

recibió 21 inyecciones de solvente. VPA100 (n=7), tratado con 21 inyecciones de 100 mg/kg de valproato sódico. VPA400 (n=4), al que se administraron las 20 primeras inyecciones de 100 mg/kg de valproato sódico, siendo la última de 400 mg/kg del mismo compuesto. IMI (n=4), tratado con 14 inyecciones (las 14 primeras) de vehículo y 7 inyecciones de imipramina a 16 mg/kg (los últimos 7 días).

Este programa específico de inyección crónica de valproato sódico a 100 mg/kg fue seleccionado en base a los datos procedentes de experimentos bioquímicos en los que el VPA mostraba una acción similar a los fármacos antidepresivos tradicionales (Lloyd y col., 1985).

Experimento 3D. Se utilizaron 24 ratas de 398 ± 25 gr. de peso (11.5 semanas de edad aproximadamente). En este caso el tiempo entre las dos sesiones del test de "natación forzada" fue de 9 días. Por lo demás el procedimiento fue idéntico al del experimento anterior. Se realizaron 3 grupos experimentales: CONT (n=8), VPA400 (n=8) e IMI (n=8). CONT y VPA400 fueron tratados como en el anterior experimento, hecha la salvedad de que el tratamiento duró sólo 9 días. El grupo IMI, en este caso, recibió 9 inyecciones de imipramina a 16 mg/kg de peso.

Experimentos 3E-a y 3E-b. Efecto de los antagonistas GA-BAérgicos bicuculina y picrotoxina sobre la acción del valproato en el test de "natación forzada". Para estos experimentos se

utilizaron un total de 65 ratas de 430 ± 34 gr (sobre las 14 semanas de edad). Los tratamientos crónicos con vehículo (grupos VEH-BIC, VEH-PIC y VEH) o con valproato sódico (grupos VPA400, VPA400-BIC y VPA400-PIC) se realizaron de forma idéntica al experimento 3D, al igual que el resto del procedimiento experimental. La única salvedad fue que se administró una inyección de bicuculina (BIC, 2 mg/kg; Experimento 3E-a) o picrotoxina (PIC, 1.4 mg/kg; Experimento 3E-b), o bien las correspondientes de vehículo, 20 o 30 minutos antes de la segunda sesión natatoria ("test" de 5 minutos de inmovilidad). Así pues, se constituyó un diseño factorial 2×2 , para cada experimento, con un factor "fármaco crónico" (valproato o vehículo) y un segundo factor "fármaco agudo" [bicuculina (o picrotoxina) o vehículo].

Experimentos de Campo Abierto. Como anteriormente mencionamos, se realizaron con el fin de tener un control de cuáles son los efectos que sobre la actividad motora manifiestan los fármacos (dosis y programas de administración) que se mostraron efectivos en la reducción el tiempo de inmovilidad en el test de "natación forzada". Se llevaron a cabo únicamente dos experimentos de Campo Abierto, en los que se estudiaron todos los tratamientos que en la prueba natatoria habían dado lugar a reducciones del tiempo de inmovilidad. Así, el experimento primero (Exp. 1) lo constituyeron los grupos, CONT, IMI, BC05+IMI, MU+IMI y VPA200. El segundo experimento, dividido a su vez en tres (Exp. 3B, 3C y 3D), se realizó con los grupos: CONT y VPA400 para el

experimento de tratamiento agudo (correspondiente al experimento 3B de "natación forzada"). CONT, VPA400 e IMI, para el experimento de tratamiento durante 21 días (correspondiente al experimento 3C). CONT, VPA400 e IMI, para el experimento de tratamiento durante 9 días (correspondiente al experimento 3D).

En todos los casos, el programa de administración de los fármacos, las condiciones de experimentación, el peso y condiciones de estabulación de los animales fueron similares a los utilizados en los correspondientes experimentos de "desesperanza conductal", llevándose a cabo el test de Campo Abierto 1 hora después de la última inyección de acuerdo con la metodología descrita en el apartado de Procedimiento (1.2.2.2.). Debe tenerse en cuenta que la primera inyección se administraba sin que previamente se hubiera realizado ningún tipo de prueba a los animales, a diferencia del método del test de "natación forzada" en que las ratas reciben la primera inyección tras haber pasado por la sesión de "stress" (sesión de 15 minutos) (Porsolt y col., 1978a).

1.2.3. Análisis estadístico de los datos.

Para el análisis estadístico de los resultados de los experimentos 1-3D se utilizó el análisis de la varianza de un factor (ONEWAY, SPSS-X), seguido de pruebas de Duncan para compara-

ciones entre de grupos. A los datos de los experimentos 3E-a y 3E-b se aplicaron sendos análisis de la varianza de dos factores (ANOVA 2 x 2, SPSS-X), y se compararon pares de grupos a posteriori mediante la prueba t de Student de comparación de medias. En el caso de los experimentos de Campo Abierto, dado que se observó desigualdad de varianzas entre diferentes grupos (según la prueba F de Snedecor), se realizó el tratamiento estadístico aplicando análisis de la varianza de Kruskal Wallis (no paramétrico) seguido de comparaciones de pares de grupos con la U de Mann Whitney. Todo ello se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS-X.

1.3. Resultados.

Como muestra la Figura 1.1, los diferentes tratamientos farmacológicos produjeron un efecto significativo sobre el tiempo de inmovilidad registrado durante el test natatorio de 5 minutos en el experimento 1. Así queda reflejado en el análisis de la varianza efectuado ($F_{(9,107)} = 11.4$, $P \leq 0.0001$), tras el cuál las pruebas Duncan llevadas a cabo para comparar pares de grupos reflejan disminuciones significativas del tiempo de inmovilidad en los grupos IMI y MU+IMI en relación al grupo CONT ($P < 0.01$). Por otra parte, el grupo BC05+IMI no se diferencia significativamente de los animales control aunque la tendencia es bastante evidente, mientras que presenta significativamente más tiempo de

