estos compuestos se dividen en tres tipos: los ansiolíticos clásicos como las benzodiazepinas, los antidepresivos tricíclicos o ISRS administrados a largo plazo y los agonistas parciales del receptor 5-HT_{1A}. A continuación se describen brevemente las propiedades de cada tipo de fármacos.

Benzodiazepinas (BDZ)

La síntesis y posterior aplicación de las benzodiazepinas como tratamiento ansiolítico ha permitido determinar algunos de los componentes centrales involucrados en los trastornos de ansiedad. Desde tempranas investigaciones se demostró que es necesaria la presencia de GABA para las acciones de las benzodiazepinas, posteriormente se descubrió que las benzodiazepinas se unen a un sitio de reconocimiento para benzodiazepinas ubicado en el receptor GABA_A. La interacción con este receptor media sus efectos ansiolíticos, sedantes y como relajante muscular (Haefely, 1994).

Antidepresivos

Diversas investigaciones clínicas han revelado que la administración crónica de antidepresivos tricíclicos así como de ISRS promueve una reducción de la ansiedad (Nutt y Glue, 1991; Tyrer y Tyrer, 1994). Al inicio del tratamiento con antidepresivos se produce un estado ansiogénico que posteriormente se abate con la administración prolongada del medicamento (Stahl, 1998a). Los reportes clínicos señalan que los antidepresivos disminuyen la ansiedad en pacientes con desorden de pánico (McDougle y cols., 1993; Lydiard y cols., 1993), de ansiedad generalizada, obsesivo-compulsivo y aún en sujetos con trastornos alimenticios. Su eficacia es superior a la del placebo y de las benzodiazepinas (Nutt y Glue, 1991).

Agonistas del receptor 5-HT_{1A}

El primer agonista 5-HT_{1A} lanzado al mercado fue la buspirona (BUSPAR), inicialmente como tratamiento para la ansiedad. Todas las azapironas, como la buspirona, la ipsapirona y la gepirona producen un metabolito común, 1(2-pirimidinil)piperazina (1-IPP), el cual es un antagonista α 2-adrenérgico. Además, algunas azapironas también son antagonistas dopaminérgicos, por lo que es difícil atribuir sus propiedades ansiolíticas sólo a su influencia sobre el sistema serotoninérgico (Deakin, 1994).

APENDICE III

Modelos animales de ansiedad

Los modelos animales de ansiedad se clasifican de acuerdo con el procedimiento usado para inducir el estado ansioso. La clasificación más común engloba a los modelos basados en procedimientos de conflicto o de castigo, mientras que otra incluye a los modelos que aprovechan reacciones innatas. A continuación se describen algunos de los procedimientos más utilizados en la investigación de los compuestos ansiolíticos y de los sustratos anatomofuncionales de la ansiedad.

Procedimientos de castigo o pruebas de conflicto

Estos inician con la presentación de un estímulo aversivo que es contingente con alguna conducta del animal, por ejemplo, la ingesta de agua o de alimento, en contingencia con choques eléctricos. La frecuencia de tal conducta es reducida o incluso abolida por efecto del castigo. Se denomina prueba de conflicto porque los animales se encuentran entre dos motivaciones opuestas: una motivación positiva, que generalmente es hambre, sed o deseo de explorar y una motivación negativa, que en este caso es el miedo a recibir el castigo. En sujetos sin tratamiento, el miedo provoca que la conducta (ingesta de agua, alimento o exploración) se suprima, en tanto que con un tratamiento ansiolítico, la frecuencia de la conducta se incrementa. Este efecto farmacológico ocurre a pesar de que el castigo aumente en intensidad o en frecuencia (Commissaris y Fontana, 1991; Sanger, 1991).

Modelos de ansiedad no condicionados

Estas pruebas se basan en las respuestas de los animales emitidas ante estímulos potencialmente peligrosos, que en la naturaleza son los depredadores, algunos objetos que puedan hacerles daño o los conespecíficos. En los modelos animales, los estímulos utilizados son, por ejemplo, los choques eléctricos de baja intensidad, la luz brillante, los espacios

abiertos, la presencia de un conoespecífico desconocido o la separación de los crías de su madre, entre otros. En estos modelos, los ansiolíticos revierten las conductas que se consideran un reflejo del estado de miedo de los animales (Treit, 1994). Algunos modelos incluidos en esta categoría son:

Conducta exploratoria

Estas pruebas se realizan en dispositivos como los laberintos en forma de Y, las cajas de dos compartimentos y las arenas que permiten la locomoción libre (campo abierto). En estos, se observan y cuantifican las conductas que reflejan exploración o ambulación. La ventajas de estas pruebas es que son rápidas, fáciles de realizar, el equipo es económico y no requieren del entrenamiento de los animales. La base biológica para estas pruebas es que los roedores tienen una fuerte inclinación a explorar los objetos y los lugares novedosos, sin embargo, esta misma novedad les induce miedo, lo cual suprime la exploración o produce evitación activa de la situación novedosa. Los ansiolíticos incrementan la exploración en estos ambientes poco conocidos (Treit, 1994)

Interacción social

Estos modelos consideran que las conductas expresadas por los roedores en un contexto social son alteradas por el ambiente. Un ambiente novedoso, por ejemplo, las arenas de campo abierto las cuales son distintas a su caja de alojamiento, es un factor que inhibe la interacción social. Los animales dejan de reconocerse por el olfato, dejan de jugar y se abole todo contacto físico, en tanto que que los ansiolíticos facilitan la interacción social (Koob y cols., 1998).

Vocalizaciones ultrasónicas.

Las crías de las ratas emiten vocalizaciones ultrasónicas (35-45 KHz) cuando son separadas temporalmente de su madre. Esta separación acarrea consecuencias severas para las crías, como la desnutrición y la disregulación de la temperatura corporal. Por esto, tales "llamadas" constituyen el único recurso de cría para solicitar ayuda de la madre. Los

ansiolíticos disminuyen el número de las vocalizaciones en tanto que los ansiogénicos las incrementan. Este modelo permite la detección de los substratos neurales que participan en la ansiedad, sin embargo, una desventaja es que depende de la ontogenia de los sistemas de neurotransmisión que se deseen abordar (Insen y Winslow, 1991).

