

T/405

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

87081



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

---

---

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

SENSIBILIDAD DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL  
EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESION: RESPUESTAS AL  
ESTRES Y A LA ESTIMULACION COLINERGICA Y  
CONDUCTUAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

P R E S E N T A :

**M. en BIOL. EXP. HERLINDA BONILLA JAIME**

DIRECTOR: DR. JAVIER VELAZQUEZ-MOCTEZUMA

MEXICO, D. F.

JULIO 2004.

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el padrón de Postgrados de excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio PFR-200-93.**

**El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACyT, número de Registro: 11504.**

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las  
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

**Herlinda Bonilla Jaime**

El día 20 de Julio del año del 2004

**Comité Tutorial**

**Director:** Dr. Javier Velázquez Moctezuma.



**Asesora:** Dra. Socorro Retana Márquez



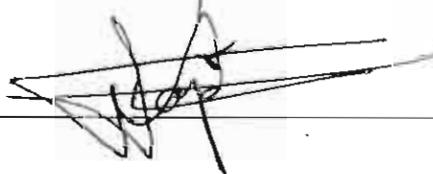
**Asesor:** Dr. José Ramón Eguibar



**Sinodal:** Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio



**Sinodal:** Dr. Efraín Campos Sepúlveda



**A DIOS**

*Por sus bendiciones*

**A GONZALO**

*Por compartir tu vida conmigo, tu amor... por regalarme parte de tu fortaleza y a quién amo tanto. Gracias Amado mío y amigo.*

**A CIRCE**

*Mi hija, porque todo lo que tocas lo haces primavera, por regalarme tu amor, tu tiempo y tu dulzura.*

**A MIS PADRES**

*Gracias por su apoyo y amor, porque sin ello no hubiera llegado hasta aquí.*

**A BERTHA**

*A quién extraño tanto, porque hasta los últimos días de tu vida me enseñaste la paciencia, el amor y el valor para enfrentar las tormentas de la vida.*

**A MIS HERMANOS Y SOBRINOS**

*Simplemente porque los quiero.*

**A MIS AMIGOS.**

*Por el gran tesoro que me regalan cada día, su amistad*

**A TODOS**

*Muchas Gracias*

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Javier Velázquez Moctezuma** por la realización de esta tesis.

A la **Dra. Socorro Retana Márquez** por su gran capacidad y por su ayuda en mi formación académica.

Al **Dr. José Ramón Eguibar** por su comprensión, su disposición y su paciencia.

A mis sinodales: **Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio** y al **Dr. Efraín Campos Sepúlveda** por sus acertados comentarios y aportaciones en la realización de esta tesis.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana**, por permitirme, una vez más, concluir una nueva etapa en mi formación.

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Depresión.....	2
2.2. Aspectos Neuroquímicos de la Depresión.....	3
2.3. Eje hipotálamo hipófisis-adrenal.....	6
2.4. Concepto de estrés.....	9
2.4.1. Respuesta al estrés.....	10
2.4.2. Relación estrés-depresión.....	13
2.4.3. Conducta Sexual y Corticosterona.....	14
2.5 Modelos animales de depresión.....	15
2.5.1. Modelo de depresión por administración postnatal con clomipramina.....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	24
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
7. MATERIAL Y MÉTODO.....	25
7.1. Validación del modelo animal de depresión.....	25
7.1.1 Prueba de Porsolt o nado forzado.....	27
7.1.2. Actividad motora.....	27
7.1.3. Actividad sexual.....	28
7.1.4 Curva de secreción circádica de corticosterona.....	28
7.2. Estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.....	28
7.2.1. Estimulación a través del estrés por inmersión en agua fría.....	28
7.2.2. Estimulación a través de la conducta sexual.....	29
7.2.3. Estimulación farmacológica.....	29
7.3. Sensibilidad colinérgica.....	30
7.3.1. Actividad motora.....	30
7.3.2. Temperatura rectal.....	30
7.3.3. Prueba de Porsolt o nado forzado.....	30
7.4. Determinación plasmática de corticosterona.....	31
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
9. RESULTADOS.....	32
10. DISCUSIÓN.....	47
10.1. Validación del modelo animal de depresión.....	55
10.1.1. Variaciones circádicas de corticosterona.....	60
10.2. Estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.....	66
10.2.1. Estimulación del eje HHA por actividad copulatoria.....	66
10.2.2. Estimulación del eje HHA por administración de fármacos.....	69
10.2.3. Estimulación del eje HHA por estrés agudo y crónico.....	72
10.3. Sensibilidad Colinérgica.....	76
11. CONCLUSIONES.....	82
12. PERSPECTIVAS.....	83
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
14. APÉNDICE.....	100

## ABSTRACT

The depression is a multifacetic disorder that can display an ample variety of symptoms between which are psychomotor alterations, diminution of libido etc. Patients with depression exists some signs that are marking biological for the diagnosis of the depression as the increase in the plasma levels of cortisol. On the other hand, postnatal administration of clomipramine (CLI) to rats male produces behavioral abnormalities during adulthood which closely resemble some of the symptoms observed in human depression. Therefore, this procedure has been suggested as an animal model of depression. Exist few evidences about the activity and sensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) in rats CLI. The objectives of the present study were: to determine the response of axis HPA, through the evaluation of corticosterona (C) prior to different stimuli like the application of a estresor, as acute as chronic, prior to the execution of the masculine sexual behavior (MSB) and prior to the administration of cholinergic agonists as oxotremorine (OXO) and physostigmine (PHY) in the rats treated postnatally with CLI. In addition, to evaluate the circadian activity of C and finally cholinergic sensitivity in this animal model of depression. Male pups rats Wistar were injected sc twice a day from 8 to 21 of age. Each litter received the same treatment. One group received CLI (15 mg/kg) in each injection, while Control (CON) group received saline solution. In adulthood, all subjects were submitted to the forced swim test and motor activity to evaluate to effect of postnatal clomipramine treatment. Rats CLI and CON were randomly assigned to one of following experiment: 1) Validity the animal model of depression trough to evaluate the circadian activity of C-; the measurements were made at the beginning and the middle of the phases of light and the dark. 2) Activation of HPA axis by means of stress by cold water immersion (IMS) as much of acute way (1 day) like chronic (10 days) in both phases of the cycle of light-darkness. 3) Activation of HPA axis by means of the administration of cholinergic drug as PHY (0.4 mg/kg ip) and OXO (0.4, 0.8 mg/kg ip), in both phases of the cycle of light-darkness. 4) Activation of HPA axis to trough of the MSB; previously were made four tests of spontaneous MSB. After the last test, the animals immediately were sacrificed to evaluate the plasma levels of C. 5) Evaluation of cholinergic sensitivity by means of the tests of Porsolt, motor activity, and rectal temperature prior to the administration of OXO to different doses (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/kg, ip). The postnatal treatment with CLI increased *per se* the immobility time in the test of Porsolt. In addition to alter the sexual activity, decreasing the percentage of subjects to display mounts, intromissions, ejaculations and to alter the different parameters copulatories. 1) The rats treated with CLI showed alterations in the circadic activity of C, with an increase in the levels of C in the phase of light. 2) The response to stress by IMS was dependent of the duration, as well as of time of the exhibition. Whereas acute stress elevated the levels of C in both phases of the cycle of the light-dark in both groups (CON and CLI), chronic stress by IMS only increased the levels of C in the phase of light in the rats treated with CLI. 3) The administration of PHY increased the plasma levels of C only in the phase of light in the rats treated with CLI. This same response it was observed with the administration of OXO with the dose of 0.4, whereas the dose of 0.8 increased the levels of C in both phases of the cycle of light-darkness of way similar to the group control. 4) The activation of HPA axis to the exhibition to CSM increasing the levels of C in both groups. Nevertheless this increase is smaller in the rats treated with CLI respecting the rats CON after of the exposure MSB. 5) It was not observed cholinergic hypersensitivity in the rats treated postnatally with CLI in the different behavior to evaluate, with the exception of the rectal temperature. The results shows that the postnatal treatment with CLI increases the time of immobility in the test of Porsolt, alters to the circadian activity of corticosterone and the response of HPA axis to different stimuli like the sexual behavior, stress, the administration of cholinergic drugs. Also, the administration of CLI does not induce cholinergic sensitivity.

## RESUMEN

La depresión es un trastorno multifacético que puede presentar una amplia variedad de síntomas entre los que se encuentran alteraciones psicomotoras, disminución de la libido etc. Existen además algunos signos que son marcadores biológicos importantes para el diagnóstico de la depresión como el aumento en los niveles del cortisol plasmático. Por otro lado, la administración postnatal de clomipramina (CLI) a ratas macho produce, en la edad adulta, alteraciones conductuales semejantes a los signos de la depresión endógena humana, por lo que se ha considerado un modelo animal de depresión. Existen pocas evidencias acerca de la actividad y sensibilidad del eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en las ratas CLI. Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: determinar la respuesta del eje HHA, a través de la evaluación de la corticosterona (C), ante diferentes estímulos como la aplicación de un estresor, tanto de manera aguda como crónica, ante la ejecución de la conducta sexual masculina (CSM) y ante la administración de agonistas colinérgicos como oxotremorina (OXO) y fisostigmina (Fisos) en las ratas tratadas postnatalmente con CLI, además de evaluar la actividad circádica de C y la sensibilidad colinérgica en este modelo animal de depresión.

A un grupo de ratas macho Wistar de 8 a 21 días de edad se le administró CLI (15 mg/kg sc) durante 14 días, 2 veces al día por vía subcutánea. El grupo control recibió solución salina (CON). En la edad adulta todos los animales fueron sometidos a la prueba de Porsolt y de actividad motora para corroborar el estado depresivo de las ratas CLI. Posteriormente las ratas se asignaron a cada uno de los siguientes experimentos: 1) Se validó el modelo animal de depresión mediante la evaluación de la actividad circádica de C. Las mediciones se realizaron al inicio y a la mitad de las fases de luz y de oscuridad. 2) Se estimuló el eje HHA mediante estrés por inmersión en agua fría (IMS) tanto de manera aguda (1 día) como crónica (10 días) en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. 3) Activación del eje HHA mediante la administración de fármacos colinérgicos como fisos (0.4 mg/kg ip) y OXO (0.4, 0.8 mg/kg ip), en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. 4) Se estimuló el eje HHA a través de la CSM; se realizaron previamente cuatro pruebas de CSM espontánea. Luego de la última prueba, los animales se sacrificaron inmediatamente para la determinación de C. 5) Evaluación de la sensibilidad colinérgica mediante las pruebas de Porsolt, de actividad motora, y de temperatura rectal ante la administración de OXO a diferentes dosis (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/kg, ip). El tratamiento postnatal con CLI incrementó *per se* el tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt, además de alterar la actividad sexual, disminuyendo el porcentaje de sujetos que despliegan montas, intromisiones y eyaculaciones y alterar los diferentes parámetros copulatorios. 1) Las ratas tratadas con CLI mostraron alteraciones en la actividad circádica de C, con un incremento en los niveles de C en la fase de luz. 2) La respuesta al estrés por IMS fue dependiente de la duración, así como del momento de la exposición. Mientras que el estrés agudo elevó los niveles de C en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad tanto en el grupo CON como en las ratas CLI, el estrés crónico por IMS sólo incrementó los niveles de C en la fase de luz en las ratas tratadas con CLI. 3) La administración de PHY incrementó los niveles de C sólo en la fase de luz. Esta misma respuesta se observó ante la administración de OXO con la dosis de 0.4, mientras que la dosis de 0.8, aumentó los niveles de C en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad de manera similar al grupo control. 4) La estimulación eje HHA ante la exposición a la CSM aumenta los niveles de C en ambos grupos. Sin embargo este incremento fue menor en las ratas tratadas con CLI cuando se compararon con las ratas CON después de la CSM. 5) No se observó hipersensibilidad colinérgica en las ratas tratadas postnatalmente con CLI en las diferentes conductas evaluadas, a excepción de la temperatura rectal. Los resultados mostraron que el tratamiento postnatal con CLI incrementó el tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt, alteró la actividad circádica de corticosterona y la respuesta del eje HHA ante diferentes estímulos como la conducta sexual, el estrés y la administración de fármacos colinérgicos. Asimismo, la administración de CLI en la etapa postnatal no induce sensibilidad colinérgica.

## 1. INTRODUCCIÓN

A través del tiempo el concepto sobre la depresión ha cambiado. En algún momento el término se refirió a un estado emocional de cierta duración, probablemente molesto, sin duda desacostumbrado y no era considerado patológico. En otras ocasiones significó un temperamento o carácter con un determinado tono y una determinada disposición emocional, tampoco patológicos. Otras veces fue considerada una forma de sentir con una duración relativamente corta, de tono infeliz, pero difícilmente enfermiza. Finalmente la depresión se reconoció como una enfermedad, un estado conflictivo suficientemente grave y duradero como para que se pensara en él como una seria patología, tal como actualmente se considera (Stanley, 1986). Los diferentes conceptos y las variaciones emocionales a que éstos se refieren no suponen necesariamente una enfermedad mental o un estado psicopatológico. Sólo cuando estos sentimientos se prolongan o se agravan pueden empezar a considerarse como una enfermedad, además, estos estados afectivos se acompañan de otros síntomas para que sean calificados dentro del rubro de la depresión endógena (Stanley, 1986).

Clínicamente, la depresión se clasifica en dos tipos: la depresión reactiva, cuando es originada por acontecimientos de la vida que afectan el estado de ánimo del individuo, y la depresión endógena, a la que nos referiremos en este trabajo, que se define como una depresión sin precipitante externo y generada por cambios bioquímicos en el sistema nervioso central (Mendel y Cochrane, 1968; Mendel, 1970; Neill y cols, 1990, Vogel y cols, 1990c; Kandel y Schwartz, 1991).

De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (APA, 1995), los trastornos que tienen como característica la alteración en el estado de ánimo están divididos en trastornos depresivos (depresión unipolar) y trastornos bipolares. Mientras que los trastornos depresivos (trastorno depresivo mayor, trastorno distímico y trastorno depresivo no especificado) se distinguen de los trastornos bipolares por el hecho de no presentar una historia previa de episodio maniaco, mixto o hipomaniaco. Los trastornos bipolares (p. ej. trastorno bipolar tipo I, bipolar tipo II, ciclotímico y trastornos no especificados) implican la presencia de episodios maniacos acompañados normalmente de episodios depresivos mayores (APA, 1995).

Con respecto a los modelos animales de depresión existe la dificultad práctica para discriminar entre un tipo de depresión y otro, por lo cual en este trabajo nos referiremos de manera general a la depresión endógena.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Depresión**

La depresión es un trastorno multifacético que puede presentar una amplia variedad de síntomas. De acuerdo con el DSM- IV, la característica esencial de un episodio depresivo es un período de al menos dos semanas durante el cual hay un estado de ánimo deprimido o una pérdida de placer o interés en casi todas las actividades (anhedonia). Para considerar que un sujeto padece depresión mayor debe experimentar al menos cuatro síntomas de una lista que incluye cambios de apetito o de peso, alteraciones del sueño y de la actividad psicomotora; falta de energía; sentimiento de culpa; dificultad para pensar, concentrarse o tomar decisiones; pensamientos o ideaciones de muerte, planes o intentos suicidas. Los síntomas deben mantenerse la mayor parte del día, durante al menos dos semanas.

El sujeto deprimido, al cursar un episodio depresivo, con frecuencia se describe como triste, desesperanzado, desanimado o como estar en un pozo. Al principio la tristeza puede ser negada, pero más tarde el sujeto puede referir que está a punto de llorar. Generalmente hay pérdida de interés y de capacidad para experimentar placer, refiriéndose al sentimiento de estar menos interesado en sus aficiones y de haber perdido el interés o haber dejado de disfrutar actividades que antes consideraba placenteras. En algunos sujetos además se manifiesta una reducción del deseo sexual. La alteración más asociada al sueño es el insomnio y con menos frecuencia los sujetos se quejan de exceso de sueño en forma de un sueño prolongado nocturno o de un aumento del sueño diurno. Entre los cambios psicomotores se incluyen agitación o baja actividad, que deben ser lo bastante graves como para ser observables por los demás y no representar una sensación subjetiva. Es habitual además que el sujeto tenga falta de energía, refiriéndose a ello como una fatiga persistente sin haber hecho ejercicio.

Existen además algunos signos que no se presentan sistemáticamente, sin embargo son un apoyo importante para el diagnóstico de la depresión, por ejemplo el avance de fase en algunos ritmos circadianos, el aumento en los niveles del cortisol plasmático e incapacidad de la dexametasona para suprimirlo (Gibbons y McHugh, 1962; Holsboer 1983).