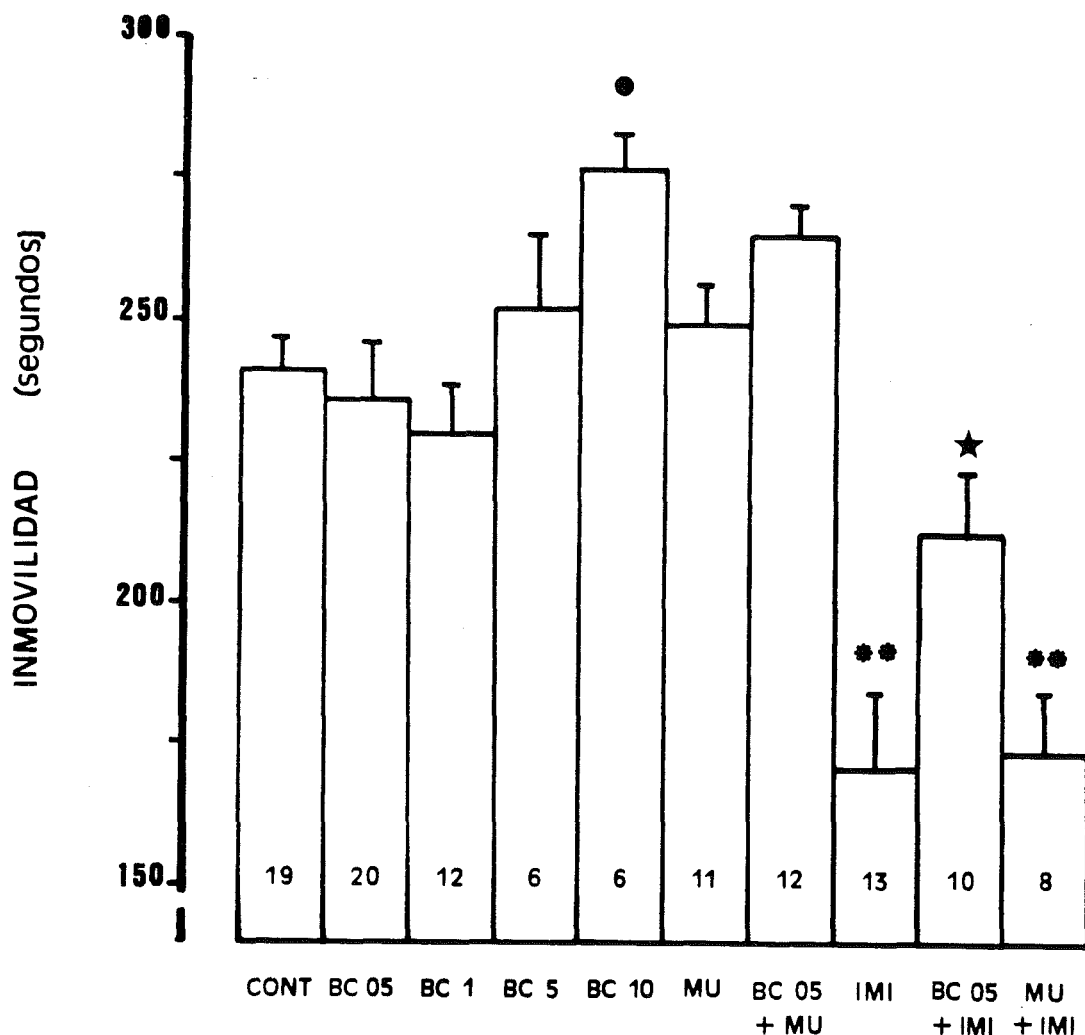


Figura 1.1.- Tiempo de inmovilidad (media \pm error estándar) de las ratas en el test de "natación forzada" tras recibir tres inyecciones de baclofén (BC05-BC10; 0.5-10 mg/kg), muscimol (MU; 0.00125 mg/kg), imipramina (IMI; 15 mg/kg), combinaciones de los fármacos (BC05+MU, BC05+IMI, MU+IMI), o vehículo (CONT). El número de animales de cada grupo se halla en el interior de las columnas. ● $P < 0.05$ respecto al grupo CONT. ** $P < 0.01$ respecto al grupo CONT. ★ $P < 0.01$ respecto al grupo IMI (Todas las comparaciones realizadas con la prueba de Duncan).

inmovilidad ($P < 0.01$, prueba de Duncan) que las ratas a las que sólo se trató con imipramina (IMI). Por último, se observa un aumento progresivamente mayor en los valores de aquella variable a medida que aumenta la dosis de baclofén administrada, alcanzándose niveles de significación estadística en el grupo tratado con 10 mg/kg (BC10; $P < 0.05$ respecto al grupo CONT; prueba de Duncan).

No existen resultados especialmente relevantes en los experimentos 2A-B (Figuras 1.2 y 1.3 respectivamente), puesto que ni la progabida ni el ácido δ -aminovalérico produjeron reducciones en el tiempo de inmovilidad de los animales. Únicamente este último fármaco indujo un incremento en los valores de dicha variable a las dosis más altas administradas (grupos AVAL300 y AVAL400; Figura 1.2.), lo que se tradujo en una $F_{(4, 36)} = 3.04$ ($P = 0.029$) en el análisis de la varianza de un factor realizado, si bien ningún grupo se diferenció del control significativamente.

Los experimentos en que se administró valproato (exp. 3A-D, Figura 1.4) aparecen como más homogéneos y presentan resultados interesantes. Tres inyecciones de 200 mg/kg de valproato sódico (VPA200) disminuyen significativamente el tiempo de inmovilidad en la sesión de natación forzada de 5 minutos ($F_{(3, 36)} = 4.04$, $P < 0.02$; $P < 0.05$, respecto al grupo control, prueba de Duncan). De modo similar, en los experimentos 3C y 3D, cuando se trató a los

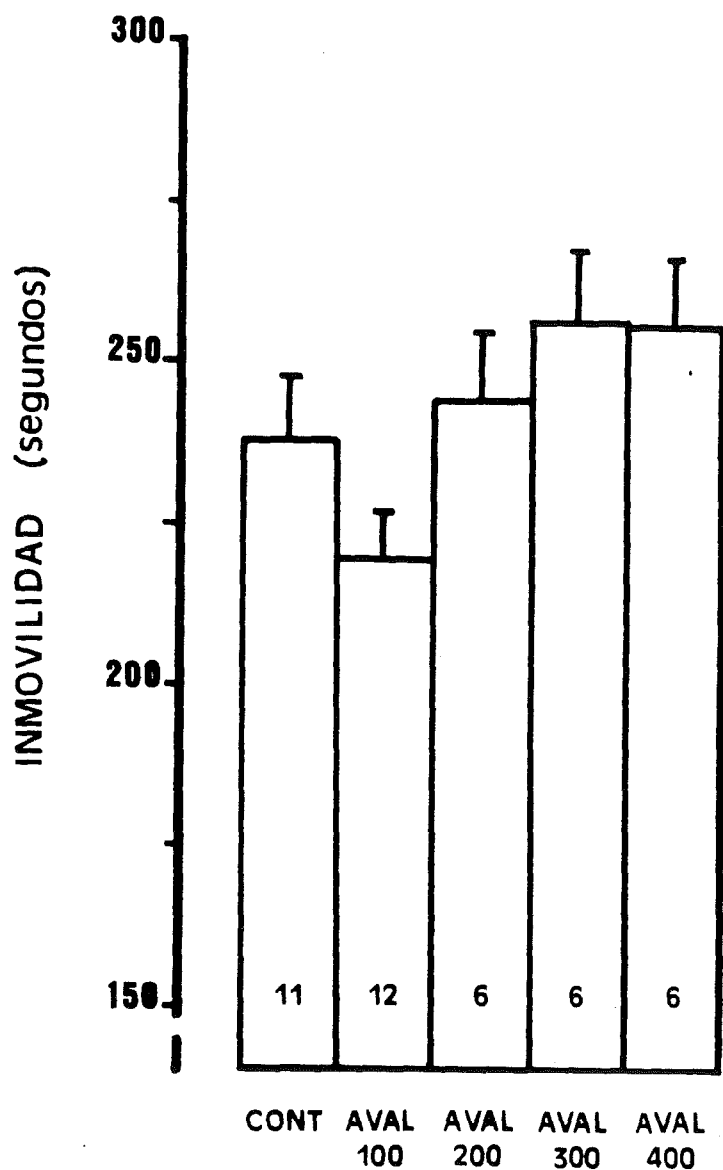


Figura 1.2.- Tiempo de inmovilidad (media \pm error estándar) de los animales en el test de "natación forzada" tras ser tratados con tres inyecciones de ácido δ -aminovalérico (AVAL100-AVAL400; de 100-400 mg/kg) o vehículo (CONT). El número de animales por grupo se incluye en el interior de las columnas.