APENDICE IV

Modelos animales de depresión

Los modelos animales de depresión se clasifican de acuerdo al procedimiento que genera el estado "depresivo" o de desesperanza. Existen modelos de estrés agudo, de estrés crónico, de estrés social, o aquellos que involucran procedimientos químicos o quirúrgicos (Willner y Muscat, 1991).

Modelos de estrés agudo

En los humanos, el estrés incontrolable produce consecuencias debilitantes, incluyendo la aparición de un estado depresivo. Tomando esta idea como punto de partida, Seligman (1975a; 1975b) diseñó un procedimiento para reproducir estas condiciones en los animales, que consiste en la aplicación aguda de choques eléctricos inevitables. Tal evento deteriora el aprendizaje de estrategias útiles para escapar de una situación aversiva. Por estas condiciones, el modelo recibe el nombre de *desesperanza aprendida* (Seligman y cols., 1975a; 1975b). Además del deterioro del aprendizaje, el estado de desesperanza produce un decremento de la tasa de auto-estimulación intracraneal en las áreas relacionadas con la recompensa. Estos efectos pueden ser revertidos por diferentes antidepresivos como los tricíclicos y los inhibidores de la recaptura de 5-HT (Willner, 1994).

Otros modelos, como la *prueba de nado forzado* (Porsolt y col., 1979) y la *prueba de suspensión del rabo* (Stèru y cols., 1985) son sensibles a los antidepresivos y producen pocos falsos positivos (Porsolt y Lenègre, 1992). La prueba de suspensión del rabo consiste en sostener a los ratones por la cola; los animales forcejean durante algunos segundos hasta que permanecen quietos. Esta quietud o inmovilidad es considerada como un indicador de abatimiento (depresión experimental), que puede ser revertido por los antidepresivos. Conceptualmente la conducta de inmovilidad es semejante a la desesperanza aprendida en que

los animales son expuestos a situaciones de las que no pueden escapar (Porsolt y Lenègre, 1992). Los antidepresivos reducen la inmovilidad e incrementan las conductas que reflejan esfuerzo (Stèru y cols., 1985).

Modelos de estrés crónico (estrés ligero)

El más conocido involucra la aplicación crónica, durante tres a nueve semanas, de diferentes estresores, por ejemplo, privación de agua o alimento, cambios en el fotoperiodo, inmovilización en pequeñas cámaras, descenso de la temperatura ambiental, cambio de los compañeros de caja, entre otros. Estas condiciones inducen alteraciones en la locomoción, incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona, decremento en el consumo de solución azucarada (interpretado como anhedonia) y disminución de la tasa de autoestimulación intracraneal. Los tratamientos antidepresivos revierten estas deficiencias conductuales provocadas por el estrés crónico (Willner y Muscat, 1991; Willner, 1994; 1997).

Modelos de estrés social

En los primates, la separación de los infantes de la madre induce en los primeros una serie de conductas de protesta y desesperanza: agitación, disminución del sueño, vocalizaciones, decremento del juego, del apetito y de la interacción social. Tales alteraciones conductuales se correlacionan con la disminución de los niveles de NA en el líquido cefalorraquídeo. Los antidepresivos revierten la intensidad y la frecuencia de las conductas que reflejan depresión (Willner, 1994). Por otro lado, en los roedores, el sometimiento de individuos de baja jerarquía por otros de elevada jerarquía, genera en los primeros un aumento de la conducta pasiva. Si estos animales se evalúan en otras pruebas exhiben un aumento de la inmovilidad en la prueba de nado forzado y un decremento de la exploración y de la actividad ambulatoria. Estas condiciones son revertidas por los antidepresivos (Weiss y Kilts, 1998).

Modelos químicos

La administración de clorimipramina (15 mg/kg), un antidepresivo tricíclico que bloquea la recaptura de 5-HT, a ratas recién nacidas (8-21 días) induce en la madurez las siguientes características: disminución de la actividad sexual, de la tasa de autoestimulación intra-craneal, de la conducta agresiva, alteraciones del patrón de sueño e hiperactividad. Este deterioro generalizado refleja un estado "depresivo" semejante al presentado por los humanos. Nuevamente, los antidepresivos efectivos revierten tales cambios deletéreos (Neill y cols., 1990; Vogel y cols., 1990a; 1990b). Por otro lado, la administración de reserpina o de tetrabenzina, dos compuestos que impiden el almacenamiento de las monoaminas en las vesículas sinápticas, produce un estado "depresivo" que se caracteriza por alteraciones como la disminución de la actividad locomotora, el aumento de la temperatura y de la frecuencia cardíaca. Los antidepresivos revierten tanto los cambios bioquímicos como los conductuales o autonómicos. Otro modelo químico es el de la abstinencia a las anfetaminas. Estos compuestos se administran en dosis crecientes, durante un periodo de 4 a 10 días; después de este tiempo, el tratamiento es suspendido. La abstinencia a las anfetaminas genera una reducción en la tasa de autoestimulación intracraneal, una respuesta fisiológica que es restablecida con la administración crónica y subcrónica de antidepresivos (Weiss y Kitts, 1998).

Modelos quirúrgicos

En la rata, el bulbo olfatorio envía proyecciones directas a diferentes estructuras cerebrales relacionadas con las emociones, como el hipocampo, el hipotálamo y los núcleos septales. La extirpación de esta estructura (AP: 6 m, L: 2 mm) produce un deterioro de diversos sistemas neuroendócrinos relacionados con la depresión, como una elevación de la concentración plasmática de corticosterona, disminución de la concentración cerebral de NA y DA, pérdida de peso corporal, cambios en los patrones de alimentación y de sueño, deterioro de la conducta sexual e hiper-reactividad (Richardson, 1991). La administración crónica (pero no

aguda) de antidepresivos restablece la normalidad en los animales bulbectomizados (Mudunkotuwa y Horton, 1996).