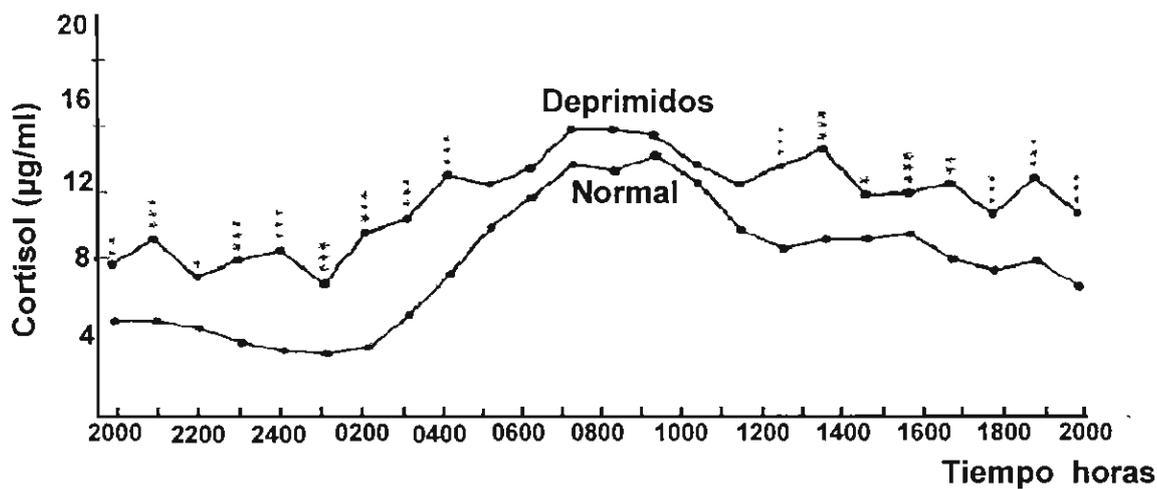
Una herramienta importante para el diagnóstico de la depresión es la polisomnografía que frecuentemente incluye en los pacientes con depresión: 1) alteraciones de la continuidad del sueño, como una latencia de sueño prolongada, mayor frecuencia de despertares intermitentes y despertar precoz; 2) reducción de los movimientos oculares lentos en los estadios 3 y 4 del sueño (NMOR), con un cambio de la actividad de ondas lentas más allá del primer periodo NMOR; 3) disminución de la latencia de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR); 4) aumento de la actividad de la fase MOR y 5) aumento de la duración del sueño MOR al principio de la noche (APA, 1995).

La hipofunción de más de una vía nerviosa, como la noradrenérgica, colinérgica, dopaminérgica y la serotoninérgica, se han considerado como la principal causa de la depresión (Van de Kar, 1989), ya que varios de estos sistemas de neurotransmisión participan tanto en la expresión como en la regulación de varias conductas que acompañan a los trastornos afectivos (Sachar 1985).

## **2.2. Aspectos neuroquímicos y neuroendocrinos de la depresión**

Durante la última mitad del siglo XX, las investigaciones se enfocaron en la regulación biológica de la conducta a través de la interrelación recíproca de dos sistemas: el nervioso y el endocrino. Ambos sistemas coordinan conductas complejas y procesos fisiológicos relevantes para la supervivencia (Stokes y Sikes, 1987; Philip y cols, 1988). Cuando se desbalancea esta interrelación, se producen trastornos del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en pacientes con depresión endógena. Tal alteración se caracteriza por elevados niveles del cortisol basal, de una magnitud semejante a los observados en pacientes con la enfermedad de Cushing (Gold y cols, 1984, 1986; Plotsky y cols, 1998). De hecho la disfunción del eje HHA produce alteraciones en la variación diurna en pacientes deprimidos. Muestras de cortisol tomadas con

intervalos de 20 minutos durante 24 horas, revelan que los pacientes deprimidos secretan más cortisol que con los sujetos control, aún durante la noche cuando la glándula adrenal se encuentra quiescente en sujetos normales, así la curva de variación diurna en la secreción de cortisol aparece aplanada, debido al incremento en la actividad del eje HHA durante la tarde (Gold y cols, 1988a). La hipersecreción de la ACTH y los glucocorticoides basales, así como las pruebas de función neuroendocrina, indican una alteración profunda en el sistema HHA en los pacientes que sufren depresión severa (Figura 1, Barden y cols, 1995). Tal alteración se considera un marcador biológico al confirmarse una estrecha correlación en un gran número de pacientes deprimidos, además de coexistir con otras anormalidades del eje HHA estado-dependientes, en particular la resistencia a la prueba de supresión por la administración sistémica de dexametasona (Stokes, 1966; Carroll y cols, 1968).



**Figura 1.** Niveles de cortisol en sujetos normales y pacientes con depresión.

Diferentes líneas de investigación sugieren que el hipersecretorismo es un defecto funcional en el hipotálamo o en otros centros superiores, que resulta de la hipersecreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRF) endógena (Gold y cols, 1988a, 1988b). Una de las evidencias importantes sugiere que la respuesta de la adrenocorticotropina (ACTH) a la hormona CRF exógena está disminuida en individuos con depresión y correlaciona negativamente con los niveles basales de glucocorticoides. Esto indica que las células

corticotrópicas hipofisiarias se restringen apropiadamente por la retroalimentación negativa de los glucocorticoides (Gold y cols, 1984, 1986; Nemeroff y cols, 1984; Maes y cols, 1995). Por otro lado, diversos estudios han determinado la participación de los sistemas de neurotransmisión en la liberación del CRF en el núcleo paraventricular. La noradrenalina y la adrenalina estimulan la liberación de este péptido a través de los receptores  $\alpha$ -1-adrenérgicos (Calogero y cols, 1988). La acetilcolina y la serotonina son también mediadores que participan en la liberación del CRF. Por otra parte, el ácido-gamma-aminobutírico (GABA), el sistema de péptidos opioides, la ACTH y los glucocorticoides actúan como inhibidores de su secreción (Calogero y cols, 1988). Considerando lo anterior, es posible que los diferentes sistemas de neurotransmisión estén involucrados en la hiperfunción del eje HHA.

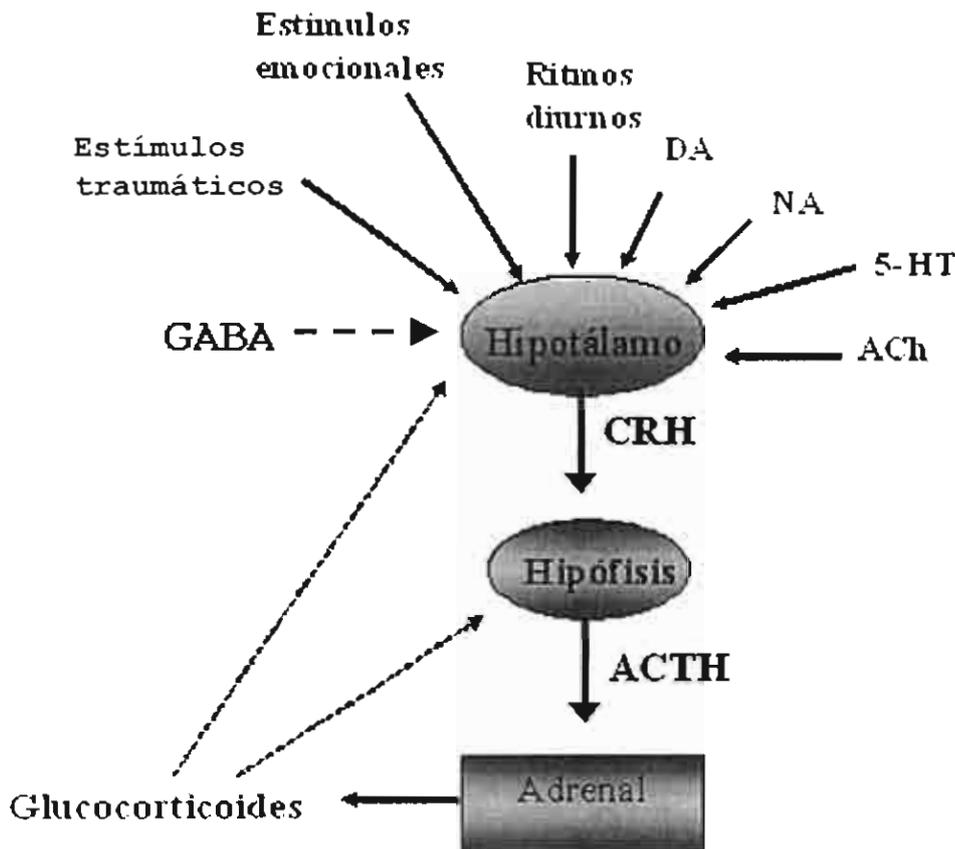
El sistema serotoninérgico, es uno de los sistemas que tiene gran importancia en la etiología de la depresión. Numerosas evidencias indican que la disfunción del sistema serotoninérgico puede inducir o contribuir a la severidad de los trastornos afectivos, como mediador excitador de la liberación de CRF, posiblemente a través de los receptores 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>1c</sub> (Van de Kar, 1989; Calogero y cols, 1993). Los estudios en animales de experimentación y en seres humanos, muestran una relación recíproca entre el eje HHA y la actividad serotoninérgica: el incremento en la actividad de los glucocorticoides disminuye la disponibilidad de L-triptófano, precursor de la serotonina (Maes y cols, 1990; De Kloet y Reul, 1987); incrementar el número o la sensibilidad de los receptores 5-HT<sub>2</sub> en la corteza cerebral, así como las respuestas conductuales que media este receptor (Kuroda y cols, 1992) e inducir además, la desensibilización del receptor 5-HT<sub>1a</sub> (Haleem, 1992; Mendelson y McEwen, 1992; Young y cols, 1992). El efecto estimulante de las vías serotoninérgicas sobre la actividad del eje HHA, incluye la activación de la secreción de CRH a través de los receptores 5HT<sub>1a</sub> y 5-HT<sub>2/5-HT1C</sub> (Calogero y cols, 1993), mientras que la arginina estimula la liberación de ACTH a través de los receptores 5-HT<sub>2/5-HT1c</sub> (Calogero y cols, 1993). La serotonina juega también un papel importante en la retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre la función del eje HHA: una disminución de la serotonina en el hipocampo atenúa la retroalimentación negativa sobre el eje HHA a través de disminuir el número de receptores a glucocorticoides y/o a mineralocorticoides (Brady y cols, 1991, 1989).

Por otro lado, Risch y cols (1983) sugieren la participación del sistema colinérgico en la hipersecreción de cortisol. Diversas evidencias indican que las drogas colinomiméticas inducen la liberación CRH y eleva los niveles de ACTH y cortisol en animales (Bugajski y cols, 1998a, 1998b, 1991, Calogero et al 1989; Hasey y Hanin, 1990; Steiner y Graham-Smith, 1980; Weinfeld y cols, 1989), en sujetos normales (Risch y cols, 1981a) y en pacientes con depresión (Risch y cols, 1981b, 1982; Rubin y cols, 1999; Peskind y cols, 1995). La infusión de fisostigmina y arecolina incrementa significativamente los niveles de ACTH, cortisol y  $\beta$ -endorfina en pacientes normales y los que cursan con trastornos psiquiátricos (Risch y cols, 1981, 1983; Calogero y cols, 1989). También, la fisostigmina revierte el efecto de la prueba de la dexametasona en sujetos normales, lo que sucede en algunos individuos deprimidos (Doerr y Berger, 1983). En este contexto, se ha determinado que las drogas colinomiméticas (nicotina, oxotremorina, arecolina, fisostigmina, carbacol, etc.) pueden elevar la secreción de ACTH y corticosterona en animales de laboratorio (Bugajski y cols, 1998a, 1998b; Calogero et al 1989; Fuxe y cols, 1990; Hasey y Hanin, 1990; Matta y cols, 1998; Steiner y Graham-Smith, 1980; Weinfeld y cols, 1989).

### **2.3 Eje hipotálamo hipófisis-adrenal (HHA)**

El eje HHA se ha asociado con la depresión porque los pacientes deprimidos tienen un incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona. Se sabe que la secreción de corticosterona de la corteza adrenal está bajo el control de la ACTH y esta a su vez es regulada por CRH y otras secreciones del hipotálamo (Yates y cols, 1980; Munk y cols, 1984). Existen tres mecanismos que mantienen los niveles de glucocorticoides plasmáticos estables en todo momento, tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés. El primero de estos mecanismos, es el ritmo circádico de actividad basal regulado por el núcleo supraquiasmático (Bunney y Bunney, 2000). El segundo es la compleja respuesta del sistema HHA inducida por estrés, que involucra vías aferentes de numerosas regiones cerebrales, que incluyen la inervación noradrenérgica del grupo de células A1 y A2 del tallo cerebral y el locus coeruleus pontino (Szafarczyk y cols, 1985), la amígdala (Beaulieu y cols, 1987; 1989), la corteza cerebral y el hipocampo (Jacobson y Salpolsky, 1991). El tercer mecanismo está dado por la

acción inhibitoria que ejercen los esteroides adrenales a través de varias asas de retroalimentación que regulan la secreción de glucocorticoides (Munk y cols, 1984). Así, los glucocorticoides actúan directamente sobre la hipófisis e inhiben la secreción de ACTH, y sobre el hipotálamo para suprimir la liberación de CRH. Además este circuito tiene efectos inhibitorios causados por la ACTH, la  $\beta$ -endorfina y el CRH sobre las neuronas CRH (Ver figura 2, Kelle-Wood y Dallman, 1984; Munk y Guyre, 1986).



**Figura 2.** Representación esquemática de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. El CRH es el efector principal, en últimas instancia de, la secreción de glucocorticoides. La activación de las neuronas secretoras del CRH parece estar regulada por vías centrales inhibitorias y excitadoras centrales, así como por múltiples asas de retroalimentación negativa. Las líneas continuas representan efectos estimuladores y las líneas punteadas representan efectos inhibitorios. CRH= Hormona liberador de la corticotropina; ACTH= Hormona adrenocorticotrópica; DA= dopamina; NA= noradrenalina; 5-HT= serotonina; ACh= acetil colina; GABA= ácido gama amino butírico.

Las acciones de los glucocorticoides sobre el sistema nervioso central están mediadas por dos subtipos de receptores intracelulares (Reul y De Kloet, 1985), el receptor a mineralocorticoides y el receptor a glucocorticoides. Los receptores a mineralocorticoides se encuentran principalmente en las neuronas del septum y del hipocampo, su función es modular la respuesta a estímulos ambientales y emocionales, con los consecuentes cambios en la conducta y en la actividad del eje HHA (Reul y De Kloet, 1985). Los receptores a glucocorticoides se encuentran en altas concentraciones en el hipotálamo, particularmente en las neuronas-CRH del núcleo paraventricular. Cambios en la concentración plasmática de corticosterona alteran la ocupación relativa de los receptores a mineralocorticoides y a glucocorticoides (Reul y de De Kloet, 1985). Así, los niveles bajos de corticosterona activan principalmente a los receptores a mineralocorticoides cerebrales y los niveles altos, como ocurre durante el pico circadiano o durante el estrés, activan a los receptores a glucocorticoides, además de ser responsables del efecto de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre el eje HHA (Sapolsky y McEwen, 1985, Sapolsky y cols, 1986).

En los seres humanos, así como en otras especies animales, la actividad del eje HHA varía de manera circádica. En el humano, los niveles de cortisol se encuentran en su máximo (12  $\mu\text{g/ml}$ ) al amanecer y después declinan progresivamente hasta llegar al mínimo (4  $\mu\text{g/ml}$ ) cuando comienza la noche (Atcheson y Tyler, 1975; Horrock y cols, 1990). Las variaciones circádicas observadas en los glucocorticoides se deben a la ritmicidad circadiana del eje HHA (Engeland y cols, 1977) y se ha demostrado que la sensibilidad de la corteza adrenal a la ACTH varía también de manera circádica (Dallman y cols, 1978; Amsterdam y cols, 1989). Asimismo, la liberación de ACTH a diferentes estímulos estresantes en las ratas es mayor al inicio de la fase de luz (cuando la actividad espontánea es mínima), y la respuesta es mínima al inicio de la fase de oscuridad (cuando la actividad espontánea es máxima; Engeland y cols, 1977). Además, la sensibilidad de los corticotropos hipofisarios a los corticosteroides en la rata también cambia con la hora del día, siendo mayor en la mañana (cuando los niveles están en el mínimo) y menor en la noche (cuando los niveles están en el máximo; Akana y cols, 1986).