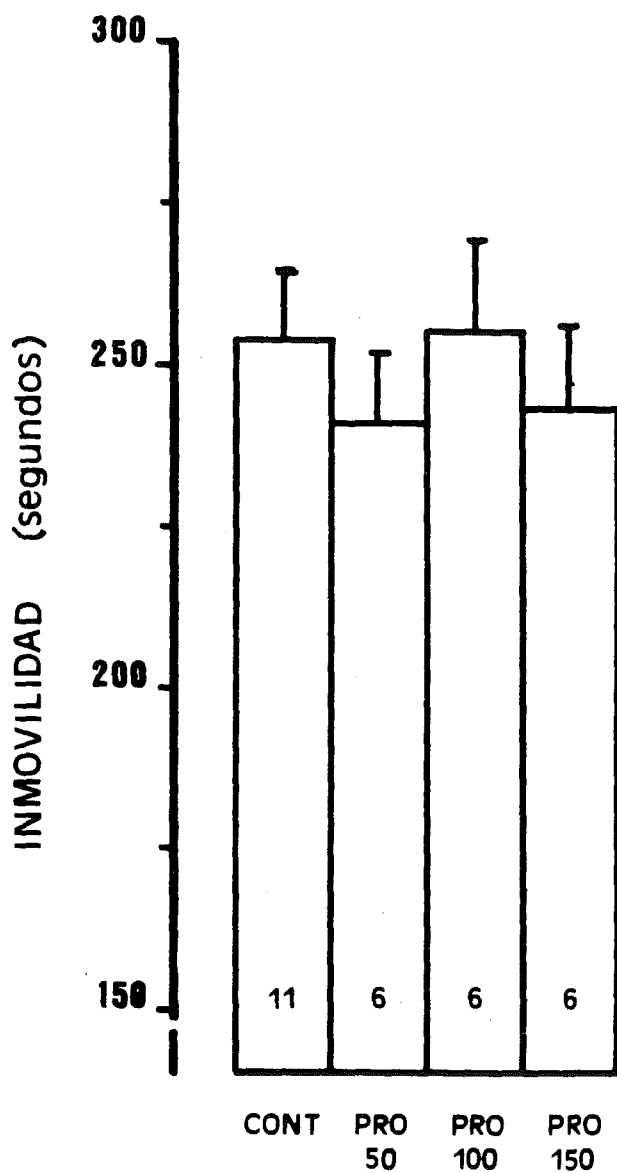


Figura 1.3.- Tiempo de inmovilidad (media \pm error estándar) de las ratas en el test de "natación forzada" tras tres administraciones de diferentes dosis (50-150 mg/kg) de progabida (PRO) o vehículo (CONT). El número de animales por grupo se halla dentro de las columnas.

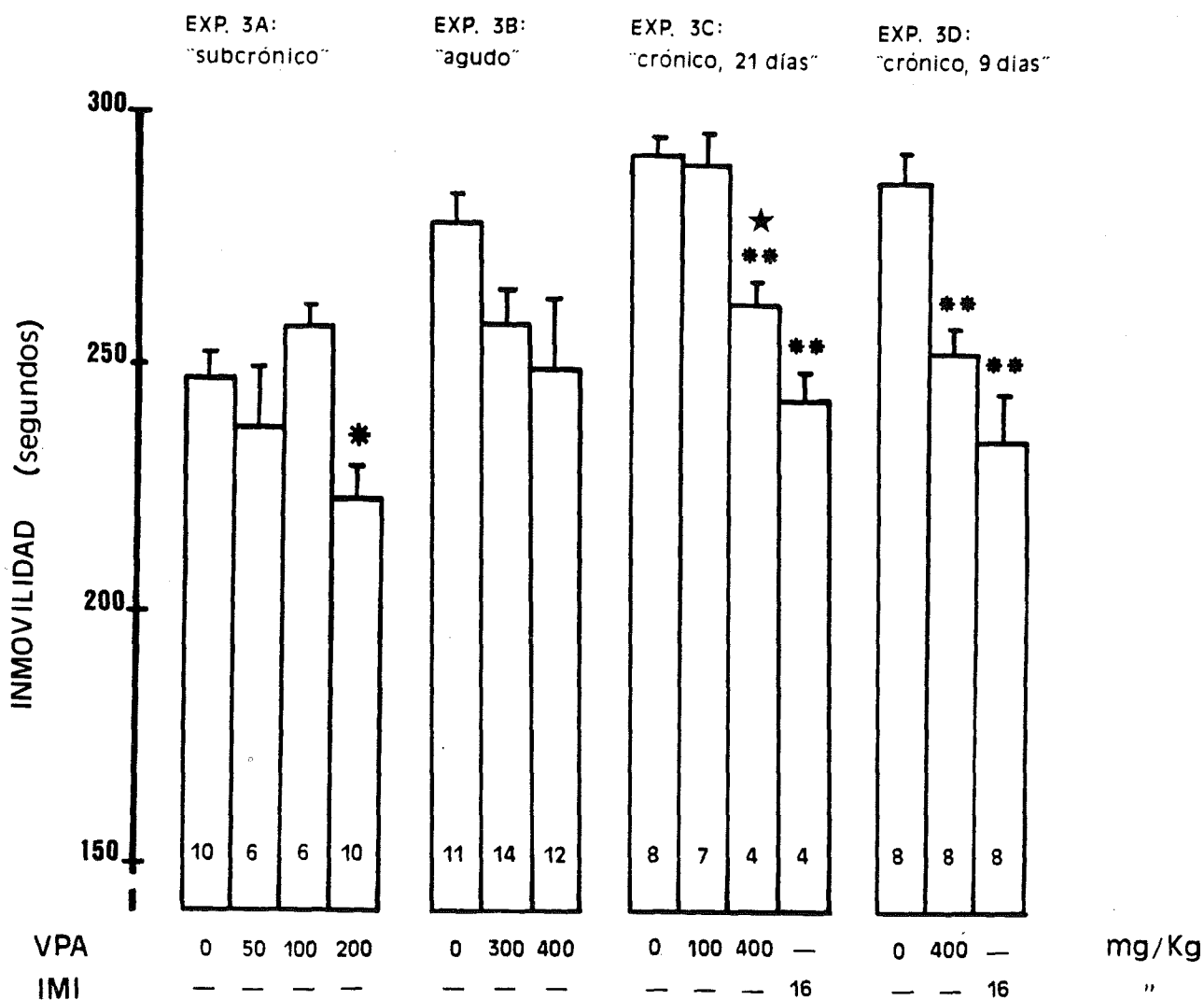


Figura 1.4.- Efecto del valproato sódico (VPA) y la imipramina (IMI), tras diferentes dosis y programas de administración, sobre el tiempo de inmovilidad mostrado por los animales en el test de "natación forzada". Los títulos en la parte superior de la figura indican el tipo de tratamiento que se realizó (ver texto para más detalles).