APENDICE V

Ciclo estral de la rata

El ciclo reproductivo o estral de la rata consta de un conjunto de eventos endocrinos, citológicos y conductuales que tienen como punto culminante a la ovulación (Feder, 1981). El término "estral" deriva del latín *oestrous* que significa vigor, furor o frenesí (Freeman, 1988). Este ciclo tiene una duración de 4 o 5 días, a lo largo de los cuales los niveles hormonales fluctúan originando periodos o fases. Externamente, cada fase de ciclo puede ser indentificada por las características de las células epiteliales de la vagina y con base en éstas se clasifican de la siguiente manera:

Proestro, se caracteriza por la presencia de células redondas, nucleadas y algunas células cornificadas.

Estro, tiene predominancia de células cornificadas y baja cantidad de células nucleadas.

Metaestro o Diestro I, se caracteriza por tener leucocitos y algunas células cornificadas.

Diestro o Diestro II, con predominancia de leucocitos y algunas células nucleadas. Cuando existe duplicación de diestro el ciclo se extiende hasta 5 días (Freeman, 1988).

El ovario íntegro es capaz de sintetizar suficiente cantidad de hormonas para inducir el ciclo reproductivo, en tanto que la extirpación de los ovarios u ovariectomía impide la ciclicidad, y en consecuencia, todas aquellas conductas dependientes de hormonas (Feder, 1981). La receptividad sexual así como el apareamiento ocurren alrededor de la ovulación. A diferencia de las hembras de otras especies, en las cuales la ovulación es una respuesta refleja a estímulos nerviosos, la ovulación en la rata es dependiente de las fluctuaciones de las hormonas hipofisarias y ováricas. La concentración de estradiol es baja durante el estro, aumenta gradualmente hasta el metaestro y el diestro y alcanza los valores máximos en EL proestro. Los andrógenos, como la testosterona y la androstenediona, tienen un patrón de secreción similar al

estradiol. Por otro lado, la concentración de progesterona está elevada al inicio del estro y empieza a descender para dar paso a la siguiente fase. Posteriormente, existen dos picos importantes de esta hormona: uno en el metaestro que continúa hasta el comienzo del diestro y un pico máximo en el proestro. Este último evento, en conjunto con la secreción súbita de la hormona luteinizante, da origen a la ovulación. Cabe destacar que el estro conductual o "celo" no coincide con la etapa del estro fisiológico. El estro conductual inicia en las primeras horas del proestro, es decir, cuando las hormonas ováricas alcanzan su máxima concentración, y declina en la fase del estro (Feder, 1981).

REFERENCIAS

- Amsterdam J, García-España F, Fawcett J, Quitkin F, Reimherr F, Rosebaum J, Beasley C (1999). Fluoxetine efficacy in menopausal women with and without estrogen replacement. *J Affect Dis* 55: 11-17.
- Anisman H, Zalcman S, Shanks N, Zacharko RM (1991). Multisystem regulation of performance deficits induced by stressors: an animal model of depression. In: *Neuromethods. Animal models in psychiatry*, II. Boulton AA, Baker GB, Martin-Iverson MT (Eds.). Clifton, New Jersey, Humana Press, pp. 1-44.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999): The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160: 1-12.
- Argenti D, D'Mello AP (1994). The pharmacodynamics of desipramine and didesmethyl-desipramine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 512-519
- Baldessarini RJ (1996). Fármacos y tratamiento de los trastornos psiquiátricos: depresión y manía. En: Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (Eds.), McGraw Hill Interamericana, Novena Edición, Vol. 1, México, pp. 459-490.
- Baker EL, Blakely RD (1994). Norepinephrine and serotonin transporters: molecular targets of antidepressant drugs. In: *Psychopharmacology. The fourth generation of progress*. Bloom FE, Kupfer DJ (Eds.). Raven Press, New York, pp 321-334.
- Baker ER, Best RG, Manfredi RL, Demers LM, Wolf GC (1995). Efficacy of progesterone vaginal suppositories in alleviation of symptoms in patients with premenstrual syndrome. *J Assist Reprod Genet* 12: 205-209.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Mostalino MC, Concas A, Purdy RH, Biggio G (1996). Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABA receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology* 63: 166-172.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RM, Mostalino MC, Concas A (1997). Brain and plasma allopregnanolone concentrations. *Brit J Pharmacol* 120: 1582-1588.
- Baulieu EE, Schumacher M, Koenig H, Jung-testas I, Akwa Y (1996). Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 16: 143-154.
- Beique JC, de Montigny C, Blier P, Debonnel G (1999). Venlafaxine: discrepancy between *in vivo* 5-HT and NE reuptake blockade and affinity for reuptake sites. *Synapse* 32: 198-211.
- Bergstrom DA, Kellar KJ (1979). Adrenergic and serotonergic receptor binding in rat brain after chronic desmethylimipramine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 209: 256-261.
- Bernardi M, Vergoni AV, Sandrini M, Tagliani S, Bertolini A (1989). Influence of ovariectomy, estradiol and progesterone on the behavior of mice in an experimental model of depression. *Physiol Behav* 45: 1067-1068.
- Besson A, Privat AM, Eschalié A, Fialip J (1999). Dopaminergic and opioidergic mediations of tricyclic antidepressants in the learned helplessness paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 64: 541-548.
- Best NR, Rees MP, Barlow HD, Cowen PJ (1992). Effect of estradiol implant on noradrenergic function and mood in menopausal subjects. *Psychoneuroendocrinology* 17: 87-93.
- Bethea CL, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Gundlach C, Lu ZL (1999). Ovarian steroids and serotonin neural function. *Mol Neurobiol* 18: 87-123.
- Bicikova M, Putz Z, Hill M, Hampl R, Diebbelt L, Tallova J, Starka L (1998). Serum levels of neurosteroid allopregnanolone in patients with Premenstrual Syndrome after Thyroidectomy. *Endoc Regul* 32(2): 87-92.
- Biegón A, Fischette CT, Rainbow TC, McEwen BS (1982). Serotonin receptor modulation by estrogen in discrete brain nuclei. *Neuroendocrinology* 35: 287-291.
- Biegón A (1986). Effect of chronic desipramine treatment on dihydroalprenolol, imipramine and desipramine binding sites: a quantitative autoradiographic study in the rat brain. *J Neurochem* 47: 77-80.