#### 2.4. Concepto de estrés

En los años 30 del siglo anterior, Hans Selye (1936) observó que cuando el organismo es desviado de su estado normal de reposo, sufre una condición a la que denominó estrés, como una respuesta a estímulos adversos (Selye, 1936). Esta desviación puede ser mínima o tan acentuada que puede poner en riesgo la vida (Selye, 1950). Selye sostenía que una variedad de estímulos adversos (estresores) tales como las lesiones quirúrgicas, las heridas, el ejercicio muscular, las toxinas, la exposición al frío o al calor, así como la privación de alimento, provocan en el organismo una respuesta inespecífica llamada estrés, que se relaciona con el desarrollo de estados patológicos (Selye, 1936). Selye observó que en los animales la respuesta al estrés se caracterizaba por el aumento invariable en los niveles de corticosteroides en la sangre, independientemente de la naturaleza del estresor. Propuso que esta respuesta inespecífica de estrés constituye la base de un cuadro general de estrés, al que llamó síndrome general de adaptación, que resulta de un cúmulo de respuestas biológicas inespecíficas. El síndrome se desarrolla en tres etapas: la primera etapa se caracteriza por una reacción de alarma inicial, que depende de una descarga simpática-adrenomedular inmediata. La segunda etapa es la de resistencia, caracterizada por la activación del eje HHA, a través de la secreción del factor liberador de la corticotropina en el hipotálamo (Guillemin y Rosenberg, 1955). En la tercera etapa se desarrollan diferentes patologías asociadas con el estrés prolongado, que pueden llevar al individuo a la muerte (Selye, 1946).

La respuesta adaptativa al estrés parece depender de la calidad (físico o emocional), de la intensidad y de la duración (agudo o crónico) del estímulo, así como de la constitución y estado del organismo (De Wied, 1980). Entre los estresores físicos están las alteraciones del medio interno (anoxia, hipoglucemia, etc.) o condiciones externas extremas (frío, calor), así como estresores mixtos (estímulos nocivos, enfermedades, lesiones, ejercicio). Los estresores psicológicos afectan la emoción, produciendo miedo, ansiedad o frustración y se encuentran entre los activadores más potentes del eje HHA (Levine y cols, 1972; Mason, 1968; Selye, 1950). Los estresores más utilizados en la investigación científica son el ejercicio, la inmovilización, la exposición al frío, la inmersión en agua, los choques eléctricos, la privación de alimento, anestesia y la exposición a situaciones novedosas. Todos estos estresores activan

de manera efectiva al eje HHA.

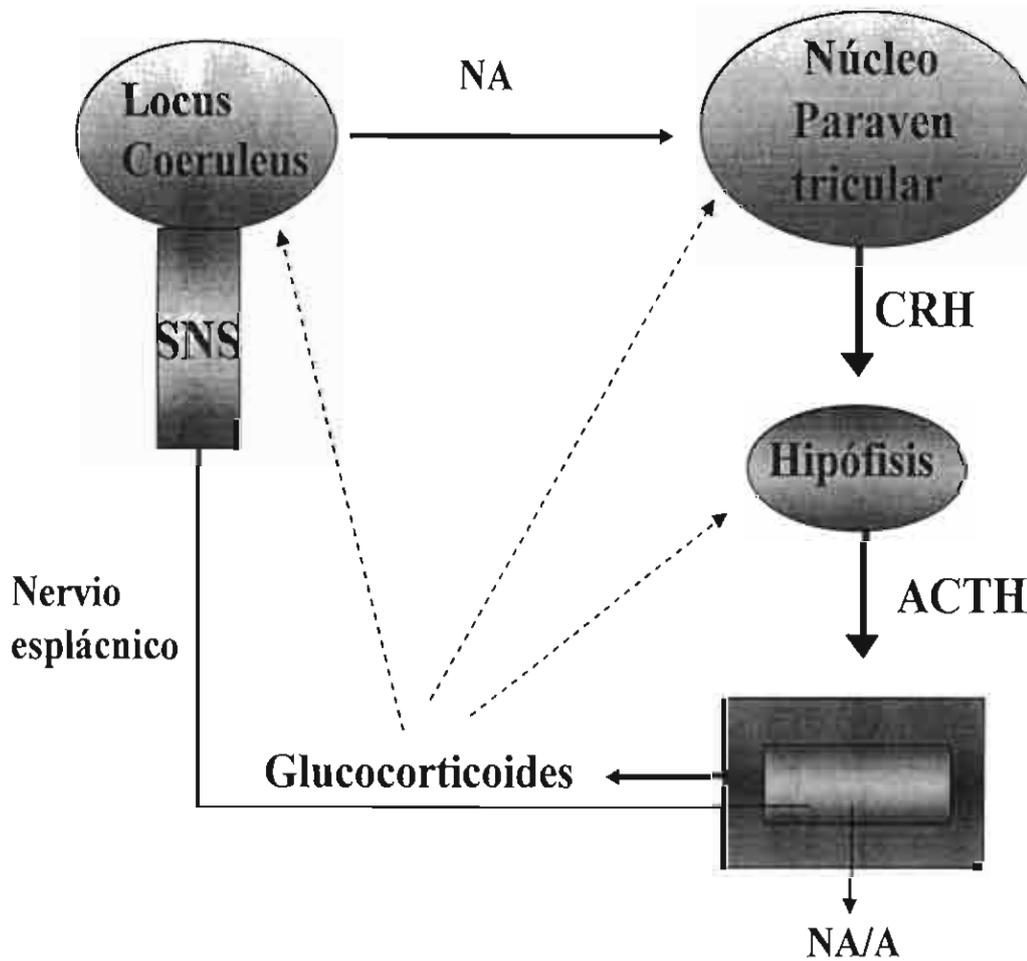
La teoría contemporánea en la biología del estrés conceptualiza un sistema de estrés integrado por estructuras neuroanatómicas que funcionan para provocar cambios conductuales, fisiológicos y bioquímicos dirigidos al mantenimiento de la homeostasis (Chrousos y cols, 1988). La respuesta del organismo durante el estrés tiene componentes conductuales, autonómicos y endocrinos que involucran al sistema nervioso central, al sistema nervioso simpático, a la médula adrenal, así como al eje HHA, que actúan coordinadamente para regular las funciones homeostáticas y conductuales de los organismos (Tiders y cols, 1982) y poder así neutralizar los efectos nocivos de los estresores (Gold y cols, 1988a; 1988b).

#### **2.4.1. Respuesta al estrés.**

Los mamíferos, incluido el hombre, han desarrollado un complejo sistema cuya principal función es mantener la homeostasis, tanto en estado de reposo como en estados de estrés. Este sistema está compuesto por un mecanismo hormonal y un mecanismo neural. El mecanismo hormonal, según Selye, actúa en forma inespecífica y es independiente cualitativamente del estresor que lo activa. Los estresores disparan una cascada de eventos humorales, que llevan a la liberación del CRH y de la arginina-vasopresina (AVP) en la circulación portal que abastece a la hipófisis anterior. La AVP potencia la acción de la CRH en las células de la hipófisis anterior, promoviendo la síntesis y liberación de los productos de la proopiomelanocortina, como las endorfinas y la ACTH. La base esencial de este mecanismo hormonal es la descarga de grandes cantidades de ACTH, la cual estimula la liberación de las hormonas corticosteroides (cortisol o corticosterona) por las glándulas adrenales. El nivel de corticosteroides se eleva en respuesta a estresores como el frío, la inmovilización, la inmersión en agua fría, la privación de alimento, las hemorragias, etc.

El mecanismo neural interviene en procesos de adaptación aguda. En este mecanismo, el estrés actúa sobre el hipotálamo, ya sea directa o indirectamente y, desde sus centros vegetativos, descienden estímulos a través de los nervios. Por medio de los nervios esplénicos llegan a la médula adrenal, donde estimulan la salida hacia la sangre de adrenalina (A) y

noradrenalina (NA). Estas hormonas generan un incremento de glucosa en sangre, vasoconstricción e hipertensión, entre otros efectos. Durante el estrés la A y la NA son liberadas a la circulación general y la actividad de las enzimas que regulan la biosíntesis de catecolaminas es estimulada. Por lo anterior se dice que los sistemas simpático general y simpaticomedular son elementos críticos en la integración de la respuesta fisiológica de un organismo a una amplia variedad de estresores (figura 3; Mason, 1968).



**Figura 3.** Interrelación funcional del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal con el sistema locus coeruleus-noradrenalina. Estos son los principales efectores centrales de la respuesta de estrés. En la periferia, ambos sistemas actúan a través de los glucocorticoides de la corteza adrenal y de las catecolaminas de la médula adrenal. Se cree que los glucocorticoides regulan ambos sistemas de la respuesta de estrés para evitar las consecuencias de una exposición prolongada o excesiva. Las líneas continuas representan los efectos estimuladores y las líneas punteadas los efectos inhibidores. CRH= hormona liberadora de corticotropina; ACTH= hormona adrenocorticotrópica; SNS= sistema nervioso simpático; A= adrenalina; NA= noradrenalina.

La regulación nerviosa central de esta respuesta involucra componentes del sistema nervioso central de estrés en la corteza cerebral, el sistema límbico, el hipotálamo y el tallo cerebral. Durante el estrés agudo por ejercicio físico, inmovilización, inmersión en agua, se incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, con la consiguiente liberación de NA hacia diferentes áreas del cerebro, como son la corteza cerebral, el sistema límbico, el hipotálamo y el tallo cerebral (Stanford, 1993). Mientras que en situaciones de exposición crónica a un mismo estresor provoca cambios fásicos en los niveles de catecolaminas. En ratas sometidas a inmovilización diariamente (De Turk, 1980), a estrés por frío (Ostman-Smith, 1979) o a choques eléctricos (Konarska, 1989), se han observado cambios fásicos en los niveles de catecolaminas plasmáticas, existiendo primero una rápida elevación, para después decaer rápidamente aún antes de que el estrés termine. Este pico inicial disminuye conforme pasan los días en que los animales son expuestos al estresor. Esto elimina la posibilidad de que los cambios observados por efecto de la exposición repetida de un estresor, se deban a una acumulación de catecolaminas. Por otro lado, esto puede estar reflejando un mecanismo de adaptación, aunque el fenómeno se da en 3 a 4 semanas de exposiciones diarias al estresor, sería mucho tiempo si se compara con el necesario para acelerar el transporte de materiales para inducir la síntesis de catecolaminas. Además, la exposición repetida al frío, por ejemplo no previene el pico de elevación de catecolaminas periféricas ante una situación aguda de estrés por nado forzado. Todo lo anterior sugiere que existe una atenuación de largo plazo en la liberación de catecolaminas cuando el estresor es aplicado de manera repetida.

Estos dos mecanismos participan en la respuesta adaptativa del estrés, que involucra una redireccionalización no solo energética sino también conductual. La primera, que es la adaptación periférica, se extiende como una provisión de la energía necesaria para hacer frente a los estresores e involucradas una elevación de los sustratos energéticos desde los sitios de almacenaje a la circulación y paralelamente, cambios en la actividad cardiovascular y pulmonar, que incluyen un incremento en la tasa cardíaca, de la presión arterial y de la actividad respiratoria (Yates y cols, 1980). En esta función actúan, los glucocorticoides, la A y la NA,

para inhibir, por un lado, la recaptura de glucosa, el almacenaje de grasas y la síntesis de proteínas y estimular, además, la liberación de sustratos energéticos, incluyendo glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres desde el músculo, el tejido adiposo e hígado (Yates y cols, 1980). Por otro lado, la adaptación conductual puede verse como la facilitación de vías neuronales que permitan al organismo afrontar mejor la situación estresante. Esta respuesta incluye un aumento cognitivo y sensorial (Chrousos, 1988), un incremento de la alerta, aumento de la memoria selectiva (Bohus y cols, 1983), analgesia inducida por estrés (Terman y cols, 1984). Simultáneamente, se suprimen la ingestión, el crecimiento, la reproducción y el sistema inmune (Keller y cols, 1981; Sirinathsini, 1983).

La capacidad del organismo para regular la compleja respuesta de estrés apropiadamente, es tan importante como para iniciarla. La activación crónica de los procesos catabólicos de la respuesta de estrés, arriba mencionados, puede ser destructiva y patogénica para el individuo. Cuando el estrés se prolonga indefinidamente puede provocar consecuencias metabólicas (miopatías, fatiga, obesidad, cambios en glicemia etc.), cardiovasculares (hipertensión, arteriosclerosis, etc.), comprometer el crecimiento y reparación de tejidos, provocar úlcera péptica, suprimir la reproducción (impotencia, amenorrea, etc.). En este mismo contexto, los individuos con alta sensibilidad ante el estrés pueden presentar manifestaciones de mala adaptación dentro de un amplio rango de enfermedades de gran impacto emocional y socioeconómico que afectan la neuropsicofisiología del organismo, por ejemplo, trastornos de ansiedad, depresión, alcoholismo, abuso de sustancias, etc. Qué tanto y en qué combinación el estado particular del individuo puede hacerlo vulnerable, probablemente dependa de la genética y de la memoria del sistema de estrés.

#### **2.4.2. Relación estrés-depresión.**

Generalmente, la respuesta ante el estrés al estrés es una duración limitada y va acompañada de efectos antianabólicos, catabólicos e inmunosupresivos temporalmente benéficos y de consecuencias no adversas (Selye, 1946; 1950). Por el contrario, la activación crónica y excesiva del sistema de estrés puede conducir al síndrome general de adaptación descrito por Selye en 1936. Él sugirió que dicho síndrome crónico y severo podría cursar con anorexia, pérdida de peso,

depresión, hipogonadismo, úlcera péptica e inmunosupresión (Selye, 1946; 1950). Se ha propuesto que un factor crítico en la patofisiología de diversos síndromes psiquiátricos, tales como la depresión, se originan a partir de anomalías en la regulación de la respuesta de estrés generalizada, lo que resulta en la hipersecreción de CRH o de las catecolaminas centrales. Se ha propuesto que existen alteraciones en algunas de las asas de retroalimentación negativa del eje HHA, así como del sistema simpático adreno-cortical (Gold y cols, 1988a, 1988b).

Se ha sugerido que la depresión es producto de una alteración en la regulación de la respuesta al estrés, en la cual los mecanismos que limitan o contienen esta respuesta dentro de niveles normales se encuentran inhibidos permitiendo que la respuesta al estrés permanezca aún cuando el estresor que la desencadenó no este presente. Por consiguiente, las manifestaciones cardinales de la depresión, que son la hiperactivación y redireccionalización de la energía serían los extremos de las manifestaciones clásicas de la respuesta generalizada de estrés. Mientras que la adecuada contra regulación en la respuesta de estrés normal es adaptativa y temporalmente limitada, en la depresión es cuantitativa y cualitativamente diferente, siendo maladaptativa y prolongada. Así la activación se vuelve ansiedad y activación disfórica y la vigilia se convierte en hipervigilancia e insomnio. La disforia observada en la depresión puede representar taquifilaxis del sistema mesocorticolímbico por la activación crónica del sistema de estrés. Además, disminuye el énfasis en la alimentación y la reproducción, los cuales son adaptativos en el contexto de la respuesta de estrés, volviéndose mal adaptativo al mantener la anorexia, el hipogonadismo y la disminución de la libido, que son distintivos de la depresión. En esta enfermedad el eje HHA y el sistema nervoso simpático parecen estar crónicamente activados (Nemeroff y cols, 1984, 1995).

#### **2.4.3. Conducta Sexual y Corticosterona.**

Se ha demostrado que el eje HHA se activa en respuesta a situaciones de extraordinaria demanda tales como el estrés y la conducta sexual (Mason, 1972). La influencia de las hormonas sobre la conducta sexual masculina (CSM) es bien conocida, la importancia de la conducta copulatoria en disparar la respuesta endocrina en machos es de gran importancia. Hay evidencia de que la cópula produce incremento en los niveles de prolactina y de la hormona del crecimiento en el búfalo

(Convey y cols, 1971) y de testosterona en la rata macho (Graham y cols, 1980; Retana-Márquez y cols, 1998). De igual manera, diversos estudios reportan un incremento en los niveles plasmáticos de cortisol en el caballo (Colborn y cols, 1991; Rabb y cols, 1989; Tamanini y cols, 1983) y de corticosterona en la rata macho después de la actividad sexual (Szechtman y cols, 1974; Retana-Márquez y cols, 1998). En este sentido, se ha pretendido determinar la importancia del eje HHA en la actividad sexual y el papel que la corticosterona desempeña. Algunos estudios han propuesto que el eje se activa durante condiciones de elevada motivación conductual (Mason, 1972). De hecho, se ha sugerido que la liberación de ACTH produce excitación sexual (Bertolini y cols, 1969). Existen evidencias también del incremento de la actividad del eje HHA en situaciones que se clasifican como aversivas (Mason, 1972). El grupo de Bronson y cols. (1982) proponen que la activación sexual desempeña un papel importante en la respuesta endocrina. En el caso del ratón macho, se observa que la corticosterona se incrementa en relación directa a la activación sexual *per se*. Sin embargo, estudios realizados por el grupo de Szechtman y cols (1974) en la rata macho sugieren que el incremento en los niveles de corticosterona plasmática después de la actividad copulatoria no es debido a la activación sexual sino a una baja habituación a la novedad de introducir hembras receptivas en la caja. Por último, un estudio realizado en el humano se muestra una activación del eje HHA en respuesta a películas eróticas (Kling y cols, 1972). De acuerdo a todo lo anterior ha sido difícil dilucidar el papel que desempeña el sistema HHA en la actividad sexual, como en la activación sexual en la rata macho.