* $P < 0.05$ respecto al grupo control. ** $P < 0.01$ respecto al grupo control. ★ $P < 0.01$ respecto al grupo VPA 100. Comparaciones efectuadas con la prueba de Duncan.

animales con 20 ó 8 inyecciones de 100 mg/kg de valproato seguidas de una última dosis de 400 mg/kg (1 hora antes del test de 5 minutos) se constataron reducciones significativas de la inmovilidad (exp. 3C: $F_{(3,20)}=20.4$, $P<0.0001$; exp. 3D: $F_{(2,21)}=14.2$, $P<0.0001$. $P<0.001$, prueba de Duncan entre grupos control y VPA400 en ambos experimentos). Asimismo se observó en estos experimentos el efecto esperado de la imipramina, que, a la dosis de 16 mg/kg y tras 7 ó 9 días de administración (exp. 3C y 3D respectivamente), redujo sustancialmente el tiempo de inmovilidad de los animales ($P<0.001$ respecto al grupo control en ambos experimentos), siendo en apariencia algo más potente que el valproato aunque sin mostrar diferencias significativas respecto a aquél. En lo que se refiere al experimento 3B en que sólo se administró una inyección a los animales 1 hora antes del test natatorio, cabe decir que si bien aparece una tendencia bastante clara a la disminución del tiempo de inmovilidad con las dosis 300 y 400 mg/kg de valproato ($t=2.26$, $P=0.034$, entre los grupos control y VPA300), el análisis de la varianza no ofrece resultados significativos ($F_{(2,24)}=1.97$, $P=0.15$; $P<0.1$ para las pruebas Duncan).

De nuevo se confirmó, tras administrar 8 inyecciones de VPA a 100 mg/kg y la novena de 400 mg/kg, la reducción del tiempo de inmovilidad en los experimentos 3E-a ($P<0.05$, t de Student entre grupos VPA400 y control; ANOVA 2x2: $F_{(1,23)}=4.03$, $P=0.058$ para el factor 'fármaco crónico') y 3E-b ($P<0.025$, t de Student

entre grupos VPA400 y control; ANOVA 2x2: $F_{(1, 99)}=10.3$, $P=0.003$ para el factor 'fármaco crónico') (Figura 1.5). Por otra parte, en ninguno de los dos experimentos fue significativo el efecto global del factor 'fármaco agudo', es decir la administración de microtoxina o bicuculina, ni el efecto de la interacción entre los dos factores. No obstante, la significatividad de la acción del valproato desapareció cuando se combinó éste con una inyección de cualquiera de los antagonistas gabérgicos usados, de tal modo que los grupos VPA400+BIC2 y VPA400+PIC1.4 no se diferenciaron de sus respectivos grupos de control en cuanto al tiempo de inmovilidad en el test natatorio.

Es relevante, por último, que ninguno de los fármacos y dosis probadas haya incrementado la actividad (deambulación) ni la exploración (incorporaciones) en los correspondientes experimentos en el test de campo abierto. Es más, como puede comprobarse en las Tablas 1.1 y 1.2, en la mayor parte de los casos los tratamientos que fueron efectivos en reducir el tiempo de inmovilidad en el test de "natación forzada" disminuyeron también los valores de las medidas del campo abierto, a menudo significativamente. Las significaciones de los análisis no paramétricos de la varianza (Kruskall Wallis) fueron, $P<0.04$ (actividad) y $P=0.06$ (exploración) en el experimento 1 (Tabla 1.1), $P=0.049$ y $P=0.064$ respectivamente en el experimento 3C, y $P=0.18$ y $P=0.04$ respectivamente en el experimento 3D (los resultados de estos dos últimos experimentos pueden verse en la Tabla 1.2).

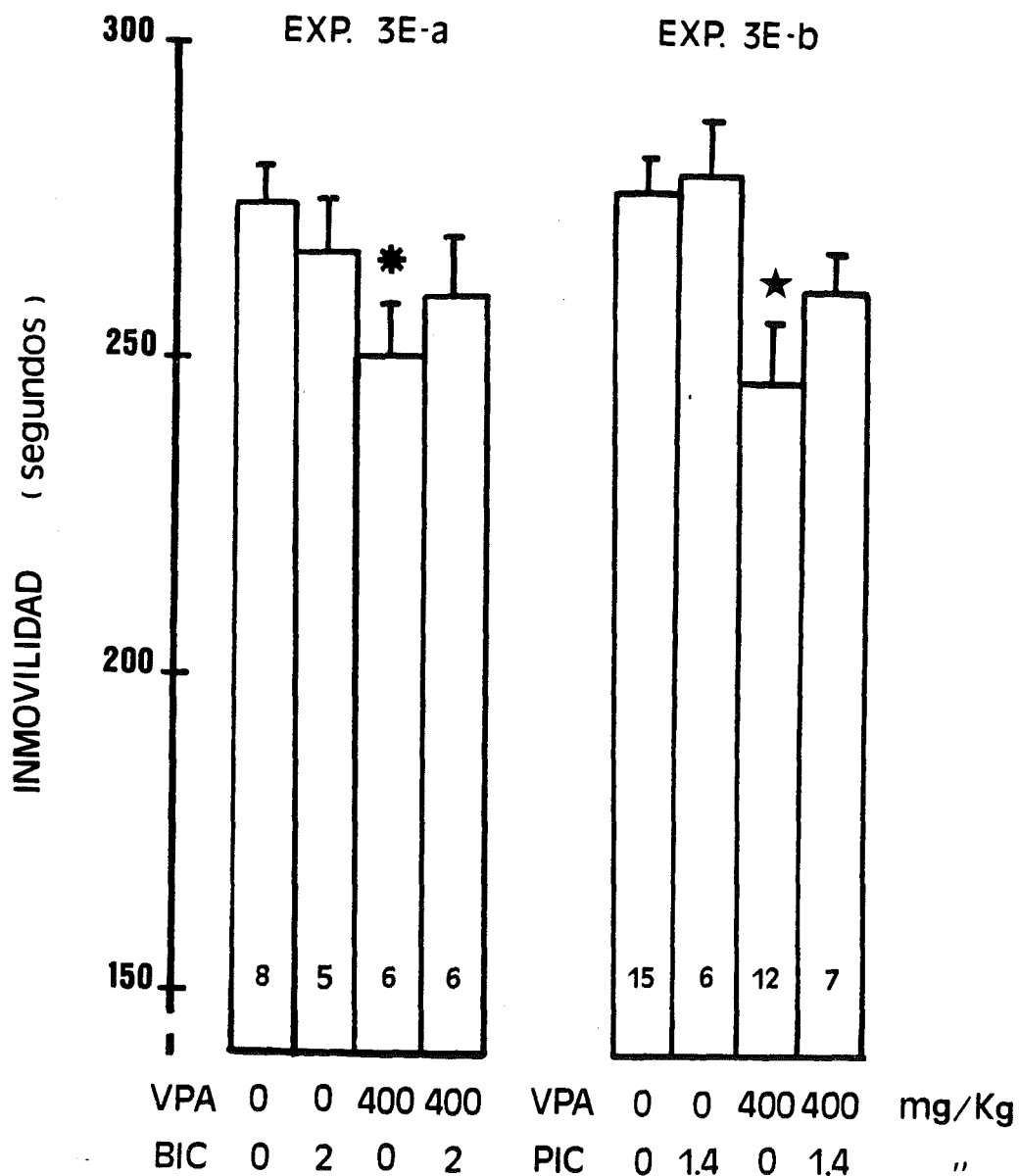


Figura 1.5.- Efecto de la bicuculina (BIC; 2 mg/kg) y la picrotoxina (PIC; 1.4 mg/kg) sobre la acción del tratamiento crónico con valproato sódico (VPA) en el test de "natación forzada". Se representan la media \pm error estándar, con el número de animales por grupo dentro de las columnas. * $P < 0.05$ respecto al grupo control. ★ $P < 0.025$ respecto al grupo control. Comparaciones realizadas con la prueba t de Student para datos independientes.