- Birkenhager TK, Moleman P, Nolen WA (1995). Benzodiazepines for depression? A review of the literature. *Int Clin Pharmacol* 10: 181-195.
- Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK (1991a). Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolite of progesterone that are active at the GABAA receptor. *Brain Res* 561: 157-161.
- Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK (1991b). Ovarian endocrine status regulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of gamma-aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav Neurosci* 105: 653-662.
- Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK (1993). Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABA receptor function. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 423-428.
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnenolone at brain GABA_A receptors. *J Neuroendocrinol* 7: 171-177.
- Bitran D, Dowd JA (1996). Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 125: 573-583.
- Blier P, de Montigny C (1997). Le système à sérotonine et la réponse antidépressive. *Synthèse*. 13:519-526.
- Blier P, de Montigny C (1998). Possible serotonergic mechanism underlying to the antidepressant and anti-obsessive-compulsive disorder responses. *Biol Psychiat* 44: 313-323.
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ (1988). The effect of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 95: 298-302.
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ (1989). A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical antidepressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 97: 277-279.
- Borsini F, Meli A (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity. *Psychopharmacology* 94: 174-160.
- Borsini F, Volterra G, Meli A (1986). Does the behavioral "despair" test measure "despair"? *Physiol Behav* 38: 385-386.
- Borsini RF, Lecci A, Sessarego A, Fressine R, Meli A (1989). Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. *Psychopharmacology* 97: 183-192.
- Brann DW, Hendry LH, Mahesh VB (1995). Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Molec Biol* 52: 113-133.
- Breslau N, Schultz L, Peterson E (1995). Sex differences in depression: a role preexisting of anxiety. *Psychiat Res* 58: 1-12.
- Cannizzaro G, Flugy A, Cannizzaro C, Cagliano M, Sabatino M (1993). Effects of desipramine and alprazolam in the forced swimming test in rats after long-lasting termination of chronic exposure to picrotoxin and pentylentetrazol. *Eur Neuropsychopharmacol* 3: 477-484.
- Cannizzaro C, Cannizzaro E, Cagliano M, Mineo A, Sabatino M, Cannizzaro G (1993). Effects of desipramine and alprazolam on forced swimming behavior of adult rats exposed to prenatal diazepam. *Eur J Pharmacol* 273(3): 239-245.
- Canonaco M, Carelli A, Maggi A (1993a). Steroid hormones and receptors of the GABA_A supramolecular complex. I. Benzodiazepine receptor level changes in some extrahypothalamic brain areas of the female rat following sex steroid treatment. *Neuroendocrinology* 57: 965-973.
- Canonaco M, Tavolaro R, Maggi A (1993b). Steroid hormones and receptors of the GABA_A supramolecular complex. I. Progesterone and estrogen inhibitory effects on the chloride ion channel receptor in different forebrain areas of the female rat. *Neuroendocrinology* 57: 974-984.

- Caraveo-Anduanga J, Colmenares E, Saldivar G (1999). Estudio clínico-epidemiológico de los trastornos depresivos. *Salud mental* 22: 7-17.
- Cervo L, Samanin R (1987). Evidence that dopamine mechanisms in the nucleus accumbens are selectively involved in the effect of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology* 26: 1469-1472.
- Chakravorty SG, Halbreich U (1997). The influence of estrogen on monoamine oxidase activity. *Psychopharmacol Bull* 33: 229-233.
- Chaput Y, de Montigny C, Blier P (1991). Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatment: an in vitro electrophysiologic study in the rat. *Neuropsychopharmacology* 5: 219-229.
- Charney DS, Krystal JH, Southwick SM, Delgado P (1994). The role of noradrenergic function in human anxiety and depression. In: *Handbook of depression and anxiety. A biological approach*. Den Boer JA, Ad Sitsen JM (Eds). Marcel Dekker, Inc, New York, pp 473-496.
- Charney DS (1998). Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiat* 59(Suppl 14): 11-14.
- Commissaris RL, Fontana DJ (1991). Pharmacological evaluation of potential animal models for the study of antipanic and panicogenic treatment effects. In: Boulton AA, GB Baker, MT Martin-iverson. *Neuromethods. Animal Models in Psychiatry II*, Vol 19. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 199-220.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G (1998). Role of brain allopregnanolone in the plasticity of γ -aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13284-13289.
- Conti AC, Cryan JF, Dalví A, Lucki I, Blendy JA (2002). cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci* 22(8): 3262-3268.
- Contreras CM, Alcalá-Herrera V, Marván ML (1989). Action of antidepressants on the septal nuclei of the rat. *Physiol Behav* 46(5): 793-798.
- Contreras CM, Marván ML, Alcalá-Herrera V, Guzmán-Sáenz MA (1990). Chronic clomipramine increases firing rate in the lateral septal nuclei of the rat. *Physiol Behav* 48: 551-554.
- Contreras CM, Marván ML, Muñoz-Méndez A, Ramírez-Morales A (1992). Cortical and septal responses to dorsal raphe nucleus stimulation in the rat: long-term clomipramine actions. *Bol Estud Med Biol* 40: 3-7.
- Contreras CM, Lara-Morales H, Molina-Hernández M, Saavedra M, Arrellín-Rosas G (1995). An early lesion of the lateral septal nuclei produces changes in the forced swim test depending on gender. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 19: 1277-1284.
- Curtis AL, Valentino RJ (1994). Corticotropin-releasing factor transmission in locus coeruleus: a possible site of antidepressant action. *Brain Res Bull* 35: 581-587.
- Deakin JFW (1994). The clinical anxiolytic and antidepressant efficacy of drugs with action on serotonin systems. In: *Handbook of depression and anxiety. A biological approach*. Den Boer JA, JM Ad Sitsen (Eds). Marcel Dekker, Inc, New York, pp 447-472.
- De Pablo JM, Parra A, Segovia S, Guillamon A (1989). Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiol Behav* 46: 229-237.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995a). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121: 66-72.
- Detke MJ, Wieland S, Lucki I (1995b). Blockade of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced to swim test by 5-HT_{1A} receptor antagonists. *Psychopharmacology* 119: 47-54.