Por otra parte, debido a las dificultades para realizar estudios en seres humanos relacionados con enfermedades mentales, ha sido necesario utilizar modelos animales que reproduzcan el cuadro clínico del trastorno a estudiar para realizar trabajos de experimentación para determinar la etiología, así como para buscar los posibles procedimientos terapéuticos.

## **2.5 Modelos animales de depresión**

La definición de modelos animales puede ser conceptualizada como preparaciones experimentales desarrolladas en una especie para estudiar los fenómenos que ocurren en otras. Así, por definición, cualquier modelo no es igual al proceso u objeto “modelado”. Los modelos

animales de psicopatologías humanas buscan desarrollar síndromes en animales que se reflejen en humanos para estudiar los aspectos de la psicopatología humana (Willner, 1991). Se han desarrollado algunos principios generales para elaborar los diferentes tipos de modelos conductuales, que permiten determinar cómo el modelo puede ser analizado dentro de las neurociencias, la psicología y la psicofarmacología. Hay tres tipos de modelos conductuales que corresponden a cada una de estas disciplinas: los que pueden usarse para estudiar la función cerebral, los utilizados para determinar la acción de drogas. Estos tres tipos de modelos pueden ser referidos como bioensayos conductuales, simulaciones y pruebas de cernimiento o tamizado (Willner, 1991).

En las pruebas de cernimiento investigan nuevos agentes psicotrópicos y se basan en la acción de las drogas conocidas a través de dos tipos de estrategias: una para desarrollar drogas identificando agentes que tienen un tipo de acción clínica como los neurolépticos, antidepresivos o ansiolíticos. Las pruebas de esta clase son capaces de identificar drogas clínicamente efectivas que varían en su estructura química. Otra de las estrategias es identificar la acción bioquímica como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los bioensayos conductuales permiten analizar el estado funcional de un sistema fisiológico. Uno de los usos del ensayo conductual es estudiar los mecanismos responsables de los cambios en la función cerebral que resulta de la administración de drogas, lesiones cerebrales u otras manipulaciones experimentales.

Por último, los modelos animales que reproduzcan los hallazgos bioquímicos, fisiológicos o anatómicos son una herramienta para el análisis de distintas opciones terapéuticas en el humano. Las simulaciones de conductas humanas permiten, como el nombre lo indica, poder simular un síntoma, un grupo de síntomas o el trastorno completo. Existen diferentes métodos para reproducir un trastorno, ellos incluyen daño cerebral, selección de sublíneas como puede ser las características intrínsecas de una cepa en particular; isogénicas, transgénicas, aplicación de fármacos, separación social y las debidas a la edad (Willner, 1991).

Por otro lado, los modelos animales han sido herramientas para el estudio de conductas anormales en los trastornos afectivos, por lo cual cualquier modelo animal de trastornos psicopatológicos se evalúa generalmente tomando tres criterios que se han orientado para cada modelo animal de depresión: validez predictiva, teórica y de apariencia (Willner, 1984, 1991). Cabe mencionar que cada modelo propuesto tiene en mayor o menor medida cada uno de los tipos de validez propuestos.

La validez predictiva se refiere a la capacidad del modelo para detectar fármacos con eficacia terapéutica. Esto es, que el modelo permite identificar correctamente diversos tratamientos farmacológicos antidepresivos sin producir errores por falsos positivos y falsos negativos y correlacionar la potencia de tales sustancias con su posible potencia clínica. Por lo que corresponde a la validez teórica, ésta será mayor cuanto más similares sean los fundamentos teóricos en el modelo y con la condición modelada. Esta correlación debe ser homóloga y debe ser interpretada sin ambigüedad. Por último la validez de apariencia consiste en la similitud fenomenológica entre el modelo y la depresión en sus múltiples aspectos. En general, esto se refiere a la medida en que el modelo animal propuesto reproduce la apariencia del cuadro depresivo que se presenta en los seres humanos.

A través del tiempo se han ido generando modelos animales que cumplen en mayor o menor medida, con los requerimientos que implican cada validez y que tienen gran relevancia en el estudio de la depresión. Uno de los primeros modelos que se implementaron fue el del efecto de la reversión de la reserpina (Costa y cols, 1960), originando ptosis, hipotermia y catalepsia. Tales efectos se revierten con la administración específica de antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO). Este modelo se considera que presenta la validez predictiva, sin embargo, presenta problemas para detectar nuevos fármacos con actividad antidepresiva.

Otro de los modelos que más interés ha suscitado en la detección de fármacos con actividad antidepresiva es el modelo desarrollado por Roger Porsolt en los años setenta (1977, 1979, 1981). La prueba de nado forzado consiste en colocar a la rata en un cilindro de vidrio

(34 cm de altura x 16 cm de diámetro) lleno de agua hasta una altura de 15 cm. durante 15 minutos. En los primeros minutos la rata presenta una actividad exploratoria donde salta, husmea las paredes, bucea explorando el fondo con la intención de escapar de tal situación. Después de unos minutos, esta actividad cesa y la rata adopta una posición característica: erguida sobre las patas traseras y la cola, recarga una o ambas extremidades anteriores en la pared del cilindro y mantiene la cabeza levantada apenas arriba de la superficie del agua. El tiempo que dura esta inmovilidad es fácil de cuantificar. La administración sistémica de fármacos que tienen propiedades antidepresivas (tricíclicos, atípicos, IMAOs) reducen el tiempo de inmovilidad (Porsolt y cols, 1977, 1979, 1981). Con esta prueba, se han cernido una gran cantidad de drogas y los resultados apoyan la idea de que este modelo tiene un gran potencial predictivo en eficacia terapéutica (Porsolt, 1981; Borsini y cols, 1988). Además, en los últimos años, este modelo se aplica a ratas que han sido manipuladas para convertirlo en alguno de los modelos animales de depresión que reproducen algunos de los síntomas de la depresión; se ha corroborado que el tiempo de inmovilidad en esta prueba está en relación directa con los estado de depresión (Porsolt y cols, 1979; Velázquez-Moctezuma y Díaz Ruiz, 1992).

Existen también modelos animales que pretenden simular uno o varios de los signos de la depresión. Algunos de ellos pueden considerarse como prueba de cernimiento para nuevos fármacos antidepresivos. Partiendo del cuadro clínico de la depresión, solo ciertos síntomas pueden modelarse en animales. Entre ellos están, la actividad locomotora, que en la gran mayoría de los casos tiende a disminuir, los trastornos del sueño, del apetito, disminución de la interacción social y por último disminución de la conducta sexual y la respuesta a estímulos recompensantes (Willner, 1984; Velázquez-Moctezuma, 1994).

La mayoría de los modelos animales de depresión involucra conductas anormales generadas por estrés. Diversas propuestas teóricas se han desarrollado para explicar el efecto etiológico del estrés sobre la depresión. (Depue y Monroe, 1979; Anisman y Zacharko, 1982) y apoyan la hipótesis de que, situaciones estresantes, comúnmente son capaces de disparar un episodio depresivo. De estos modelos el más conocido es el propuesto por Seligman (1975) en

perros y subsecuentemente se extiende a un gran número de especies, incluyendo al humano. Seligman propuso el modelo llamado de desamparo aprendido (helplessness) observando conductas alteradas como disminución de las conductas apetitivas, de la actividad motora, así como de la agresividad. Tales síntomas son revertidos por antidepresivos, incluyendo los tricíclicos, los IMAOs, los antidepresivos atípicos y hasta los choques electroconvulsivos (Dorworth y Overmeir, 1977; Leshner y cols, 1979; Petty y Sherman, 1980).

Existen otros modelos de estrés que tienen la dificultad básica de que los animales tienden a adaptarse. El modelo de estrés crónico impredecible propuesto por Kennett (1986) es uno de los más conocidos y apoya la hipótesis de que en la vida de un sujeto se presentan grandes eventos de dolor o de estrés que solo contribuyen de manera importante a la generación de la depresión si son mantenidos por un largo periodo de tiempo. El modelo consiste en exponer a ratas o perros a situaciones aversivas que se presentan en una secuencia aleatoria por un periodo de tres semanas. Los estresores utilizados son: inmersión en agua fría, choques eléctricos, cambios del ciclo luz- oscuridad, sonido y luz intensa. Este modelo reproduce algunas de las principales características de la depresión endógena, mismas que se pueden revertir con antidepresivos (Katz, 1982). Se ha desarrollado una variante conocida como estrés crónico leve impredecible, donde la rata es sujeta a estresores considerados como leves (aserrín mojado, inclinación de la caja, privación de agua y comida, luz estroboscópica, presentación de objetos extraños, etc.), aplicados de manera aleatoria. La base teórica en este modelo se sustenta en la misma que el estrés crónico impredecible, pero considera que un individuo responde ante estresores considerados como leves y que se presentan de manera aleatoria (Willner y cols, 1987). Las ratas muestran incapacidad para experimentar placer determinada dado que tienen dificultad para diferenciar agua endulzada y agua simple (Willner y cols, 1991). Diversos autores proponen que en la generación de este modelo parecen estar involucrados los receptores dopaminérgicos postsinápticos (Willner y cols, 1987).

Recientemente se ha generado una serie de modelos animales que son inducidos a través de la administración de fármacos con actividad antidepresiva, que bloquean la recaptura de las monoaminas (clomipramina, zimelidina, desipramina; Vogel y Vogel, 1982; Hilakivi y

Hilakivi, 1987; Rosenwasser y Heyes, 1994). Estos modelos se caracterizan porque los animales reciben un tratamiento farmacológico en la etapa postnatal que en la edad adulta, semejan los signos de la depresión endógena humana. Las ratas tratadas con antidepresivos en la etapa postnatal incrementan su actividad en campo abierto, la ingesta voluntaria de alcohol y el tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt, disminución de la conducta sexual, la conducta agresiva y las conductas de recompensa (Mirmiran y cols, 1981; Vogel y cols, 1990c; Velázquez-Moctezuma y Díaz Ruiz, 1992). Estas deficiencias pueden restaurarse con la administración de antidepresivos tricíclicos en la edad adulta, así como con la privación de sueño MOR (Vogel y cols, 1983, 1990c). Estos modelos soportan en gran medida la validez de apariencia y la teórica.

No hay duda de que los modelos animales de depresión han contribuido al desarrollo de nuevos tratamientos de este padecimiento, al sugerir un posible mecanismo de acción de antidepresivos, así como influir en teorías acerca de la psicobiología de la depresión. Por su muy variada naturaleza, los modelos animales necesitan del conocimiento de la clínica, pero hay mucho que es incierto acerca de la naturaleza de la depresión. El desarrollo de los modelos animales puede contribuir al conocimiento de las causas o de los procesos, así como influir en la clínica, por lo que su relevancia es mayor si los experimentos en animales sugieren nuevas ideas.

El interés en nuestro laboratorio y en particular en este trabajo, es el modelo de depresión propuesto por Vogel y cols, (1982). Este modelo consiste en la administración de clomipramina (CLI) en la etapa postnatal que produce signos semejantes a la depresión en la edad adulta. Una de las ventajas que tiene el modelo es que la administración de CLI induce cambios de larga duración, esto permite estudiar algunos signos de la depresión, en particular la actividad del eje HHA cuya alteración en modelos animales ha sido poco analizada. A continuación se describirá este modelo más extensamente.

### **2.5.1. Modelo de depresión por administración postnatal con clomipramina**

Una de las líneas de investigación en nuestro laboratorio tiene como propósito desarrollar y

estudiar el modelo animal de depresión endógena propuesto por Vogel y cols, (1982), en el cual se refleja un estado similar al de la depresión endógena humana. Los antecedentes para este modelo se obtuvieron del trabajo realizado por Mirmiran y cols en 1981, sobre el posible papel ontogénico del sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR). Ellos se interesaron en la posibilidad de que el SMOR en la etapa postnatal podría jugar un papel importante en la conducta normal adulta. Para ello, privaron de SMOR a ratas machos durante su periodo postnatal y observaron los efectos sobre la conducta en la edad adulta. La privación de SMOR fue inducida mediante la administración de CLI (poderoso supresor del SMOR). En la edad adulta, las ratas tratadas con CLI mostraron anomalías en la conducta sexual y en la actividad locomotora respecto a los animales control. Vogel y Vogel (1982) notaron que las anomalías observadas en las ratas tratadas con CLI semejaban el síndrome de depresión endógena humana.

Como se mencionó anteriormente, los pacientes que presentan esta enfermedad tienen anomalías conductuales como disminución de la libido, cambios motores, principalmente retardo o agitación, y alteraciones en el patrón de SMOR. Las similitudes entre los pacientes deprimidos y las ratas tratadas con CLI, sugirieron que se reproduce los diferentes signos de la depresión endógena humana proponiéndolo como un modelo animal de depresión. Acorde con esta hipótesis, las ratas tratadas con CLI postnatal tienen características que también se presentan en la depresión endógena humana como son, alteraciones del SMOR, disminución de la conducta sexual, de la agresividad y de las conductas de búsqueda de placer (Bonilla-Jaime y cols, 1998; Nelly y cols, 1990; Vogel y cols, 1982, 1990a, 1990b, 1990c, 1990d). El decremento que en humanos se manifiesta como disminución de la libido, en la rata deprimida se caracteriza por incremento en la latencia de monta, patrón conductual que refleja el aspecto motivacional de la conducta sexual. Además, las ratas CLI manifiestan alteraciones en el componente ejecutorio de la conducta sexual como es incremento en la latencia de intromisión y de eyaculación, así como una disminución en la frecuencia de eyaculación o en su caso la inactividad sexual (Vogel y cols, 1996; Bonilla-Jaime y cols, 1998). Además, se ha corroborado en este modelo un incremento en la inmovilidad en la prueba de nado forzado, bioensayo conductual utilizado para la detección de fármacos antidepressivos, lo que apoya la noción de que la cantidad de inmovilidad durante dicha prueba es directamente proporcional al estado depresivo en la rata (Velázquez-Moctezuma y

Díaz-Ruiz, 1992). La administración de antidepresivos y terapias conductuales como la privación de sueño MOR restablecen las alteraciones conductuales que se presentan en los animales tratados con CLI postnatal de manera similar a lo que se observa en seres humanos deprimidos (Vogel y cols, 1990c).

Por otro lado, estudios recientes reportan que el tratamiento postnatal con CLI altera la actividad del eje HHA mostrando un incremento en la corticosterona basal, además de no responder a la prueba de supresión por administración de dexametasona (Prathiba y cols, 1998). Existen datos contradictorios al respecto, Ogawa y cols, (1994) reportan que no hay un incremento en los niveles basales de corticosterona, además de que la actividad del eje HHA en respuesta al estrés por inmovilización es baja, sin embargo existen pocos estudios respecto a la actividad circádica del eje en los animales tratados postnatalmente con CLI postnatal así como su respuesta ante diferentes estímulos.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Diversos estudios reportan una disfunción del eje HHA en pacientes con depresión endógena, caracterizada por elevados niveles del cortisol basal. De hecho, la actividad del eje HHA refleja una alteración en la curva de variación diurna en la secreción del cortisol en pacientes deprimidos que se manifiesta en un aplanamiento en el patrón de secreción del cortisol, probablemente debido al incremento en la actividad del eje HHA por la tarde. Tal alteración del eje HHA se considera un marcador biológico al confirmarse su presencia en un gran número de pacientes deprimidos.

Como se ha descrito anteriormente, el uso de los modelos animales ha sido de gran importancia en la elucidación de ciertos trastornos psiquiátricos siendo la rata albina de laboratorio el animal más empleado para ello, dado que este es capaz de reproducir algunos de los síntomas clínicos de la depresión endógena humana. Entre las características más importantes de la depresión endógena se encuentra la pérdida de interés e incapacidad para experimentar placer, que se manifiesta, por ejemplo, en una disminución de la libido en el ser humano y en la reducción de la conducta sexual en las ratas macho tratadas con CLI en la etapa postnatal (Vogel y

cols, 1990c). El estudio de las alteraciones en la conducta sexual masculina en el modelo de Vogel nos ha permitido determinar las posibles alteraciones tanto en los mecanismos neuroquímicos como en el sustrato neuronal que lo regula. Así, hemos encontrado que al parecer el sistema serotoninérgico que regula la conducta sexual masculina permanece intacto, mientras que los sistemas colinérgico y noradrenérgico se encuentran disfuncionales (Bonilla-Jaime y cols, 1998).