Exp.	Grupo(n)	Actividad		P	Exploración		P
		\bar{X}	E.S.		\bar{X}	E.S.	
	CONT (7)	99.1	± 8.8		18.1	± 3.3	
1	IMI (4)	65.7	± 28.0	N.S.	7.2	± 4.0	<0.05
	BC05 +IMI (6)	64.8	± 7.9	<0.03	6.3	± 2.3	<0.01
	MU +IMI (6)	64.8	± 7.0	<0.01	9.3	± 2.1	N.S.
	VPA 200 (6)	92.2	± 7.9	N.S.	9.7	± 3.1	N.S.

Tabla 1.1.- Resultados del Experimento 1 (Exp. 1) de campo abierto. Efecto del tratamiento con tres inyecciones de imipramina (IMI; 15 mg/kg), baclofén + imipramina (BC05+IMI; 0.5 y 15 mg/kg respectivamente), muscimol + imipramina (MU+IMI; 0.00125 y 15 mg/kg respectivamente) o valproato sódico (VPA, 200 mg/kg) sobre la actividad (deambulación; media ± error estándar) y la exploración (incorporaciones sobre las patas traseras; media ± error estándar) en el test de campo abierto. El número de animales se encuentra entre paréntesis. Comparaciones efectuadas con la prueba U de Mann Witney.

	Grupo(n)	Actividad		P	Exploración		P
		X	E.S.		X	E.S.	
Exp.	CONT (6)	86.0	± 10.7		11.0	± 1.1	
3B	VPA 400 (6)	53.7	± 22.3	N.S.	0.3	± 0.2	<0.005
Exp.	CONT (5)	101.8	± 11.5		10.2	± 2.1	
3C	VPA 400 (5)	46.6	± 20.9	N.S.	3.2	± 1.7	<0.05
	IMI (5)	46.0	± 12.1	<0.02	8.4	± 1.9	N.S.
Exp.	CONT (5)	93.6	± 6.7		19.0	± 5.3	
3D	VPA 400 (5)	115.4	± 37.5	N.S.	3.8	± 2.9	<0.05
	IMI (5)	71.6	± 6.8	N.S.	10.0	± 3.3	N.S.

Tabla 1.2.- Resultados de los experimentos 3B, 3C y 3D de campo abierto (Exp. 3B-3D, correspondientes a los exp. 3B-3D en el test de "natación forzada"). Efecto de los diferentes tratamientos con valproato sódico (VPA) o con imipramina (IMI) sobre la actividad (deambulación) y la exploración (incorporaciones sobre las patas traseras) en el test de campo abierto. Los valores expresan la media \pm error estándar. El número de animales por grupo se halla entre paréntesis. Comparaciones efectuadas con la prueba U de Mann Witney.

1.4. Discusión.

El resultado más destacable de esta serie de experimentos entendemos que es la reducción significativa, aunque no de gran magnitud, del tiempo de inmovilidad en el test de "natación forzada" tras la administración de valproato sódico según diferentes programas (agudo, subagudo y crónico; Experimentos 3A-E). Tal efecto parece ser más débil que el de la imipramina, pero es bastante comparable al que se ha observado en ocasiones con otros antidepresivos (de acción preferentemente serotoninérgica), como la zimelidina o la clorimipramina (Sato y col., 1984; García Márquez y col., 1987). El antagonismo parcial de la acción del valproato, obtenido después de administrar bicuculina o picrotoxina, se halla en la línea de los diferentes trabajos que han sugerido una acción pro-gabérgica de este anticonvulsivo (McDonald y Bergey, 1979; Gent y Phillips, 1980; Kerwin y col., 1980; Baldino y Geller, 1981; Hammond y col., 1981; Rasmussen y col., 1981; Morag y Myslobdosky, 1982; Myslobdosky y col., 1983; Velucci y Webster, 1984). No obstante, ni nuestros resultados, ni los reportados en la bibliografía, excluyen por el momento que las acciones del valproato puedan ser afectadas por sustancias activas en otros sistemas neuroreguladores.

Dado el supuesto, y tal vez provisional, carácter gabamimético del valproato, los resultados aquí presentados son consistentes con una serie de trabajos recientes que ponen de manifies-

to la capacidad de diversas sustancias pro-gabérgicas para reducir el tiempo de inmovilidad en el test de "desesperanza conductual". Entre ellas se hallan, el muscimol (Borsini y col., 1986a; Borsini y col., 1986d; Poncelet y col., 1987), el ADOA (ácido aminooxacético; Borsini y col., 1986a), el THIP [(4,5,6,7,-tetrahydroisooxazol-[4,5-C]-piridin-3-ol); Borsini y col., 1986a], el etanol (Fernández Pardal y col., 1986). Mientras que, en el test de "natación forzada" en ratones, también los agentes anticonvulsivos pentobarbital (agonista del complejo $GABA_A/Bz/Cl^-$; Schechter y Chance, 1979) y difenilhidantoína (de supuesta pero no clarificada acción gabérgica; Poncelet y col., 1986) disminuyen el tiempo de inmovilidad. No obstante no estableceremos analogías con el modelo natatorio en ratones porque se ha señalado que presenta menor validez predictiva que el modelo en ratas, además de las diferencias de procedimiento (Borsini y Meli, 1988). Por otra parte, el test natatorio en ratón no discrimina entre aquellos fármacos que favorecen la neurotransmisión GABA (como los ya mencionados) y los que la antagonizan, puesto que éstos también reducen el tiempo de inmovilidad en la prueba (Nagatani y col., 1987).

Volviendo pues a resultados obtenidos con ratas en el modelo natatorio, cabe señalar el efecto anti-inmovilidad obtenido con la administración de carbamazepina (Barros y Leite, 1987), sustancia anticonvulsiva que manifiesta efectos antidepresivos en estudios preliminares y ciertas poco conocidas interacciones con

diversos sistemas neuroreguladores, entre ellos los receptores GABA_B y los Bz periféricos (pero no los centrales; Post y col., 1986). Aún así, el anterior resultado se puede considerar como congruente con nuestros datos en tanto que la carbamazepina presenta un perfil terapéutico similar al del valproato (anticonvulsivos, activos en la depresión bipolar), si bien no en cuanto a un posible mecanismo de acción gabérgico, que en el caso de aquélla no ha sido suficientemente avalado por la experimentación (Post y col., 1986).