- Detke MJ, 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.
- De Wit H, Rukstalis M (1997). Acute effects of triazolam in women: relationship with progesterone, estradiol and allopregnanolone. *Psychopharmacology* 130: 69-78.
- Díaz-Véliz G, Urresta F, Dussaubat N, Mora S (1994). Progesterone effects on the acquisition of conditioned avoidance responses and other motoric behaviors in intact and ovariectomized rats. *Psychoneuroendocrinology* 19: 387-394.
- Díaz-Véliz G, Dussaubat N, Mora S (1997). Ketanserin effects on rat behavioral responses: modifications by the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 687-692.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997). A Molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiat* 54: 597-606.
- Endicott J, Hallbreich U (1988). Clinical significance of premenstrual dysphoric changes. *J Clin Psychiat* 49: 486- 489.
- Epperson CN, Wisner KL, Yamamoto B (1999). Gonadal steroids in the treatment of mood disorders. *Psychosom Med* 61: 676-697.
- Espejo EF, Minano FJ (1998). Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. *Neuroscience* 88(2): 609-615.
- Estrada-Camarena E, Contreras CM, Saavedra M, Luna-Baltazar I, López-Rubalcava C (2002). Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST). *Behav Brain Res* 134(1-2): 175-183.
- Feder HH (1981). Estrous cyclicity in mammals. In: *Neuroendocrinology of reproduction, physiology and behavior*. Adler NT (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 279-348.
- Fernández-Guasti A, Picazo O (1990). The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. *Pharmacol Biochem Behav* 37: 77-81.
- Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C (1998). Modification of the anxiolytic action of 5-HT_{1A} compounds by GABA-benzodiazepine agents in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 27-32.
- Fernández-Guasti A, Picazo O (1992). Changes in burying behavior during the estrous cycle: Effects of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* 17: 681-689.
- Fernández-Guasti A, Picazo O (1995). Flumazenil blocks the anxiolytic action of allopregnanolone. *Eur J Pharmacol* 281: 113-115.
- Fink G, Sumner BEH, Rosie R, Grace O, Quinn JP (1996). Estrogen control of central neurotransmission: effect of mood, mental state and memory. *Cell Mol Neurobiol* 16: 325-344.
- Flugy A, Gagliano M, Cannizzaro C, Novara V, Cannizzaro G (1992). Antidepressant and anxiolytic effects of alprazolam versus the conventional antidepressant desipramine and the anxiolytic diazepam in the forced swim test in rats. *Eur J Pharmacol* 214: 233-238.
- Fontana DJ, McMiller LV Jr, Commisaris RL (1999). Depletion of brain norepinephrine: differential influence on anxiolytic treatment effects. *Psychopharmacology (Berl)* 143: 197-208.
- Freeman ME (1998). The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neill J (Eds). *The physiology of reproduction*. NY, Raven Press, pp 1893-1928.
- Freeman EW, Purdy RH, Coutifari C, Rickels K, Paul SM (1993). Anxiolytic metabolites of progesterone: correlation with mood and performance measures following oral progesterone administration to healthy female volunteers. *Neuroendocrinology* 58: 478-484.
- Frye CA, Duncan JE (1994). Progesterone metabolites, effective at the GABA_A receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Res* 643: 194-203.

- Frye CA, Walf AA (2002). Changes in progesterone metabolite in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav* 41(3): 306-315.
- Galeeva A, Tuohimaa P (2001). Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian status. *Behav Brain Res* 119: 41-47.
- Gallo MA, Smith SS (1993). Progesterone withdrawal decreases latency and increases duration of electrified produral: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 897-904.
- Gee K, Boelger MB, Brinton R, Corini H, McEwen BS (1988). Steroid modulation of the chloride ionophore in the rat: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 246: 803-912.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sciences* 66: 1743-1752.
- Gustafsson JA (1999). Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163: 379-383.
- Haefely W (1994). Benzodiazepines, benzodiazepine receptors, and endogenous ligands. In: *Handbook of depression and anxiety. A biological approach*. Den Boer JA, JM Ad Sitsen (Eds). Marcel Dekker, Inc, New York, pp 573-608.
- Halbreich U, Endicott J, Goldstein S, Nee J (1986). Premenstrual changes and changes in gonadal hormones. *Acta Psychiatr Scand* 74: 576-586.
- Halbreich U, Lemus CZ, Lieberman JA, Parry B, Schiavi RC (1990). Gonadal hormones, sex and behavior. *Psychopharmacol Bull* 26: 297-301.
- Halbreich U, Rojansky N, Palter S, Tworek H, Hissin P, Wang K (1995). Estrogen augments serotonergic activity in postmenopausal women. *Biol Psychiat* 37: 434-441.
- Hall H, SB Ross, Sällemark M (1984). Effect of destruction of central noradrenergic and serotonergic nerve terminals by systemic neurotoxins on the long term effects of antidepressants on β -adrenoreceptors and 5-HT₂ binding sites in the rat cerebral cortex. *J Neurotransm* 59: 9-23.
- Handley SL (1991). Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: *Serotonin, sleep and mental disorders*. Idzikowski C, Cowen PJ (Eds). Wighston Biomedical Publishing Ltd, UK, pp. 89-115.
- Hascoet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB (2000). Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 339-344.
- Heal DJ, Bristow LJ, De Souza RJ, Bloomfield JG, Hurst EM, Elliot JM (1988). The influence of injection of oestradiol to female rats on changes in α 2- and β -adrenoreceptor function induced by repeated administration of desipramine or electroconvulsive shock. *Neuropharmacology* 27: 1151-1159.
- Hommer DW, Skolnick P, Paul SM (1987). The benzodiazepine/GABA receptor complex and anxiety. *Psychopharmacology. The third generation of progress*. Meltzer HY (Ed). Raven Press, pp: 977-983.
- Insel TR, Winslow JT (1991). Rat pup ultrasonic vocalizations: an ethologic relevant behavior responsive to anxiolytics. In: *Animal models of psychopharmacology*. Olivier B, Mos J, Slagen JL (Eds.). Birkhauser Verlag, Switzerland, pp: 15-36.
- Jackel C, Krenz W, Nagy F (1994). Bicuculline/baclofen-insensitive GABA response in crustacean neurons in culture. *J Exp Biol* 191(1): 167-193.
- Janowsky DS, Halbreich U, Rausch J (1996). Association among ovarian hormones, other hormones and, emotional disorders and neurotransmitters. In: *Psychopharmacology and Women. Sex, Gender and Hormones*. Jensvold MF, U Halbreich, JA Hamilton. American Psychiatric Press, Inc. Washington DC, pp 85-106.
- Jensvold MF (1996). Nonpregnant reproductive-age women. Part I: The menstrual cycle and psychopharmacology. In: *Psychopharmacology and women: sex, gender and hormones*. Jensvold M, Halbreich U, Hamilton J (Eds.). American Psychiatry Press, 139-167.