La intención principal del presente trabajo es la de determinar la funcionalidad del eje HHA en los animales tratados postnatalmente con clomipramina a través de su activación por diferentes aproximaciones tanto conductuales, como farmacológicas. En el primer caso, su activación por medio de estrés por inmersión, aplicado tanto aguda como crónicamente, que se sabe incrementa la secreción de corticosterona plasmática, el producto final de la activación del eje HHA, lo cual conduce al incremento en el peso de las glándulas adrenales. Esta aproximación nos permitiría determinar, en este modelo animal de depresión, la funcionalidad circádica del eje HHA al enfrentar el organismo una condición estresante, además de permitir determinar el ritmo circadiano de la secreción de corticosterona ante dicha situación. La segunda estimulación conductual del eje será a través de la actividad sexual, que fisiológicamente incrementa los niveles plasmáticos de corticosterona (Szechman y cols, 1974; Retana-Márquez y cols, 1998).

Otra de las aproximaciones para evaluar la funcionalidad del eje HHA es a través de la administración de fármacos colinomiméticos que conduce al incremento en la secreción de corticosterona en animales intactos. La estimulación farmacológica con oxotremorina y fisostigmina permitirá determinar la actividad del eje HHA, además de la evaluación del sistema colinérgico que tiene una participación importante en la hipersecreción de cortisol, así como en la etiología de la depresión.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las ratas deprimidas presentarán incremento en el patrón de secreción de corticosterona, así como alteración en la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal al estrés, a la conducta sexual y a la estimulación colinérgica.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (a través de la cuantificación de los niveles de corticosterona) al estrés, a la conducta sexual masculina y a la estimulación con agonistas colinérgicos en las ratas tratadas postnatalmente con CLI o con solución salina.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

En ratas machos tratadas postnatalmente con CLI o solución salina:

- Evaluar las variaciones circadianas de corticosterona.
- Analizar el efecto del estrés agudo y crónico sobre los niveles plasmáticos de corticosterona y los pesos de las glándulas adrenales en ambas fases del ciclo luz-oscuridad.
- Determinar las modificaciones en los niveles de corticosterona después de la actividad sexual.
- Evaluar el efecto de la administración de agonistas colinérgicos en la respuesta en los niveles de corticosterona, en el tiempo de inmovilidad, en la actividad motora y en la temperatura rectal en ambas fases del ciclo luz-oscuridad.

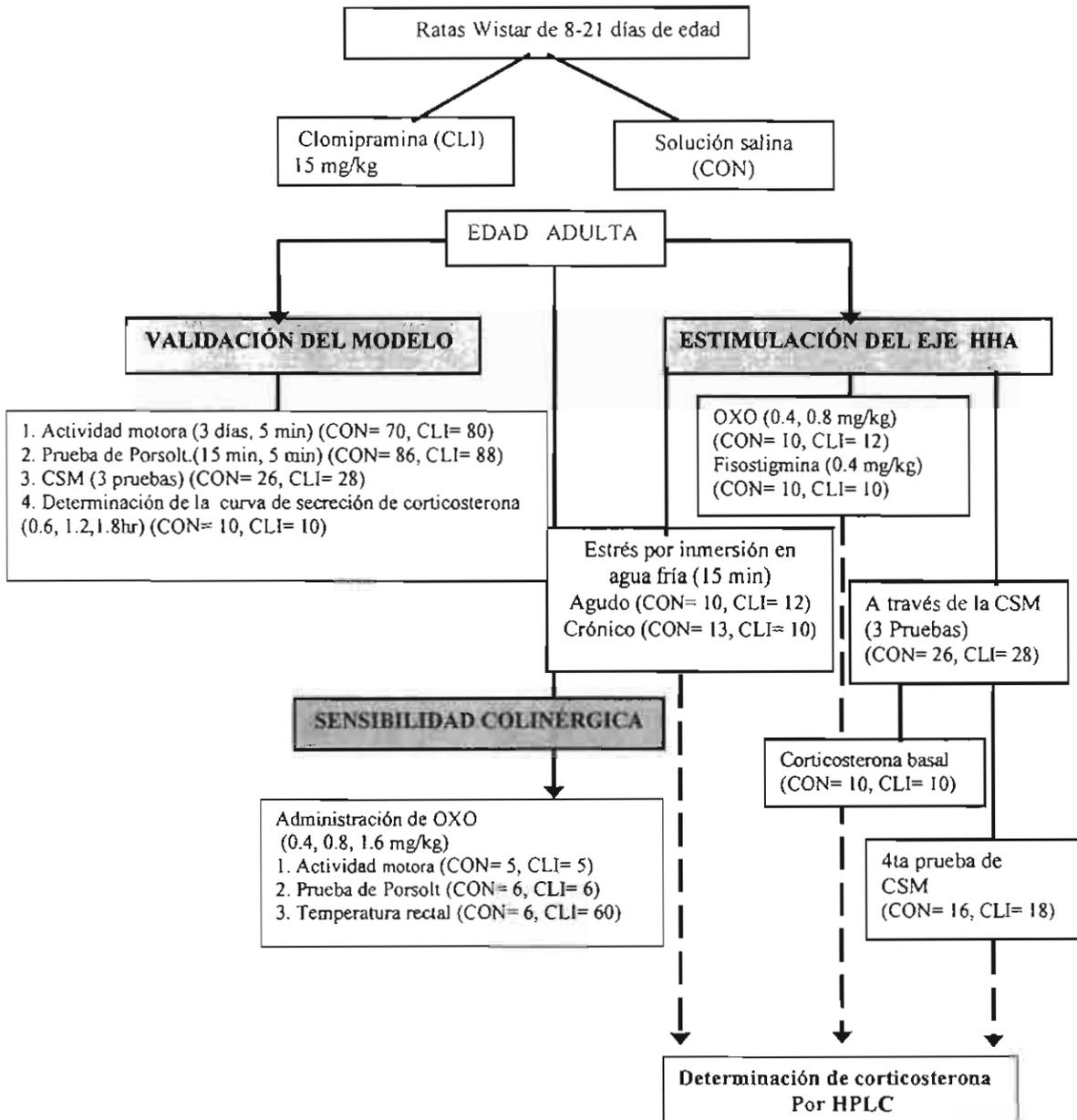
## 7. MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas Wistar hembras adultas e intactas, cada una se colocó en presencia de machos expertos permitiéndoles la cópula hasta que los machos presentaran al menos dos eyaculaciones con la intención de preñarlas. Este día se tomó como el día 0 de gestación y se alojaron en una caja individual con agua y alimento *ad libitum*. Tres días después del nacimiento, se entrecruzaron las camadas utilizando solamente las crías machos, mientras que las crías hembras se eliminaron. Se determinaron los grupos control y experimental. Entre los 8 y 21 días postnatal (P8-P21), cada cría del grupo control (CON) se le administró por vía sc solución salina y al grupo experimental, en el mismo período, se le inyectó por vía sc 15 mg/kg peso de clorhidrato de clomipramina (CLI; Novartis; Vogel y cols, 1982). En los dos grupos las inyecciones se aplicaron dos veces al día 8:00 y 18:00 h. A los 25 días de edad los animales se destetaron y se colocaron en cajas bajo condiciones de temperatura y humedad constantes en un ciclo de luz oscuridad 12:12 invertido (la luz se apaga 9:00 a.m.) con comida y agua *ad libitum*. En la edad adulta todos los animales controles y experimentales fueron sometidos a las pruebas conductuales para determinar el estado depresivo y validar el modelo animal de depresión en la prueba de Porsolt (Porsolt, 1979), en la de actividad motora (Hartley y cols, 1990), la conducta sexual (Bonilla-Jaime y cols, 1998), además de evaluar la secreción circádica de corticosterona plasmática. Posteriormente los animales fueron expuestos a diferentes tratamientos farmacológicos y conductuales donde se determinó la respuesta del eje HHA a través de los niveles plasmáticos de corticosterona mediante cromatografía. Por último, a ambos grupos de animales se les determinó la sensibilidad a la estimulación colinérgica en la evaluación del tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado y de la temperatura rectal (ver diagrama de flujo).

### 7.1. Validación del modelo animal de depresión.

En la edad adulta, todos los animales tratados postnatalmente con CLI y CON fueron sometidos a las pruebas conductuales para la determinación del estado depresivo. La primera prueba conductual fue: la prueba de Porsolt o de nado forzado, la segunda prueba fue de actividad motora, la tercera fue la evaluación de la conducta sexual y por último la actividad circádica de corticosterona. La primera prueba nos permite establecer el estado depresivo del animal

# MÉTODO



correlacionándolo directamente con el tiempo de inmovilidad (Velázquez-Moctezuma y cols, 1992). La actividad motora permite determinar la hiperactividad de los animales tratados postnatalmente con CLI descrita por Vogel y cols (1982). La actividad sexual nos permite determinar las alteraciones descritas en este modelo animal de depresión (Vogel y Vogel, 1982; Neill y cols, 1990; Vogel y cols, 1996; Bonilla-Jaime y cols, 1998). Y por último la determinación de la secreción circádica de corticosterona plasmática permite determinar si los niveles de corticosterona se presentan altos de manera similar a los altos niveles de corticosterona que se presentan en los humanos. Entre cada prueba hubo un intervalo de tiempo de una semana.

#### **7.1.1. Prueba de Porsolt o nado forzado.**

La prueba consiste en introducir a la rata en un cilindro de vidrio (34 cm de altura x 16 cm de diámetro) con agua a 25°C a una altura de 15 cm, durante 15 minutos el primer día. En el segundo día se realiza el mismo procedimiento, pero durante 5 minutos. En los primeros minutos la rata presenta vigorosa actividad exploratoria con la intención de escapar luego de lo cual, la rata permanece inmóvil flotando pasivamente en el agua en una posición característica, esto es: erguida sobre las patas traseras y la cola, recargando una o ambas extremidades anteriores en la pared del cilindro y manteniendo la cabeza levantada apenas arriba de la superficie del agua (Porsolt y cols, 1977; 1979). El tiempo total de inmovilización se evalúa solamente en los momentos que el animal permanece quieto durante ambas pruebas. La determinación del tiempo de inmovilidad se evalúa tanto en la fase de luz como de oscuridad.

#### **7.1.2. Actividad motora**

Los animales se colocaron en una cámara para registro de actividad motora espontánea de plexiglás (San Diego Instruments) cuadrada de 41x41x38 cm seccionada transversalmente por ocho haces de luz infrarroja en un eje y otros 8 haces de luz 90° con respecto a los primeros ocho. Tal prueba evalúa el número de cuentas que son las interrupciones del haz de luz que realiza el animal al momento de estar explorando y el tiempo de permanencia tanto en la periferia como en el centro de la cámara. La actividad motora de cada animal se evaluó 5 minutos durante cinco

días consecutivos. El análisis conductual se realizó durante ambas fases del ciclo luz-oscuridad.

### **7.1.3. Actividad sexual**

Se analizó la actividad sexual masculina de los machos en tres ocasiones, con un intervalo de una semana entre cada prueba. Los registros de conducta sexual se realizaron 4 h después del inicio de la fase de oscuridad, con luz roja (foco de 40 w). Se colocaron los animales en un redondel de plexiglás transparente de 45 cm de diámetro con piso de aserrín. Se dejaron 5 minutos de habituación para después introducir una hembra receptiva sexualmente, tratada con benzoato de estradiol ( $E_2$  10 $\mu$ g/0.1 ml de aceite vegetal, sc) 48 horas previas al registro y progesterona (2 mg en 0.1ml de aceite vegetal, sc) 44 horas después de la administración del  $E_2$ . Todos los registros de conducta sexual fueron de 30 minutos. Se consideró a los machos como sexualmente expertos hasta la tercera prueba de conducta sexual en la que se evaluaron los siguientes parámetros: latencias de monta, de intromisión y de eyacuación, número de montas y de intromisiones, frecuencia de eyacuación, tasa de acierto, intervalo posteyaculatorio e intervalo interintromisión.

### **7.1.4. Curva de secreción circádica de corticosterona.**

Se realizó el seguimiento de los niveles plasmáticos de corticosterona basal en diferentes horas del día para observar sus variaciones circádicas en las ratas tratadas postnatalmente con clomipramina y solución salina. Las mediciones se realizaron al inicio de la fase de luz y de oscuridad y una adicional a la mitad de cada uno de ellos.

## **7.2. Estimulación del eje HHA.**

### **7.2.1. Estimulación a través del estrés por inmersión en agua fría.**

Las ratas se introdujeron en un tanque que contenía una columna de agua de cm, a una temperatura de 15°C, durante 15 min. Este procedimiento se realizó tanto en el inicio de la fase de luz, como en el inicio de la fase de oscuridad. Posteriormente, los animales se sacrificaron por decapitación una hora después de aplicado el estresor obteniendo el plasma para la cuantificación de corticosterona. Se obtuvieron las adrenales y se pesaron. Este procedimiento se realizó en ambos grupos durante la aplicación de estrés agudo (1 día de inmersión) o crónico (10 días de inmersión).

### 7.2.2. Estimulación a través de la conducta sexual.

Después de las tres pruebas de conducta sexual masculina espontánea, se realizó una cuarta prueba en las mismas condiciones después de la cual se sacrificaron a los animales inmediatamente para la determinación de corticosterona plasmática. Para analizar si el tratamiento postnatal facilita o inhibe la conducta sexual, se considera facilitación cuando se observa incremento en el porcentaje de machos que presentan actividad sexual, incremento en la frecuencia de eyaculación, disminución en el número de intromisiones, así como en la latencia de eyaculación. Como efectos inhibitorios, se observan una o más de las situaciones inversas, además de aumentar la latencia de monta e intromisión.

A un grupo de ratas Wistar intactas de la misma edad que las ratas tratadas postnatalmente con CLI y solución salina se les realizaron tres pruebas de conducta sexual, se seleccionaron machos sexualmente expertos y se les expusieron a las siguientes condiciones de actividad copulatoria; 1) con hembras receptivas separados con rejilla, durante 20 minutos, 2) machos con hembras receptivas y con la vagina obstruida, durante 20 minutos; 3) machos con hembras receptivas que alcanzaron una eyaculación y 4) machos con hembras receptivas que presentaron dos eyaculaciones. Para la obstrucción de la vagina se obstruyó la vagina con colodión y un pedazo de gasa. Los animales se sacrificaron inmediatamente después de cada una de las pruebas para la determinación plasmática de corticosterona.

### 7.2.3. Estimulación del eje HHA a través de la administración de fármacos.

Después de corroborar el estado depresivo de los animales, se les administró en la edad adulta, tanto a los animales tratados postnatalmente con clomipramina como a los tratados con solución salina, fármacos colinérgicos que estimulan al eje HHA induciendo un incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona. Los tratamientos farmacológicos fueron los siguientes:

**Oxotremorina**, agonista muscarínico, a una dosis de 0.4 y 0.8 mg/kg vía ip, 30 minutos después se sacrificaron a los machos para la cuantificación de corticosterona (Steiner y Smith, 1980).

**Fisostigmina**, inhibidor de la acetilcolinesterasa, a una dosis de 0.4 mg/kg vía ip 20 minutos antes de sacrificar a los animales (Hasey y Hanin, 1990).

### **7.3. Sensibilidad colinérgica.**

La sensibilidad colinérgica se determinó a través del efecto de la administración de oxotremorina en la actividad motora, en la temperatura rectal y en la prueba de Porsolt o de nado forzado.

#### **7.3.1. Actividad motora**

La actividad motora se analizó con la administración de oxotremorina (agonista colinérgico que altera la actividad motora en ratas intactas) en ambas fases del ciclo luz-oscuridad durante 15 min. La administración de oxotremorina, a la dosis de 0.2 y 0.4 mg/kg, se realizó vía ip 30 minutos antes de la prueba de actividad motora. Previamente a la administración de oxotremorina se inyectó metil bromuro-escopolamina como bloqueador periférico de los receptores muscarínicos, a la dosis de 3 mg/kg (15 minutos antes de la administración de oxotremorina). Se evaluó el número de interrupciones del haz de luz que realiza el animal al momento de estar explorando.