Digamos, por otra parte, que el efecto esperable de la imipramina (reducción del tiempo de inmovilidad) se observó en todos los experimentos, mientras que ninguno de los otros fármacos utilizados manifestó actividad sobre la conducta en el test nata-torio, excepto las dosis altas de baclofén o de ácido δ -aminovale-ric (Experimentos 1 y 2A) que tendieron a aumentar el tiempo de inmovilidad. Asimismo, en el experimento 1, la actividad de la imipramina es parcialmente antagonizada por la dosis menor de baclofén (0.5 mg/kg; inefectiva por sí misma), sin resultar afectada por el muscimol. Ello, de algún modo, está en desacuerdo con resultados bioquímicos de Enna y col. (1986), quienes observaron una potenciación del efecto de la imipramina (2.5 mg/kg/2 veces al día/5 días) sobre los receptores β -adrenérgicos al administrar simultáneamente baclofén (5 mg/kg). Así, el tratamiento con-comitante con los dos fármacos indujo un mayor decremento en la densidad de adrenoceptores β (en corteza cerebral de rata) y en

la respuesta del AMPc que la administración de cada una de ellos independientemente.

Al contrario que Borsini y col. (1986a; 1986d), tres inyecciones de muscimol (0.00125 mg/kg) no indujeron efecto alguno en el experimento 1, lo que puede atribuirse esencialmente a la reducida dosis por nosotros utilizada (ver Borsini y col., 1986a). En nuestro caso (y no hallándose aún publicado el trabajo de Borsini y col.), escogimos aquella dosis de muscimol por ser la única que había mostrado cierta acción significativa en paradigmas de ansiedad y tras su administración sistémica en ratas (ver Gray, 1982).

Por último, tampoco la progabida manifestó actividad en el test de "natación forzada", si bien antes de excluir la posibilidad de que sea efectiva deberían realizarse estudios adicionales con otros programas de administración y un mayor rango de dosis, habida cuenta de sus efectos 'antidepresivos' en los modelos de "learned helplessness" y de la "rata bulbectomizada", así como el test natatorio en ratón (ver Lloyd y col., 1983; y Sanger y col., 1986).

1.5. Conclusiones.

1. El valproato sódico manifiesta, tras diferentes programas de administración, una ligera pero significativa capacidad de reducir el tiempo de inmovilidad de las ratas en el test de "natación forzada", sin que ello vaya acompañado de efectos estimulantes de la actividad medida en el test de 'campo abierto'.
2. La acción anterior no aparece si el valproato se administra conjuntamente con los antagonistas gabérgicos bicuculina o picrotoxina.
3. Del resto de sustancias gabérgicas utilizadas, ninguna muestra actividad similar a la del valproato.
4. Empleando ratas de mayor tamaño que las que usualmente describe la bibliografía, se reproduce también el efecto anti-inmovilidad de la imipramina en el test de "natación forzada".

2. SERIE EXPERIMENTAL II.

Influencia del tratamiento crónico con antidepresivos sobre el funcionalismo del complejo receptor GABA_A/Bz/ionóforo cloro.

2.1. Introducción.

Como anteriormente mencionamos, durante años se ha considerado que la característica bioquímica más generalmente compartida por los diferentes fármacos antidepresivos, el electrochoque y la privación de sueño paradójico, era la inducción de hipofuncionalidad en el sistema β -adrenérgico central (Sulser y col., 1978; Sulser, 1982). Puesto que la aparición de dicho efecto coincide cronológicamente con el inicio de la acción terapéutica de los citados tratamientos, la teoría " β -adrenérgica" de la acción de los antidepresivos fue bien acogida y suscitó gran cantidad de investigación. Sin embargo, determinadas anomalías han puesto en duda la capacidad explicativa de tal teoría. Así, por ejemplo, algunos fármacos antidepresivos como son la zimelidina, la fluoxetina o la maprotilina, no inducen desensibilización β -adrenérgica tras su administración crónica (Maggi y col., 1980; Ross y col., 1981; Barbaccia y col., 1986), lo cual supone una discrepancia para la teoría. Por otra parte, existe el dato relevante de que se observa una correlación inversa entre la actividad clínica de las drogas antidepresivas y su capacidad para desensibilizar los β -adrenoceptores (Willner, 1984a).

En este contexto, y teniendo como antecedentes los trabajos que comentamos en la "Introducción" de la "Serie Experimental I", surgen los primeros datos que darán forma a una hipótesis GABAérgica de la depresión y del mecanismo de acción de los an-

antidepresivos (ver el apartado 2.2.2.5 de la PARTE TEORICA; también Bartholini y col., 1985a; Lloyd y Pichat, 1986). Tal hipótesis se fundamenta en el, en apariencia, consistente efecto de los diferentes tipos de antidepresivos y el CEC sobre los receptores GABA_B corticales. No obstante, como vimos en la "PARTE TEORICA" (2.2.2.5), se han observado ya algunas discrepancias en relación al aumento del número de receptores GABA_B producido por la administración crónica de antidepresivos, puesto que en trabajos en que se utilizaron medidas funcionales del citado receptor se han obtenido resultados aparentemente contradictorios indicando tanto un incremento (Gray y Green, 1987; Gray y col., 1987) como una no variación (Borsini y col., 1986b) de la funcionalidad GABA_B.

Paralelamente, han aparecido datos que reflejan una interacción entre el tratamiento crónico con antidepresivos y el complejo receptor GABA_A/Bz/Cl⁻. Como ya dijimos, el tratamiento crónico con diversos antidepresivos da lugar a una disminución en el número y en el funcionalismo de los receptores GABA_A (Suzdak y Gianutsos, 1985b; Borsini y col., 1986b), así como en la densidad de receptores Bz y en la afinidad (Kd) de los lugares de fijación de las β-carbolinas (Suranyi-Cadotte y col., 1985; Barbaccia y col., 1986). Hasta el momento los indicios disponibles en cuanto a la interacción entre antidepresivos y el complejo macromolecular GABA_A no se presentan tan consistentes ni generales como los resultados que atañen a la interacción con los recep-

tores GABA_B; no obstante, mientras que la implicación del receptor GABA_B en la depresión o en la acción de los antidepresivos viene sugerida esencialmente por los efectos de aquéllos sobre dicho receptor, datos procedentes de otras perspectivas experimentales permiten involucrar el complejo macromolecular GABA_A/Bz/Cl⁻ en el citado trastorno. Así, recordemos que la bicuculina (antagonista GABA_A) o la β-carbolina ansiogénica y proconvulsivante FG 7142 (agonista parcial inverso del receptor Bz, que disminuye la función del complejo macromolecular GABA_A; Biggio, 1983; Braestrup y col., 1983) inducen "indefensión" en ratas sometidas al modelo experimental de "indefensión aprendida" (Petty y Sherman, 1981; Drugan y col., 1985). Por otra parte, la bicuculina es capaz de prevenir algunos efectos del antidepresivo tricíclico desipramina (ver Petty, 1986), y, de modo similar, el mismo antagonista GABA_A revierte el efecto "terapéutico" de la imipramina en el modelo de "indefensión aprendida" en ratas (Bartholini y col., 1986). Otros resultados ponen de manifiesto que en el test de "natación forzada" se obtienen efectos positivos con fármacos agonistas del receptor GABA_A, como el THIP o el muscimol, pero no con agonistas del GABA_B como el baclofén (Borsini y col., 1986a), el cuál, por otra parte parece antagonizar el efecto anti-inmovilidad de la imipramina en aquel test (ver SERIE EXPERIMENTAL I). Este resultado contrasta, no obstante, con el efecto que la combinación de baclofén e imipramina presentan sobre el número de receptores β-adrenérgicos y la respuesta del AMPc a la noradrenalina en corteza cerebral de rata. De hecho,