- Kendall G, Stancel GM, Enna SJ (1981). Imipramine: effect of ovarian steroids on modifications in serotonin receptors binding. *Science* 211: 1183-1185.
- Kirby LG, Allen AR, 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 LG, Chou-Green JM, Davis K, Lucki I (1997a). The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid. *Brain Res* 760: 218-230.
- Kirby LG, Lucki I (1997b). Interactions between the forced swimming and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 967-976.
- Kirby LG, Lucki I (1998). The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress* 2: 251-263.
- Kokate TG, Banks MK, Magee M, Yamaguchi SI, Rogawski MA (1998). Finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 679-684.
- Korte SM (2000). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 117-142.
- Koob GF (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine and stress. *Biol Psychiat* 46: 1167-1180.
- Koob GF, Heinrich SC, Britton K (1998). Animal models of anxiety disorders. In: *Textbook of psychopharmacology*. Schatzberg AF, Nemeroff CB (eds). Washington, The American Psychiatry Press, Second Edition, pp. 133-144.
- Laino CH, Cordoba NE, Orsingher OA (1993). Perinatally protein-deprived rats and reactivity to anxiolytic drugs in the plus-maze test: An animal model for screening antipanic agents? *Pharmacol Biochem Behav* 46: 89-94.
- Lambert JJ, Belleli D, Hill-Venning C, Peters JA (1995). Neurosteroids and GABA_A receptor function. *TIPS* 16: 285-303.
- Lan NC, Chen JS, Belleli D, Pritchett DB, Seeburg PH, Gee KW (1990). A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA_A-benzodiazepine receptor. *Eur J Pharmacol* 188: 401-410.
- López JF, DT Chalmers, KY Little, SJ Watson (1998). Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralcorticoid receptor in the rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiat* 43: 547-573.
- López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A, Urbá-Hölmegrem R (1996). Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT_{1A} compounds. *Develop Psychobiol* 29: 157-169.
- Loyd KG, Thuret F, Pilc A (1985). Up-regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) B binding sites in rat frontal cortex: a common action repeated administration of different classes of antidepressants and electroshock. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 191-199.
- Lu NZ, Shlaes TA, Gundiah C, Dziennis SE, Lyle RE, Bethea CL (1999). Ovarian steroid action of tryptophan hydroxylase protein and serotonin compared to localization of ovarian steroid in midbrain of guinea pigs. *Endocrine* 11: 257-267.
- Lydiard RB, Morton WA, Emmanuel NP, Zealberg JJ, Laraia MT, Stuart GW, O'Neil PM, Ballenger JC (1993). Preliminary report: placebo-controlled, double-blind study of the clinical and metabolic effects of desipramine in panic disorder. *Psychopharmacol Bull* 29: 183-188.
- Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB (1996). Diverse modes of action of progesterone and metabolites. *J Steroid Biochem Molec Biol* 56: 1-6.
- Majewska MD, Harrison WL, Schwartz RA, Barker JL, Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232: 1004-1007.
- Majewska MD (1987). Steroid and brain activity. *Biochem Pharmacol* 36: 3781-3788.

- Majewska MD (1992). Neurosteroids. Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor: mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38: 379-395.
- Maryán ML, Santana S, Chávez-Chávez L, Bertran M (1997). Inescapable shocks accentuate fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. *Arch Med Res* 28: 369-372.
- Maswood S, Steward G, Uphouse L (1995). Gender and estrous cycle effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, on the hypothalamic serotonin. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 807-813.
- McDougle CJ, Goodman WK, Price LH (1993). The pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacopsychiatry* 26: 24-29.
- McEwen BS (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *TIPS Rev* 12: 141-147.
- McEwen BS, Parsons B (1982). Gonadal steroid on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 22: 555-598.
- Mienville JM, Vicini S (1989). Pregnenolone sulphate antagonizes GABA_A receptor mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res* 489: 190-194.
- Miller HL, Delgado PL, Salomon RM, Berman R, Krystal JH, Heninger GR, Charney DS (1996). Clinical and biological effects of catecholaminergic depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiat* 53: 117-128.
- Molina-Hernández M, Díaz-Meza JL, Saavedra M, Ortiz M, Contreras CM (1996). Raphe-septal neurons changes in sensitivity to desipramine following an early septal lesion in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 20: 1427-1434.
- Molina-Hernández M, Contreras CM, Téllez-Alcántara P (2000). Antidepressant-like effects of pregnancy and progesterone in Wistar rats as measured in the differential reinforcement on the low rate 72s task. *Psychopharmacology* 151: 306-311.
- Mudunkotuwa NT, Horton RW (1996). Desipramine administration in the olfactory bulbectomized rat: Changes in brain β -adrenoreceptor and 5-HT_{2A} binding sites and their relationship to behavior. *Brit J Pharmacol* 117: 1481-1486.
- Musselman DL, DeBattista C, Nathan KI, Kitis CD, Schatzberg AF, Nemeroff CB (1998). Biology of mood disorders. In: *Textbook of psychopharmacology*. The American Psychiatry Press, Washington DC, pp. 549-588.
- Neill D, Vogel G, Hagler M, Kors D, Hennessey A (1990). Diminished sexual activity in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 73-76.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatment. *J Neurosci* 15: 7439-7547.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 2365-2372.
- Nutt DJ, P. Glue (1991). Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: A psychopharmacological perspective. In: Bowman WC (Ed.), *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*, Glasgow, Pergamon Press.
- O'Connor LH, McEwen BS (1988). Regulation of specificity of gamma-aminobutyric acid receptor regulation by estradiol. *Neuroendocrinology* 47: 473-481.
- Oppenheim G (1983). Estrogen in the treatment of depression: Neuropharmacological mechanisms. *Biol Psychiat* 18: 721-725.
- Owens MJ, Nemeroff CB (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 43: 426-462.

- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine but not desipramine, in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 147: 162-167.
- Pasnau RO, Bystritsky A (1994). On the comorbidity of anxiety and depression. In: *Handbook of depression and anxiety. A biological approach*. Den Boer JA, Ad Sitsen JM (Eds). Marcel Dekker, Inc, New York, pp 45-56.
- Patchev VK, Shoaib M, Holsboer F, Almeida FX (1994). The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 62: 265-271.
- Paul SM, Purdy RH (1992). Neuroactive steroids. *FASEB* 6: 2311-2332.
- Pearce J, Hawton K, Blake F (1995). Psychological and sexual symptoms associated with the menopause and the effects of hormone replacement therapy. *Brit J Psychiat* 167: 163-173.
- Pearlstein TB (1995). Hormones and depression: What are the facts about premenstrual syndrome, menopause, and hormone replacement therapy? *Am J Obstet Gynecol* 173: 646-653.
- Pellow S, Chopin P, File S, Briley M (1985). Validation of open/closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Met* 14: 149-167.
- Perez J, Zucchi I, Maggi A (1986). Sexual dimorphism in the response of the GABAergic system to estrogen administration. *J Neurochem* 47: 1798-1803.
- Petty F, Sherman AD (1981). GABAergic modulation of learned helplessness. *Pharmacol Biochem Behav* 15: 567-570.
- Petty F (1995). GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *J Affect Dis* 34: 275-281.
- Petty F, Trivedi MH, Fulton M, Rush AJ (1995). Benzodiazepines as antidepressants: does GABA play a role in depression? *Biol Psychiat* 38(9): 578-591.
- Picazo O, Fernández-Guasti A (1993). Changes in experimental anxiety during pregnancy and lactation. *Physiol Behav* 54: 295-299.
- Picazo O, Fernández-Guasti A (1995). Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Res* 680: 135-141.
- Pichot P. DSM-IV-R. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. American Psychiatric Association, 1994.
- Pinel JPJ, Treit D (1978). Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* 92: 702-712.
- Pinel JPJ, Hoyer E, Terlecki J (1980). Defensive burying and approach-avoidance behavior in the rat. *Bull Psychol Soc* 16: 349-352.
- Porsolt RD, Lenègre A (1992). Behavioral models of depression. In: *Experimental approaches to anxiety and depression*. Elliot JM, Heal DJ, Maisden CA (Eds.), John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 73-85.
- Porsolt RD, Pichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitivity to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-735.
- Rachmann IL, Unnerstall JR, Pfaff DW, Cohen RS (1998). Estrogen alters behavior and forebrain cfos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proc Natl Acad Sci* 95: 13941-13946.
- Rapkin AJ, Morgan M, Goldman L, Brann DW, Simone D, Mahesh VB (1997). Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstet Gynecol* 90(5): 709-714.
- Redrobe JP, MacSweeney CP, Bourin M (1996). The role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 318: 213-220.

- Richardson JS (1991). The olfactory bulbectomized rat as a model of major depressive disorder. In: Boulton AA, Baker GB, Martin-Iverson MT. *Neuromethods. Animal Models in Psychiatry II*, Vol 19. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp 61-76.
- Rodríguez-Manzo G, López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A (1999). Anxiolytic-like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiol Behav* 67: 651-657.
- Rott RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG (1996). Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol* 138: 246-251.
- Rubinow DR, Schmidt PJ, Roca CA (1998). Estrogen-serotonin interactions: implications for affective disorders. *Biol Psychiat* 44: 839-850.
- Rupprecht R (1997). The neuropsychopharmacology potential of neuroactive steroids. *J Psychiat Res* 31: 297-314.
- Sanger DJ (1991). Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: Boulton AA, Baker GB, Martin-Iverson MT. *Neuromethods. Animal Models in Psychiatry II*, Vol 19. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 147-186.
- Sapena R, Morin D, Zini R, Tilement JP (1994). Cyclic AMP and inositol phosphate accumulations in rat brain cortical slices following chronic citalopram or desipramine administration. *Drugs Exp Clin Res* 20: 93-102.
- Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S (2000). Mechanism of antiapoptotic effects of estrogens in nigra dopaminergic neurons. *FASEB* 14: 1202-1214.
- Scatton B, Lloyd KG, Živkovic B, Dennis T, Claustre Y, Debek J, Arbilla S, Langer SZ, Bartholini G (1987). Fencamidol, a novel antidepressant GABAergic agent. II. Effect on cerebral noradrenergic, serotonergic and GABAergic transmission in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 251-257.
- Schildkraut JJ (1965). The catecholaminergic hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiat* 122: 509-522.
- Schreiber R, De Vry J (1993). 5-HT_{1A} receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanism of action? *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 17: 87-104.
- Seligman ME, Beagley G (1975). Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88: 534-541.
- Seligman ME, Rosellini RH, Kozak MJ (1975). Learned helplessness in the rat: time course, immunization and reversibility. *J Comp* 88: 542-547.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russel DS, Duman RS (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22(8): 3251-3261.
- Sichel DA, Cohen LS, Robertson LM, Rutenberg A, Rosenbaum JS (1995). Prophylactic estrogen in recurrent postpartum affective disorder. *Biol Psychiat* 38: 814-818.
- Singh M, Meyer EM, Simpkins JW (1995). The effects of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleotide acid expression in cortical and hippocampal regions in female Sprague-Dawley rat. *Endocrinology* 136: 2320-2324.
- Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997). Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 56: 131-137.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995). Stress alters the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15: 1768-1777.
- Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Maekowitz RS, French-Mullen JMH, Li X (1998a). GABA_A receptor α 4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* 392: 926-930.
- Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC (1998b). Withdrawal from 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one using pseudopregnancy model alters the kinetic of hippocampal GABA_A-gated current and increases the GABA_A receptor α 4 subunit in association with increases anxiety. *J Neurosci* 18: 5275-5284.