#### **7.3.2. Temperatura rectal.**

La temperatura se determinó mediante la aplicación de un termistor vía rectal. Se considero como temperatura rectal aquella que se repitiese cuatro veces consecutivas independientemente del tiempo. La determinación de la temperatura basal se realizó al inicio de la prueba previa a la aplicación de los fármacos en ambos grupos de animales. Posteriormente se les administró vía ip oxotremorina a las dosis de 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mg/kg (Ryan y cols, 1996) en un volumen de 0.2 ml. A cada uno de los animales se les administró previamente metil bromuro-escopolamina (3 mg/kg; 15 minutos antes de la administración de oxotremorina) como un agente bloqueador periférico. La temperatura rectal se determinó en ambas fases del ciclo luz-oscuridad 30 minutos después de la administración de oxotremorina.

#### **7.3.3. Prueba de Porsolt o nado forzado.**

Después de evaluar la inmovilidad basal en ambas fases del ciclo, los animales de ambos grupos se les administró escopolamina-metil-bromuro (3mg/kg) como bloqueo periférico, 15 minutos después se inyectó oxotremorina a diferentes dosis (0.4, 0.8 y 1.6 mg/kg, ip) (Mrowiec y cols, 1991). La prueba consiste en introducir a la rata en un cilindro de vidrio (34 cm de altura x 16 cm

de diámetro) con agua a 25°C a una altura de 15 cm, durante 15 minutos el primer día. En el segundo día se realiza el mismo procedimiento, pero durante 5 minutos. La administración de oxotremorina se realizó durante la prueba de 5 minutos. La determinación del tiempo de inmovilidad se evalúa tanto en la fase de luz como de oscuridad.

#### **7.3.4. Determinación plasmática de corticosterona.**

La determinación plasmática de corticosterona se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método de Woodward y Emery (1987). Se decapitaron primeramente a los animales para la obtención de la sangre en tubos heparinizados y se centrifugaron para la extracción del plasma. A 1 ml de plasma se le adicionó 100µl de 19-nortestosterona (5.0 µg/ml de metanol) como estándar interno, 150 µl de hidróxido de sodio (0.3 M) para prevenir la extracción de contaminantes fenólicos y 5 ml de una mezcla de dietileter-diclorometano (60:40 v/v) para la extracción de los esteroides. Después los tubos se agitaron en un vórtex, se centrifugó y la fase orgánica se transfirió a otro tubo adicionándole 1ml de agua grado HPLC. Después se centrifugó nuevamente, la fase orgánica se pasó a otro tubo y se evaporó con nitrógeno a temperatura ambiente. Los residuos se redisolviéron en 100 µl de metanol-agua (55:45 v/v) para inyectarse al cromatógrafo, previamente calibrado. La sensibilidad del equipo para la cuantificación de corticosterona fue de 0.05 µg /dl. Se utilizó una columna symetry C18 de 2.0x150mm, con tamaño de la partícula 5m, La fase móvil que se utilizó fue acetonitrilo-agua (65:35 v/v) a un flujo de 0.4 ml/min con un sistema isocrático. La corticosterona se analizó con un detector ultravioleta a 250 nm.

### **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para las comparaciones de los diferentes eventos del patrón copulatorios de la actividad sexual, en los animales tratados con CLI y salinos, se realizó un análisis no paramétrico con la prueba U de Mann-Whitney. Para comparar la proporción de sujetos que desplegaron conducta de monta, intromisión y eyaculación en la prueba de conducta sexual espontánea se realizó la prueba de Chi-cuadrada. Los resultados obtenidos en la prueba de Porsolt, en la prueba de actividad motora y la curva circádica de secreción de corticosterona plasmática de en ambos grupos, se analizaron mediante la prueba t de Student. Para confrontar los resultados de los niveles plasmáticos de

corticosterona en las ratas machos sexualmente expertas con las diferentes condiciones de actividad copulatoria, las comparaciones en la actividad motora, niveles plasmáticos de corticosterona, temperatura rectal y prueba de Porsolt ante la administración de oxotremorina se aplicaron análisis de varianza (ANOVA). Cuando éstos fueron significativos ( $p < 0.05$ ), se aplicó la prueba de Newman-Keuls como prueba *post hoc*. De la misma manera, las comparaciones en los niveles plasmáticos de corticosterona ante la exposición aguda y crónica al estrés se realizaron con análisis de varianza paramétricos (ANOVA), seguidos de una prueba de Newman-Keuls para las comparaciones entre los grupos cuando el análisis de varianza fue significativo (Zar, 1984). Para la realización de la estadística se utilizó el programa estadístico GB-Stat.

## 9. RESULTADOS

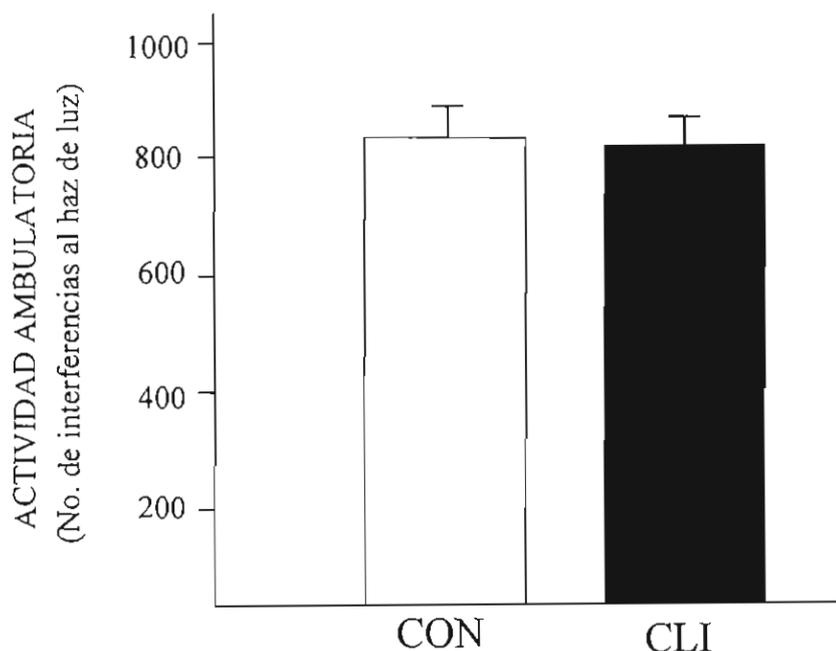
En la actividad ambulatoria o motora no se observaron diferencias entre ambos grupos durante la prueba estándar de 5 minutos (Fig. 4). El tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado o de Porsolt se muestra en la figura 5. El tratamiento postnatal con CLI incrementó significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de 15 y 5 minutos respecto al grupo control ( $t = -12.9484$ ;  $p < 0.001$ ).

En la distribución del porcentaje de sujetos que despliegan actividad copulatoria en las pruebas de experiencia sexual se observó que el tratamiento postnatal con CLI redujo el porcentaje de sujetos que despliegan montas desde la primera prueba de conducta sexual alcanzando el 64% el porcentaje de sujetos que presentan montas (18 de 28;  $X^2 = 32.001$ ;  $p < 0.05$ ), intromisiones (18 de 28;  $X^2 = 32.001$   $p < 0.05$ ) y el 35 % que despliegan eyaculaciones (10 de 28;  $X^2 = 61.001$ ;  $p < 0.01$ ) en la tercera prueba. Mientras que el 96 % de los animales CON presentaron cada uno de estos componentes copulatorios (25 de 26; Figura 6). Aún cuando los animales tratados con CLI se someten a una cuarta prueba de conducta sexual (previa a la determinación de corticosterona plasmática) el porcentaje de sujetos que despliegan cada uno de los componentes del patrón copulatorio no se incrementan indicando que existe un estancamiento en el desarrollo de la conducta sexual.

Los resultados en los diferentes parámetros de la actividad sexual en las ratas CLI se observan en la Tabla 1 y muestran diferencias respecto al grupo control. El tratamiento postnatal con CLI alteró la conducta sexual al aumentar la latencia de monta, la latencia de intromisión, la latencia de eyaculación, el intervalo intercopulatorio y el intervalo interintromisión y disminuyendo la frecuencia de eyaculación.

La respuesta del eje HHA por activación mediante la conducta sexual se observa en la figura 7. Cuando los machos de ambos grupos son expuestos a la actividad copulatoria, los niveles plasmáticos de corticosterona se incrementaron tanto en las ratas controles como en los animales tratados postnatalmente con CLI ( $F[3,48]=24.0661$ ;  $p<0.0001$ ). Sin embargo, la respuesta del eje HHA a la conducta sexual difiere en ambos grupos experimentales. Cuando se comparan los niveles plasmáticos de corticosterona se observa una respuesta significativamente menor en las ratas tratadas con CLI con relación al grupo control después de la exposición de la conducta sexual. Cuando se comparan con sus respectivos controles, los niveles de corticosterona se incrementan 171% en el grupo tratado postnatalmente con solución salina (CON-basal, 16.76  $\mu\text{g/dl}$  vs. CON-CSM 45.76  $\mu\text{g/dl}$ ), mientras que en los animales tratados postnatalmente con CLI la corticosterona se incrementa 108% (CLI-basal 14.63  $\mu\text{g/dl}$  vs. CLI-CSM 30.5  $\mu\text{g/dl}$ ), mostrando una menor respuesta del eje HHA. Cuando las ratas CLI y CON se someten a la cuarta prueba de actividad sexual previa al sacrificio para la cuantificación de corticosterona plasmática, el despliegue de la conducta sexual fue muy similar a la tercera prueba de actividad copulatoria tanto en el porcentaje de sujetos que despliegan cada uno de los parámetros copulatorios, como en el desarrollo de la actividad copulatoria (Figura 6; Tabla 1).

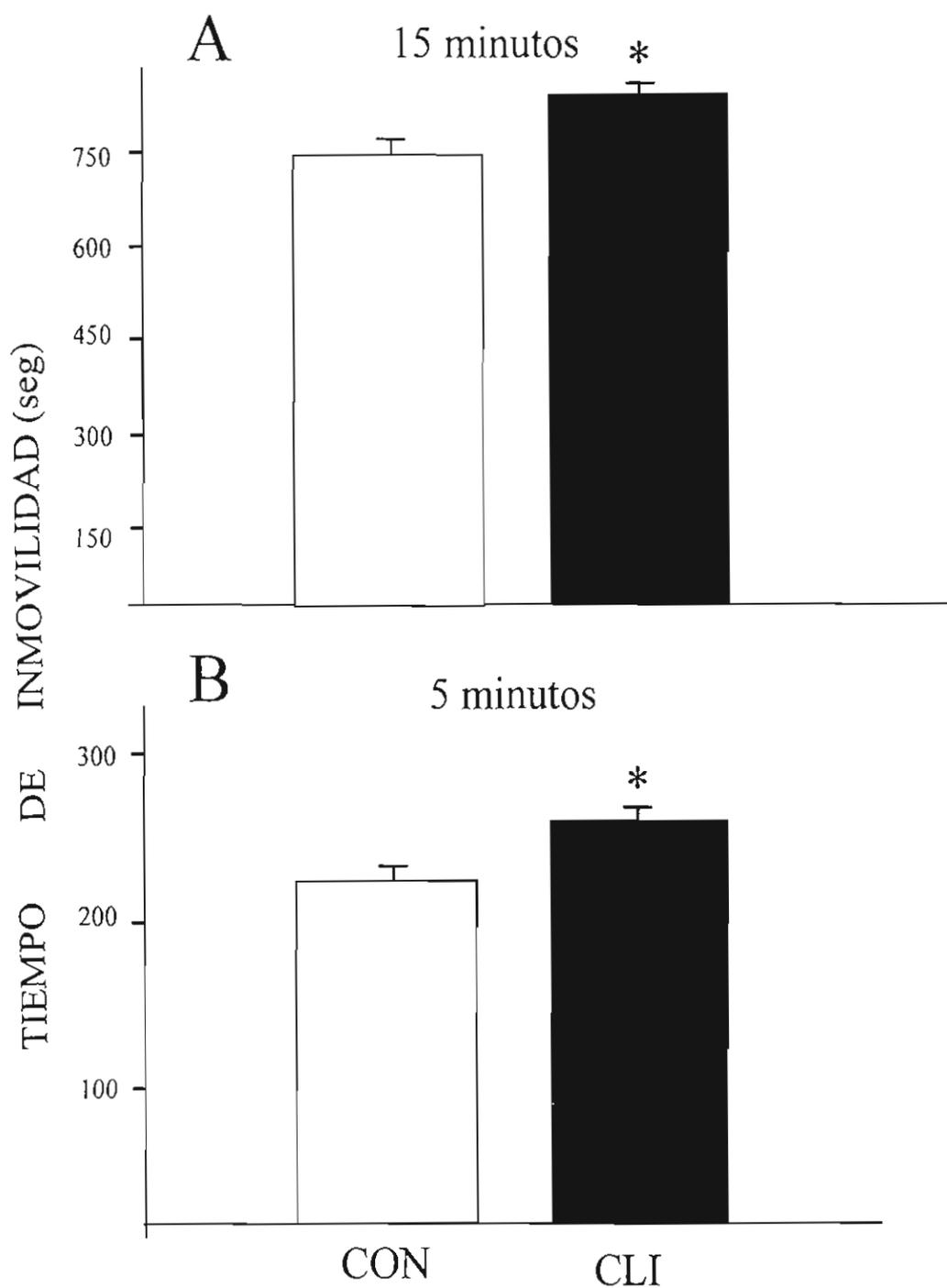
Al exponer a los animales intactos sexualmente expertos a las diferentes condiciones copulatorias, los resultados muestran que los niveles plasmáticos de corticosterona se incrementan en todas ellas y no solo con la actividad copulatoria, basta la sola presencia de una hembra receptiva para que los niveles de corticosterona se eleven, tal es el caso de los machos con hembras separados por una rejilla de alambre (grupo C/REJ) ( $F[4,48]=13.6195$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig 8).



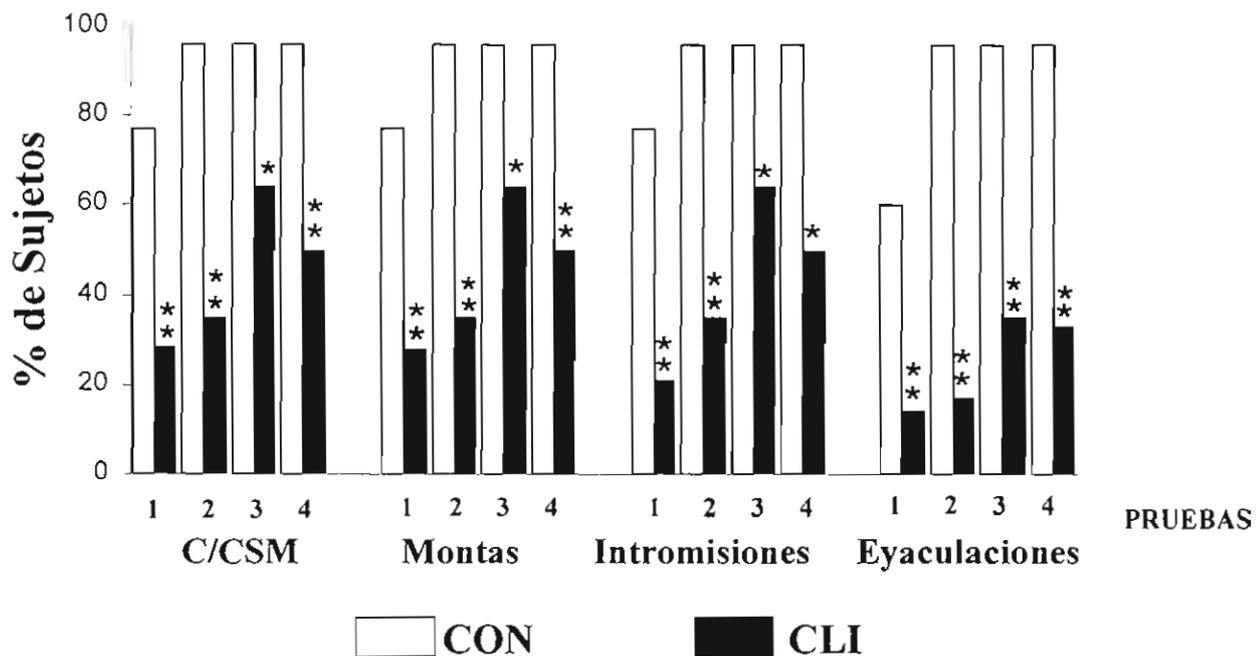
**Figura 4.** Efecto del tratamiento postnatal con CLI sobre la actividad ambulatoria en la fase oscura. No se modificó la actividad ambulatoria en las ratas tratadas con CLI (n= 80) en comparación de las ratas Control (n= 70). Los resultados se expresan en media  $\pm$  ee. t de Student  $p= 0.90$ .