la administración concurrente de los dos fármacos disminuye ambos parámetros, aún cuando las dosis utilizadas de ambos compuestos son subefectivas si se administran independientemente (Enna y col., 1986). Asimismo, tampoco un antagonista GABA-B como es el ácido δ -aminovalérico mostró actividad alguna el test de "desesperanza conductual" (ver SERIE EXPERIMENTAL I). Green (1986) proporciona datos adicionales que de nuevo permiten involucrar el complejo macromolecular GABA_A en el mecanismo de la terapia antidepresiva, dado que, administrando bicuculina o pentetrazol (antagonista del complejo GABA_A a nivel del ionóforo cloro) obtuvo un antagonismo completo de los cambios que el choque electroconvulsivo induce en la función de los sistemas monoaminérgicos en cerebro de rata.

Así pues, mientras que la evidencia bioquímica es posiblemente más consistente en relación a los receptores GABA_B, los resultados psicofarmacológicos con modelos animales y los datos clínicos son por el momento bastante más indicativos de una interacción (incluso causal) entre la función del complejo GABA_A/Bz/Cl⁻ y la conducta depresiva y su tratamiento. Quizás la única, pero muy relevante excepción sea la progabida - que posee actividad antidepresiva contrastada tanto en modelos animales como en humanos (Lloyd y col., 1983; Sanger y col., 1986; Morselli y col., 1986; Weiss y col., 1986; Perris y col., 1986)- en la medida en que es un agonista mixto de los receptores GABA_A/B (Bartholini y col., 1985b). No obstante, los datos disponibles im-

plican, también en este caso, preferentemente al receptor GABA_A en los efectos terapéuticos del citado compuesto (Bartholini y col., 1985b; Bartholini, 1986).

En base a todo lo dicho, nos propusimos abundar en la interacción entre el tratamiento con fármacos antidepresivos y el complejo macromolecular GABA_A/Bz/Cl⁻, investigando para ello los efectos del tratamiento crónico con tales sustancias sobre la fijación de [³H]GABA y de [³H]FNT, así como sobre la captación de ³⁶Cl⁻ en cerebro de ratas. La disponibilidad de este último ensayo ha venido a llenar el vacío de pruebas bioquímicas que permitieran estudiar desde esta óptica las interacciones funcionales entre las distintas unidades que conforman el complejo GABA_A/Bz/Cl⁻, interacciones que anteriormente sólo se podían abordar desde el punto de vista farmacológico o electrofisiológico. La medición del transporte de ³⁶Cl⁻ mediado por GABA en cerebro se hizo posible sólo recientemente cuando dos equipos de investigadores, Harris y Allan (1985) por un lado y Schwartz y col. (1984 ; Schwartz y col., 1985), demostraron que se podía medir el flujo de ión cloro, dependiente del GABA, en sinaptoneurosomas cerebrales de roedores. El sinaptoneurosoma es una preparación que contiene membranas pre y postsinápticas que forman vesículas sinápticas cerradas, habiéndose observado en estudios bioquímicos que conservan propiedades funcionales de los receptores y un gradiente electroquímico (Schwartz y col., 1984; Schwartz y col., 1985). En esta preparación tisular se demuestra el acoplamiento

funcional entre el receptor GABA (así como los receptores Bz y los lugares de fijación de los barbitúricos y convulsivantes) y el canal del cloro, puesto que el flujo de este ión ($^{36}\text{Cl}^-$) es modulado en forma concentración-dependiente por el GABA (ver Figura 2.1.) y también por agonistas y antagonistas GABAérgicos, así como por ligandos específicos para el receptor benzodiazepínico asociado al complejo GABA_A . De tal modo que las sustancias agonistas directas o indirectas (barbitúricos, benzodiazepinas, muscimol, etc.) incrementan el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$, mientras que los antagonistas o agonistas inversos del complejo (compuestos convulsivantes, β -carbolinas ansiógenas, etc.) disminuyen la captación de cloro (Harris y Allan, 1985; Schwartz y col., 1985; Sánchez y col., 1986; Lehoullier y Ticku, 1987; Malatynska y col., 1988b; Obata y col., 1988).

De acuerdo con estos resultados, y como anteriormente dijimos, nos pareció que el ensayo de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de cerebro de rata podía constituir una prueba útil para proporcionarnos una idea del funcionalismo del complejo $\text{GABA}_A/\text{Bz}/\text{Cl}^-$ tras la administración crónica de antidepresivos.

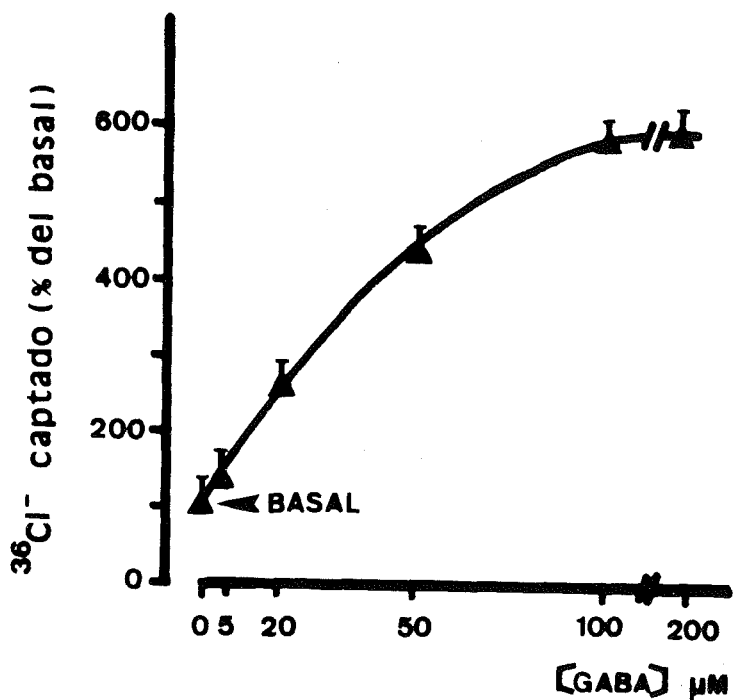


Figura 2.1.- Estimulación de la captación de ^{36}Cl por la presencia de diferentes concentraciones de GABA exógeno (añadido). Los resultados se expresan en porcentaje de la captación basal (en ausencia de GABA exógeno), y cada punto representa la media \pm error estándar de tres experimentos separados, realizado cada uno con cortezas cerebrales de dos ratas (Tomado y adaptado de Corda y col., 1988).