- Söderpalm B, Engel JA (1989). Does the PCPA induced anticonflict effect involve activation of the GABA/benzodiazepine chloride ionophore receptor complex? *J Neural Transm* 76: 145-153.
- Squires RF, Saederup E (1988). Antidepressants and metabolites that block GABA_A receptors coupled to 35S-t-butyl-bicyclophosphorothionate binding sites in rat brain. *Brain Res* 1441: 15-22.
- Stahl SM (1998a). Basic pharmacology of antidepressants, Part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiat* 59: 5-14.
- Stahl SM (1998b). Basic psychopharmacology of antidepressants, Part 2: estrogen as an adjunct to antidepressant treatment. *J Clin Psychiat* 59: 15-24.
- Stahl SM (2000). *Essential Psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications*. Cambridge University Press, second edition, Cambridge, UK.
- Stéru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressant in mice. *Psychopharmacology* 85: 367-370.
- Stone E, Quartermain D (1999). Alpha-1-noradrenergic neurotransmission, corticosterone, and behavioural depression. *Biol Psychiat* 46: 1287-1300.
- Sumner BEH, Fink G (1995). Estrogen increases the density of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat. *J Steroid Molec Biol* 54: 15-20.
- Suranyi-Cadotte BE, Bodnoff SR, Welner SA (1990). Antidepressant-anxiolytic interactions: involvement of the benzodiazepine-GABA and serotonin systems. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 14: 633-654.
- Suranyi-Cadotte BE, Dam TV, Quirion R (1984). Antidepressant-anxiolytic interaction: decreased density of benzodiazepine receptors in rat brain following chronic administration of antidepressants. *Eur J Pharmacol* 106: 673-675.
- Suzdak PD, Gianutsos G (1985). Parallel changes in the sensitivity of gamma-aminobutyric acid and noradrenergic receptors following chronic administration of antidepressant and gabaergic drugs. A possible role in affective disorders. *Neuropharmacology* 24: 217-222.
- Takahashi LK, Kim H (1995). Relative contributions of pituitary-adrenal hormones to the ontogeny of behavioral inhibition in the rat. *Physiol Behav* 57: 711-716.
- Tanda G, Carboni E, Frau R, Chiara G (1994). Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology* 115: 285-288.
- Treit D (1990). A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolysis. *Pharmacol Biochem Behav* 36: 203-205.
- Treit D (1994). Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. In: *Handbook of depression and anxiety. A biological approach*. Den Boer JA, Ad Sitsen AD (Eds). Marcel Dekker Inc, pp. 201-224.
- Treit D, Pinel JPJ, Fibiger HC (1982). The inhibitory effect of diazepam on conditioned defensive burying is reversed by picrotoxin. *Pharmacol Biochem Behav* 17: 359-361.
- Tyrer P, Tyrer J (1994). Antidepressive drugs for treatment of anxiety disorders-and vice versa. In: *Handbook of depression and anxiety. A biological approach*. Den Boer JA, Ad Sitsen JM (Eds). Marcel Dekker, Inc, New York, pp 497-514.
- Vetulani J, Nalepa I (2000). Antidepressants: past, present and future. *Eur J Pharmacol* 405: 351-363.
- Vogel G, Neill D, Hagler M, Kors D, Hartley P (1990a). Decreased intracranial self-stimulation in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 65-68.
- Vogel G, Neill D, Kors D, Hagler M (1990b). REM abnormalities in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 77-83.

- Weiss JM, Kilts CD (1998). Animal models of depression and schizophrenia. In: Text book of Psychopharmacology. Schatzber AF, Nemeroff CB (eds). The American Psychiatry Press; Washington DC, pp. 89-132.
- West AP (1990). Neurobiobehavioral studies on forced swimming: the role of learning and memory in the forced swimming test. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 14: 863-877.
- Willner P, Muscat R (1991). Animal models for investigating the symptoms of depression and the mechanism of action of antidepressant drugs. In: Animal models of psychopharmacology. Olivier B, Mos J, Slagen JL. (Eds.). Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 161-182.
- Willner P (1994). Animal models of depression. In: Handbook of depression and anxiety. A biological approach. Den Boer JA, Ad Sitsen JM (Eds.). Marcel Dekker, Inc, New York, pp 291-316.
- Willner P (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression. *Psychopharmacology* 134: 319-329.
- Yadin E, Thomas E (1981). Septal correlates of conditioned inhibition and excitation in rats. *Ann Comp Physiol Psychol* 95: 331-3340.
- Yadin E, Thomas E (1996). Stimulation on the lateral septum attenuates immobilization-induced stress ulcers. *Psychol Behav* 59: 883-886.
- Yonkers KA, Chantilis SJ (1995). Recognition of depression in obstetric/gynecology practices. *Am J Obstet Gynecol* 173: 632-638.
- Yoshioka M, Matsumoto M, Numazawa R, Togashi H, Smith CB, Saito H (1995): Changes in the regulation of 5-hydroxytryptamine release by alpha2-adrenoreceptors in the rat hippocampus after long-term desipramine treatment. *Eur J Pharmacol* 294: 565-570.
- Zangen A, Overstreet DH, Yadid G (1997). High serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid levels in limbic brain regions in a rat model of depression: normalization by chronic antidepressant treatment. *J Neurochem* 69: 2477-2483.