**Tabla 1.** Tercera (III) y cuarta (IV) prueba de conducta sexual en ratas machos adultas tratadas en la etapa postnatal con solución salina (CON) y clomipramina (CLI). La cuarta prueba de conducta sexual se realizó para estimular el eje HHA y determinar los niveles de corticosterona plasmática. El tratamiento postnatal con CLI causó una disminución en la frecuencia de eyacuación (FE), así como un incremento en las latencia de monta (LM); de intromisión (LI) y de eyacuación (LE), número de montas (NM), número de intromisiones (NI), aumento en el intervalo interintromisión (III) y el intervalo intercopulatorio (IIC). Los resultados se expresan en media  $\pm$  ee. Prueba U de Mann-Whittney.  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$

III Prueba de conducta sexual									
	FE	LM	LI	LE	NM	NI	IIC	III	TA
	(NE/30min)	(seg)	(seg)	(seg)			(seg)	(seg)	
CON	2.8 $\pm$ 0.18	28 $\pm$ 7.2	34.5 $\pm$ 9.3	377 $\pm$ 39.7	4.3 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.6	28 $\pm$ 2.5	9.8 $\pm$ 7.3	0.78 $\pm$ 0.17
(n=26)									
CLI	1.05 $\pm$ 0.2**	365 $\pm$ 111*	434 $\pm$ 130*	677 $\pm$ 110*	8.3 $\pm$ 1.7	8.1 $\pm$ 0.2	43 $\pm$ 4.6**	98 $\pm$ 16**	0.55 $\pm$ 1.1
(n=28)									
IV Prueba de conducta sexual									
CON	2.8 $\pm$ 0.32	44 $\pm$ 13	53 $\pm$ 16	392 $\pm$ 67	5.7 $\pm$ 1.5	10.4 $\pm$ 0.9	24 $\pm$ 4.0	38.6 $\pm$ 6.4	0.68 $\pm$ 0.3
(n=16)									
CLI	1.18 $\pm$ 0.3**	268 $\pm$ 128*	351 $\pm$ 151*	659 $\pm$ 89*	6.6 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.1	51 $\pm$ 5.4**	105 $\pm$ 22**	0.58 $\pm$ 0.5
(n=18)									



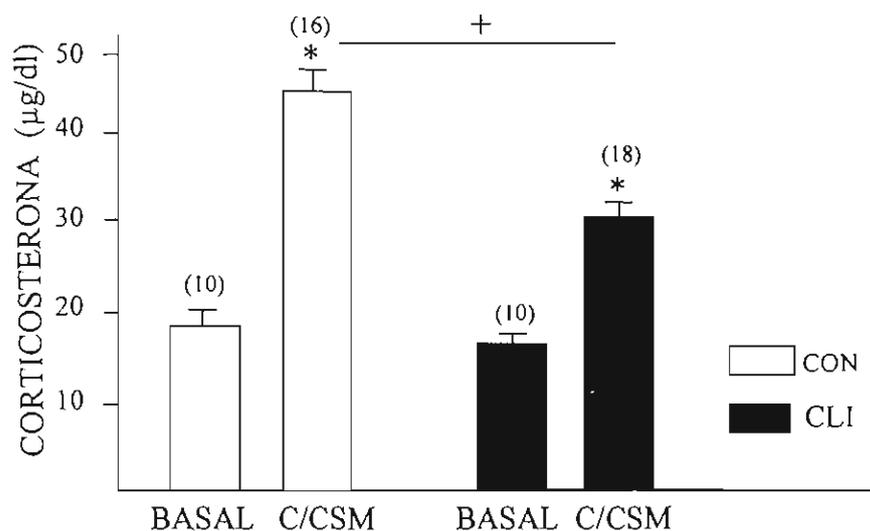
**Figura 5.** Tiempo de inmovilidad durante la prueba de nado forzado de 15 y 5min en la edad adulta en ratas sometidas al tratamiento postnatal con solución salina (Control) o con clomipramina (CLI). En ambas pruebas se observó un incremento en el tiempo de inmovilidad en el grupo tratado con CLI. Las barras representan la media  $\pm$  media  $\pm$  ee. Prueba de t de Student,  $t(85,87) = 12.9480$  \*  $p < 0.001$ .



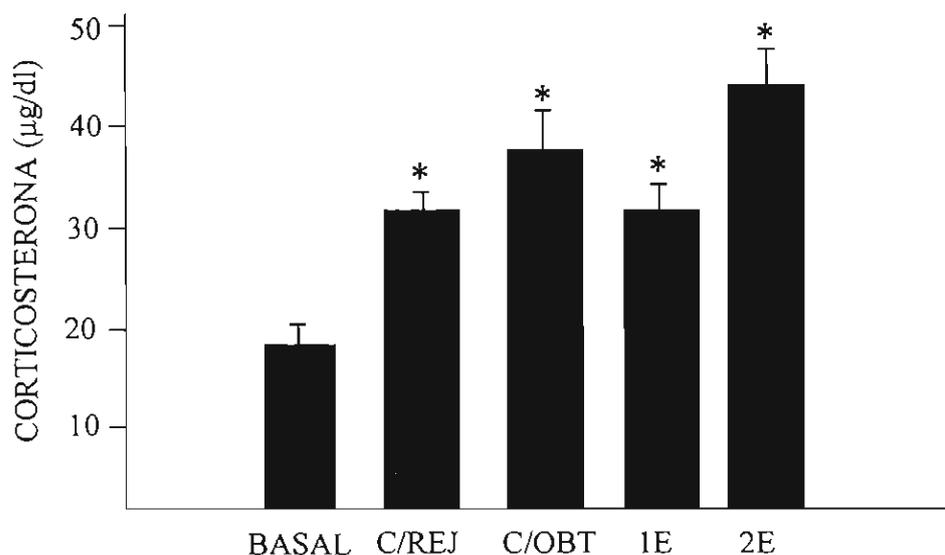
**Figura 6.** Porcentaje de sujetos que despliegan el patrón de montas, de intromisión y de eyaculación en las cuatro pruebas de conducta sexual en ratas tratadas postnatalmente con solución salina o con clomipamina. El tratamiento postnatal con CLI disminuye de manera significativa el porcentaje de machos que despliegan cada uno de los patrones copulatorios en las cuatro pruebas de conducta sexual. El número de sujetos fue de (CON; n= 26 CLI n= 28) para la tres primeras prueba de conducta sexual realizada como experiencia y de (CON; n=16 CLI n= 18) para la cuarta prueba de conducta sexual previa al sacrificio para la determinación de corticosterona. Prueba de Chi Cuadrada, \* p<0.05; \*\* p<0.01.

Por otro lado, la figura 9 muestra los niveles plasmáticos de corticosterona en los animales tratados con CLI inactivos sexualmente, los que sólo montan, e intromiten y los que eyaculan tanto una como dos veces. Cuando se comparan cada una de las condiciones copulatorias con sus niveles basales. Se observa que la corticosterona se incrementa independientemente de que las ratas tratadas con CLI presenten actividad sexual o no.

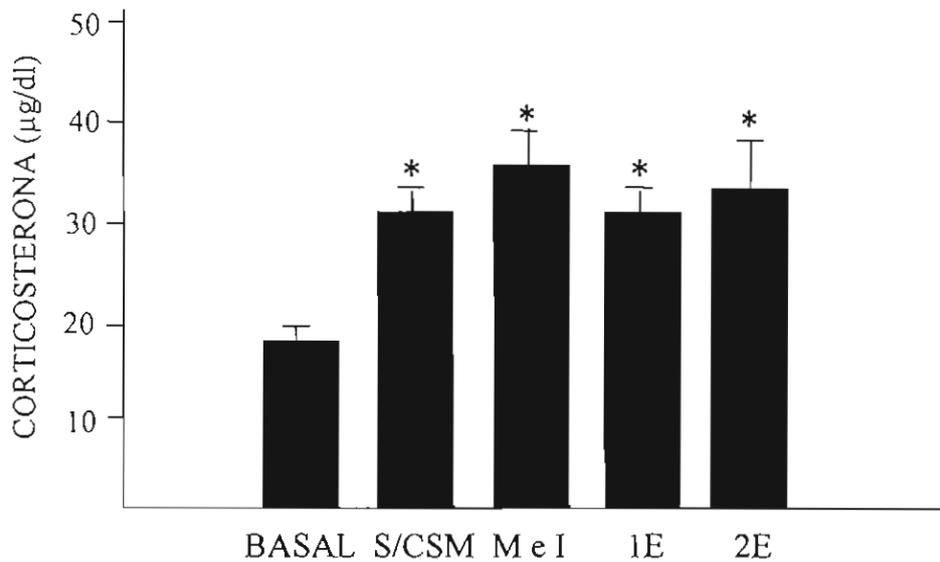
Cuando se realizaron las comparaciones correspondientes entre los animales intactos sexualmente y las ratas tratadas con CLI en condiciones básicas, con una y dos eyaculaciones respectivamente, no se observaron diferencias en ninguna de ellas, a excepción de los animales tratados con CLI con dos eyaculaciones, que muestran niveles plasmáticos de corticosterona significativamente menores respecto a los animales intactos sexualmente expertos que también alcanzaron dos eyaculaciones (p<0.01; Figura 10), media hora después de haber copulado.



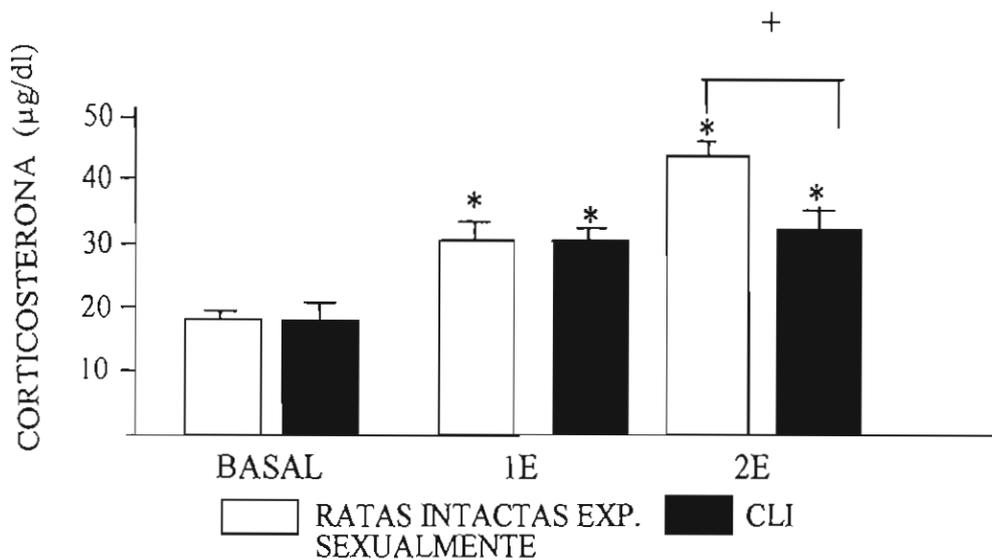
**Figura 7.** Niveles plasmáticos de corticosterona en los animales tratados postnatalmente con solución salina (CON) y clomipramina (CLI) después de la actividad sexual. La corticosterona se incrementa en ambos tratamientos. Sin embargo el incremento es menor en los animales tratados con CLI. C/CSM= machos expuestos a la conducta sexual masculina. Los resultados se muestran media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(3,48)=24.0661$ ,  $p < 0.0001$ ) seguida de Newman-Keuls \*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.01$  comparado con su basal; +  $p < 0.01$  comparación entre los tratamientos con conducta sexual



**Figura 8.** Niveles plasmáticos de corticosterona en los machos intactos sexualmente expertos, expuestos a las diferentes condiciones de conducta sexual ( $n=10$ ). En todas las condiciones copulatorias la corticosterona se incrementó. C/REJ= machos con hembras separados por una rejilla; C/OBT= machos con hembras receptoras obstruidas en la vagina; 1E= machos que alcanzan una eyaculación; 2E= machos que presentan dos eyaculaciones. Los datos se muestran en media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(4,48)=13.6195$ ,  $p < 0.0001$ ) seguida por la prueba de Newman-Keuls. \*  $p < 0.01$ .



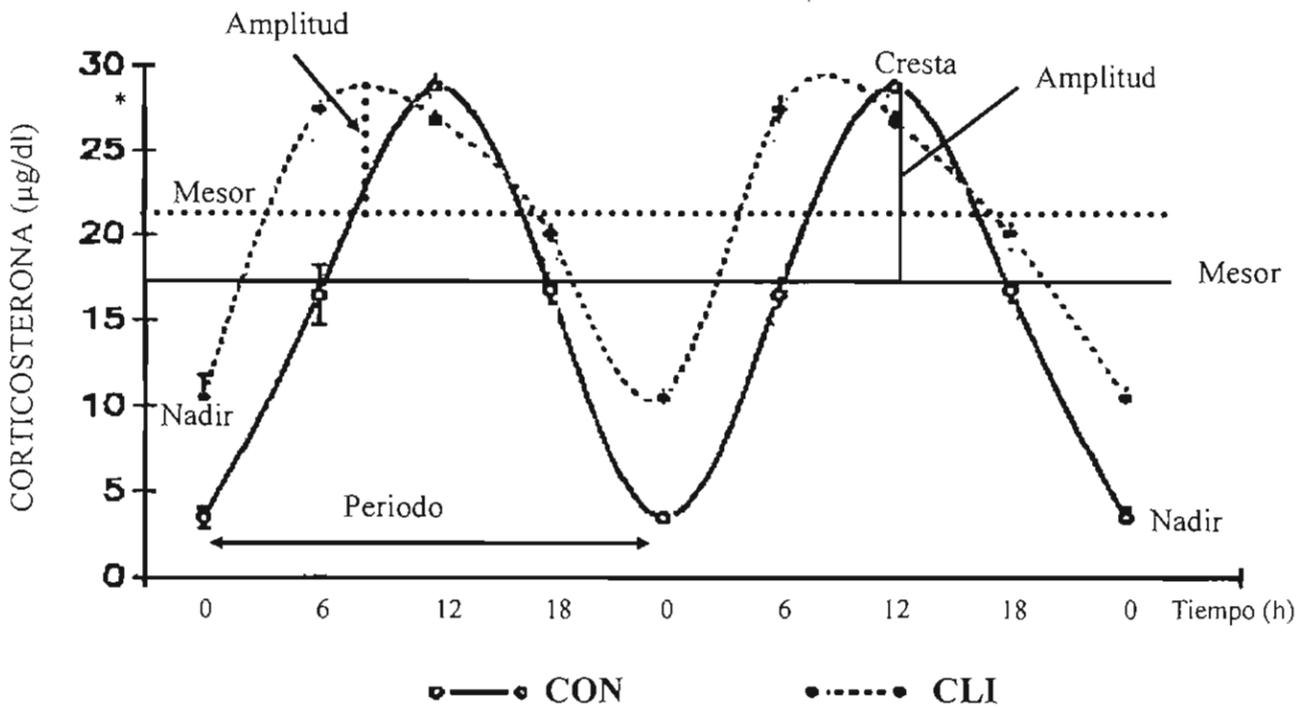
**Figura 9.** Niveles plasmáticos de corticosterona de las ratas tratadas postnatalmente con CLI que no desplegaron conducta sexual (S/CSM), machos que sólo montan e intromiten (M e I) y ratas CLI que alcanzan una y dos eyaculaciones. Los niveles de corticosterona se incrementan con la sola presencia de la hembra. Los datos son media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(4,28) = 43.6195$ ,  $p < 0.0001$ ) seguida de la prueba de Newman-Keuls., \*  $p < 0.01$ .



**Figura 10.** Comparación de los niveles plasmáticos de corticosterona entre los machos sexualmente expertos expuestos a las diferentes condiciones copulatorias y los animales CLI en condiciones basales, los que eyaculan una vez (1E) y los que eyaculan dos veces (2E). Los niveles de corticosterona se incrementan en ambos grupos cuando los machos eyaculan 1 y dos veces, sin embargo el incremento es significativamente menor en las ratas tratadas con CLI respecto a los machos intactos sexualmente expertos cuando alcanzan dos eyaculaciones. Los resultados se expresan en media  $\pm$  ee. ANOVA seguido de Newman-Keuls. \*  $p < 0.01$  con respecto a los niveles basales. +  $p < 0.01$  comparación entre los machos intactos con 2E y las ratas CLI con 2E.