2.2. Material y método.

2.2.1. Animales y estabulación.

En los experimentos de esta serie se utilizaron un total de 50 ratas macho Sprague-Dawley CD (Charles River, Como, Italia) de 360-460 gr. de peso al inicio de los tratamientos. Los animales fueron distribuidos por pesos compensados entre los diversos grupos experimentales, y alojados en número de dos por jaula. Tuvieron libre acceso a comida y agua durante todo el experimento, manteniéndose en condiciones de humedad y temperatura (24 ± 1 °C) controladas, así como en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (luz: 8:00-20:00 h.). El resto de condiciones fueron similares a las descritas en la "Serie Experimental I".

2.2.2. Procedimiento.

2.2.2.1. Tratamiento farmacológico.

Para esta serie experimental se trató a los animales con los antidepresivos tricíclicos clorhidrato de imipramina o clorhidrato de desipramina (IMI o DMI, 20 y 15 mg/kg/día respectivamente; CIBA-GEIGY), o bien con valproato sódico (VPA, 200 mg/kg/día; LABAZ CLIN-MIDY). Todos los fármacos se disolvieron en agua destilada y fueron administrados intraperitonealmente a razón de una inyección diaria durante 18 días consecutivos (siempre a última hora de la mañana), a un volumen constante de 2 ml/kg de

peso corporal. Los animales control (CONT) recibieron un volumen equivalente de vehículo durante el mismo período. Veinticuatro horas después de la última inyección, los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajo y diseccionó rápidamente el cerebro. La corteza cerebral, limpia de sustancia blanca, fue inmediatamente utilizada para el ensayo de captación (flujo) de $^{36}\text{Cl}^-$, mientras que los hipocampos se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento en que se usaron para el ensayo de fijación de [^3H]GABA o de [^3H]flunitrazepam.

2.2.2.2. Medida del flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas de cerebro de rata.

El flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ (ión cloro) se determinó en sinaptoneurosomas preparados a partir de la corteza cerebral de las ratas según el método descrito por Harris y Allan (1985), con algunas modificaciones menores (Corda y col., 1988a). Aproximadamente 1 gr. de tejido de corteza cerebral se homogeneizó con un homogeneizador manual de vidrio realizándose 10 rotaciones, en 7 ml de tampón frío que contenía HEPES-Tris 20 mM, NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO_4 1.18 mM y CaCl_2 2.5 mM (pH 7.3). Al homogeneizado se le añadió tampón frío después hasta llevarlo a un volumen de 30 ml y fue centrifugado a $1000 \times g$ (durante 15 minutos y a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se lavó una vez mediante resuspen-

sión en el mismo tampón (e idéntico volumen) y otra centrifugación (idénticos parámetros). El pellet final se homogeneizó de nuevo en 3 volúmenes (peso/volumen; 1 gr de tejido/3 ml de medio) del mismo tampón (pero esta vez con pH 7.5), de tal forma que la concentración final de proteínas sería de unos 15 mg/ml. Alícuotas de 100 μ l de esta preparación (membranas neuronales) se preincubaron en un baño de agitación a 30 $^{\circ}$ C y durante 15 minutos. Tras esta preincubación se iniciaba el proceso de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ al añadir a cada uno de los tubos (contenedores de 100 μ l de solución con sinaptoneurosomas) 100 μ l de $^{36}\text{Cl}^-$ (actividad específica: 19.38 mCi/gr; concentración: 2 μ Ci/ml; New England Nuclear) conteniendo GABA a diferentes concentraciones (0, 5 y 10 μ M). Para cada muestra experimental y cada concentración de GABA se determinó la captación de $^{36}\text{Cl}^-$ por triplicado o cuadruplicado (de modo que cada dato experimental es la media de tres o cuatro tubos). El volumen de incubación final fue de 500 μ l. Cinco segundos después de la adición del $^{36}\text{Cl}^-$ se paraba la reacción (captación del mismo por los sinaptoneurosomas) añadiendo 4 ml de tampón frío y procediendo a la rápida filtración de las muestras a través filtros Whatman GF/C (de 2.5 cm) de fibra de vidrio que habían sido previamente tratados (sumergidos por un mínimo de 1 hora) con polietileneimina (0.05%) a fin de reducir la fijación inespecífica. Para el filtrado se utilizó una máquina de filtración de 10 orificios (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) y una bomba de vacío. Tras la filtración, los filtros se lavaron de nuevo dos veces con 4 ml de tampón frío,

después de lo cual se dejaron secar y fueron transferidos a picoviales que contenían 4 ml de líquido de centelleo (Atomlight, New England Nuclear), dejándose entonces reposar por un mínimo de 24 horas a 4 °C antes de ser introducidos en el contador de centelleo para el conteo de radioactividad. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo con el método de Lowry y col. (1951), con el reactivo de Folin y albúmina bovina sérica como estándar.

2.2.2.3. Fijación de [³H]GABA.

2.2.2.3.1. Preparación de las membranas.

Para estos ensayos se homogeneizaron los hipocampos de rata con un Polytron PT 10 (colocado a velocidad 5, durante 20 segundos) en 10 volúmenes (peso/volumen; 1 gr tejido/10 ml de medio) de H₂O fría y se centrifugaron durante 10 minutos a 48.000 x g y a 4 °C. Tras ello, el precipitado se lavó una vez por resuspensión y recentrifugación en 10 volúmenes (1 gr/10 ml) de tampón K₂HPO₄/KH₂PO₄ 20 mM (pH 7.4) que contenía KCl 50 mM. Después de esta centrifugación las membranas se almacenaban en el frigorífico a -20 °C hasta el momento de ser usadas para el ensayo, de 1 a 5 días más tarde.

Se ha comprobado que el almacenaje y congelación del tejido de este modo incrementa la fijación en receptores GABA postsinápticos y disminuye notablemente la fijación sodio-dependiente de

GABA que no está relacionada con receptores sinápticos (Enna y Snyder, 1975).

2.2.2.3.2. Ensayo de fijación de [³H]GABA.

El día del ensayo las membranas fueron descongeladas y centrifugadas (48.000 x g y 4 °C) durante 10 minutos. El precipitado fue lavado tres veces más por resuspensión y recentrifugación en el mismo volumen del tampón frío usado para la preparación de las membranas. Tras el último lavado, el tejido se resuspendió en 50 volúmenes (1 gr/50 ml) del mismo tampón, y de esta suspensión de membranas se colocaron 400 µl (unos 300 µg de proteínas) en mini-viales de plástico. El volumen total de incubación fue de 500 µl. La incubación (10 minutos a 4 °C) se inició con la adición de una única concentración 40 nM de [³H]GABA (actividad específica: 37 Ci/mmol) y se finalizó por centrifugación a 48.000 x g durante 10 minutos (4 °C). El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado delicadamente con 4 ml de H₂O fría, siendo entonces disuelto en 3 ml de líquido de centelleo (Atomlight, New England Nuclear). Tras un mínimo de 12 horas de reposo se introducían las muestras en el contador de centelleo (de radiación β).

La fijación específica de [³H]GABA se definió como la cantidad de radiactividad de [³H]GABA ligado que era desplazada por una concentración 1 mM de GABA no marcado. La concentración de