Los niveles plasmáticos de corticosterona durante su ritmo de secreción de corticosterona plasmática se observan en la figura 11. Los niveles de corticosterona en las ratas control, tratados con solución salina (CON) se observó variación en la secreción de corticosterona, con un nivel máximo al inicio de la fase oscura ( $28.74 \pm 2.17 \mu\text{g/dl}$ ) y un nivel mínimo al inicio en la fase de luz ( $3.45 \pm 0.59 \mu\text{g/dl}$ ). A diferencia del grupo control, el tratamiento postnatal con CLI incrementó los niveles basales de corticosterona en el inicio y en la mitad de la fase de luz (cero y seis horas respectivamente). Cuando se compararon ambos grupos, los niveles de corticosterona manifestaron un aumento de 200% en los animales tratados con CLI (CON:  $3.45 \mu\text{g/dl}$  vs. CLI:  $10.49 \mu\text{g/dl}$ ) al inicio de la fase de luz (cero horas), mientras que a la mitad de esta fase (6h) los niveles de corticosterona se incrementaron 66 % respecto al grupo control (CON:  $16.49 \mu\text{g/dl}$  vs. CLI:  $27.46 \mu\text{g/dl}$ ). Este efecto no se observó en la fase de oscuridad, aún cuando hubo una tendencia a incrementarse a la mitad de esta fase (18h) con un 20% más respecto al grupo control, sin alcanzar significancia estadística.

El análisis detallado del ritmo circádico de la secreción de cortisol se muestra en la figura 11. Las ratas tratadas con CLI muestran un incremento en el valor mínimo (nadir) de  $10.49 \mu\text{g/dl}$ , a diferencia de las ratas CON con un valor de  $3.45 \mu\text{g/dl}$ . En el caso del valor medio (mesor) se observa también incremento en las ratas CLI ( $21.21 \mu\text{g/dl}$ ) con respecto al grupo CON ( $17.15 \mu\text{g/dl}$ ). La amplitud (la distancia entre la cresta a el mesor de un periodo que se presenta en un ciclo con una duración de 24 horas es menor en las ratas tratadas con CLI  $8.87 \mu\text{g/dl}$  contra el grupo CON con un valor de  $12.57 \mu\text{g/dl}$ . Cuando se analiza la acrofase (valor máximo), las ratas CLI presentan una disminución en este parámetro ( $-250^\circ$ ) con un porcentaje de ritmicidad de 86% ( $F=62$ ), mientras que el grupo CON muestra  $-282^\circ$  con un porcentaje de ritmicidad de 98.5% ( $F=676$ ). Los resultados indican que el ritmo en las ratas tratadas con CLI presenta un avance de fase de dos horas.



**Figura 11.** Oscilación circádica de los niveles basales de corticosterona en animales tratados postnatalmente con clomipramina (CLI; n= 10) o solución salina (CON; n= 10). Los niveles de corticosterona son significativamente mayores al inicio y a la mitad de la fase de luz en los animales tratados con CLI. El ritmo circadiano presenta una solo periodo en un ciclo de 24 horas. La figura muestra los diferentes parámetros cronobiológicos (amplitud, mesor, nadir, periodo, cresta). Note que los animales CLI muestran un incremento en el nadir y mesor, una menor amplitud y en consecuencia un ritmo adelantado. Los datos muestran media  $\pm$  ee. Prueba de t de Student, \*  $p < 0.01$ .

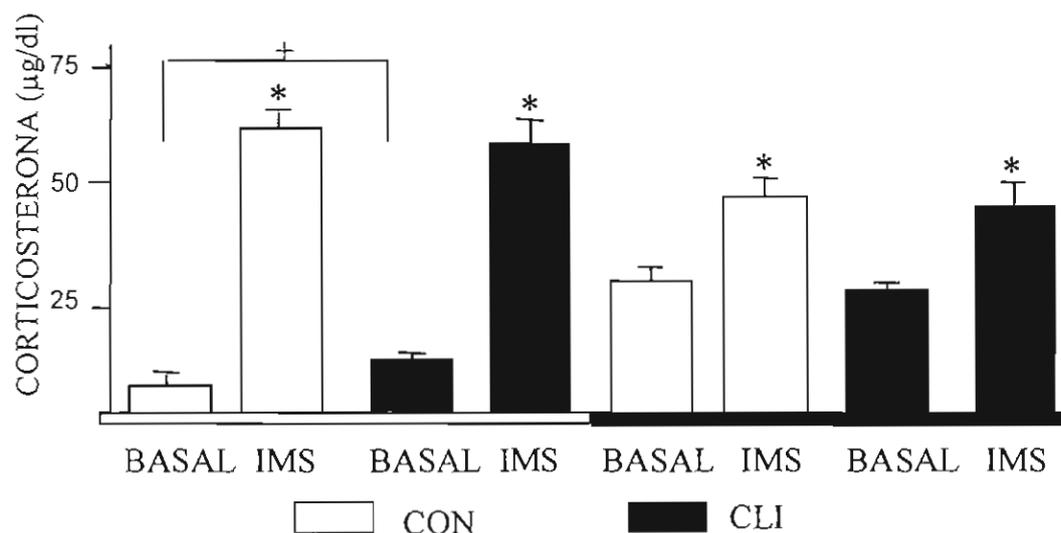
Los efectos inducidos por la exposición aguda al estrés por inmersión se muestran en la figura 12. En condiciones basales, se observó un incremento en los niveles de corticosterona en las ratas tratadas con CLI sólo al inicio de la fase de luz como se observa en la curva circádica de corticosterona. El estrés agudo por inmersión (IMS) indujo un incremento en los niveles de corticosterona en todos los sujetos 30 minutos después de haberse expuesto a este estresor. Cuando las ratas fueron expuestas al estrés agudo al inicio de la fase de luz, los niveles de corticosterona se incrementaron en ambos grupos ( $F[3,39] = 244.49$ ;  $p < 0.0001$ ). El incremento en las concentraciones de corticosterona en el grupo control, por efecto del estrés agudo fue 16 veces mayor que las concentraciones basales. Mientras que en las ratas tratadas con CLI, el incremento en los niveles de corticosterona fue de 5.5 veces respecto a sus niveles basales, sin estrés. La exposición al estrés agudo por IMS al inicio de la fase oscura incrementó los niveles

de corticosterona de manera similar en ambos grupos, fue de 1.64 veces tanto en el grupo control como en las ratas tratadas con CLI respecto a sus niveles basales ( $F[3,39]=24.63$ ;  $p<0.0001$ ).

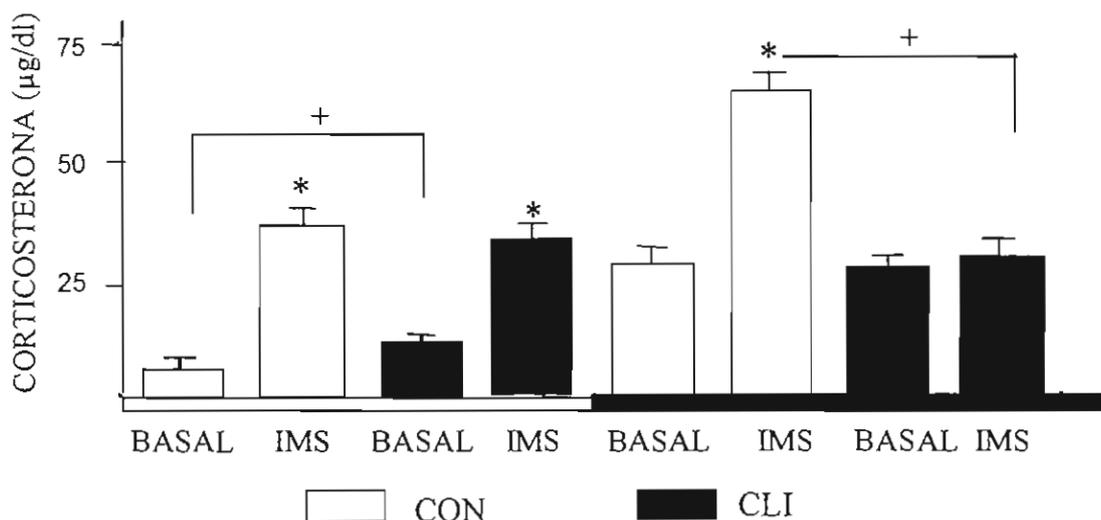
La respuesta del eje HHA al estrés crónico por IMS fue diferente dependiendo de la hora del ciclo de luz-oscuridad que se aplicó (Figura 13). Al inicio de la fase de luz la exposición repetida al estrés por IMS causó incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona tanto en las ratas control como en las ratas CLI ( $F[3,39]=96.0046$ ;  $p<0.0001$ ). Este aumento en las ratas control fue de 9.27 veces respecto a su nivel basal, mientras en las ratas tratadas postnatalmente con CLI el incremento en los niveles de corticosterona por efecto del estrés crónico fue de solo 3.11 veces que en condiciones basales. Sin embargo, cuando las ratas fueron expuestas a este estresor al inicio de la fase oscura la respuesta al estrés es diferencial en el grupo control con respecto al grupo CLI. En las ratas control, el efecto del estrés aumentó los niveles de corticosterona a poco más del doble de sus niveles basales ( $F[3,55]=31.3504$ ;  $p<0.0001$ ), mientras que en las ratas tratadas postnatalmente con CLI no se observó aumento en los niveles de corticosterona. Por otra parte, el peso de las glándulas adrenales no se modifica ni ante la exposición aguda ni ante la exposición crónica al estrés por IMS (Tabla 2).

**TABLA 2.** Peso de las glándulas adrenales (mg). El peso de las glándulas adrenales no se modificó por efecto de la exposición del estrés aplicado tanto de manera aguda como crónica en las ratas tratadas con CLI y CON en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. Los resultados se muestran en media  $\pm$  ee. t de Student.

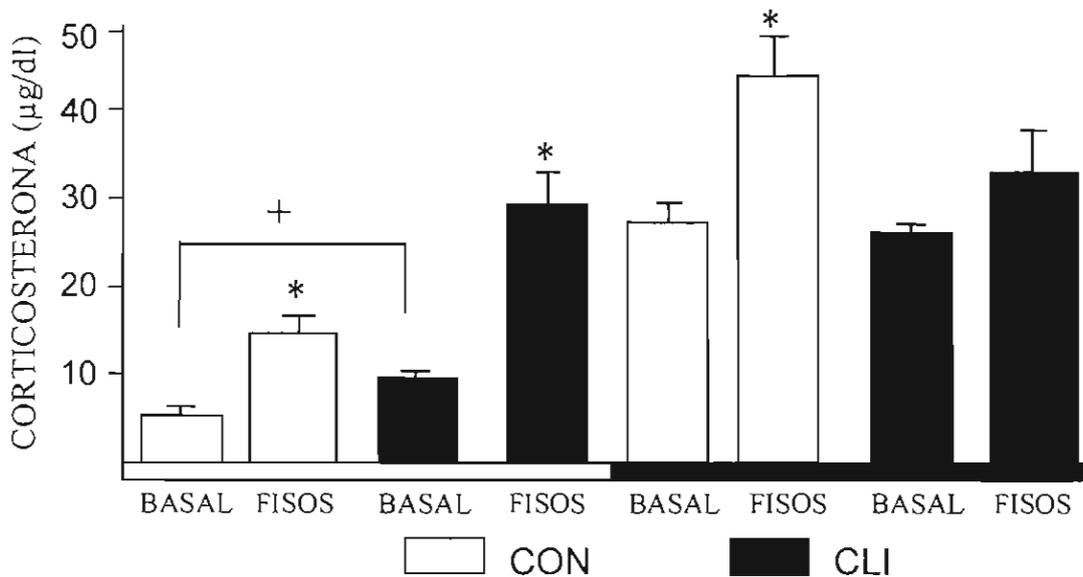
	<b>FASE DE LUZ</b>			
	<b>Basal</b>	<b>Estrés Agudo (1 día)</b>	<b>Basal</b>	<b>Estrés crónico (10 días)</b>
<b>CON (n= 10)</b>	21.0 $\pm$ 0.08	20.59 $\pm$ 0.01	21.90 $\pm$ 0.01	22.7 $\pm$ 0.08
<b>CLI (n= 12)</b>	19.68 $\pm$ 0.04	22.00 $\pm$ 0.03	20.68 $\pm$ 0.01	22.0 $\pm$ 0.08
	<b>FASE DE OSCURIDAD</b>			
<b>CON (n= 13)</b>	21.6 $\pm$ 0.03	22.90 $\pm$ 0.08	22.69 $\pm$ 0.03	22.0 $\pm$ 0.02
<b>CLI (n= 10)</b>	21.75 $\pm$ 0.01	23.84 $\pm$ 0.08	19.8 $\pm$ 0.01	19.7 $\pm$ 0.08



**Figura 12.** Niveles plasmáticos de corticosterona en ratas tratadas con clomipramina (CLI, n= 12) y solución salina (CONTROL, n= 10) ante el estrés agudo por inmersión en agua fría (IMS). Ambos grupos muestran un incremento significativo similar cuando se comparan con sus controles (no estresados) en ambas fases del ciclo luz-oscuridad. ANOVA ( $F(7,91)= 151.37, p < 0.0001$ ) seguido de Newman-Keuls. \*  $p < 0.01$  respecto a sus niveles basales correspondientes, +  $p < 0.01$  comparación entre los tratamientos. Los resultados son media  $\pm$  ee.



**Figura 13.** Niveles plasmáticos de corticosterona en ratas tratadas con clomipramina (CLI, n= 13) y solución salina (CONTROL, n= 12) ante el estrés crónico por inmersión (IMS). Ambos grupos muestran un incremento significativo cuando se comparan con sus controles (no estresados) en la fase de luz. Sin embargo, la corticosterona se incrementa sólo en el grupo control en la fase de oscuridad al compararse con sus basales. Los resultados son media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(7, 104)= 52.019, p < 0.0001$ ) seguido de Newman Keuls. \*  $p < 0.01$  respecto a los niveles basales de sus controles. +  $p < 0.01$  comparación entre el grupo CON vs CLI en condiciones basales.

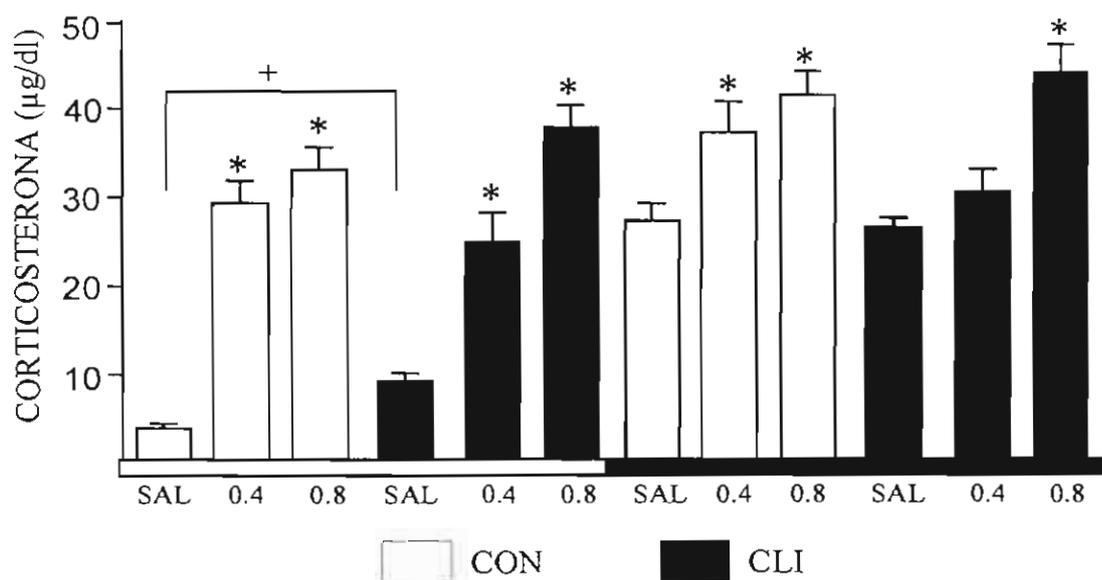


**Figura 14.** Efecto de la administración de fisostigmina (FISOS, 0.4 mg/Kg) en los animales tratados postnatalmente con solución salina (CON; n= 10) y clomipramina (CLI; n= 10) en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. La corticosterona se incrementó en ambos grupos al inicio de la fase de luz. Mientras que en la fase de oscuridad, el efecto de la administración de fisostigmina se observó sólo en el grupo control, incrementándose los niveles de corticosterona. Los resultados se expresan en media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(7,95)=38.90$ ,  $P < 0.0001$ ) seguida de la prueba de Newman-Keuls. \*  $p < 0.01$  respecto a sus niveles basales; +  $p < 0.01$  comparación entre grupo CON y CLI en condiciones basales.

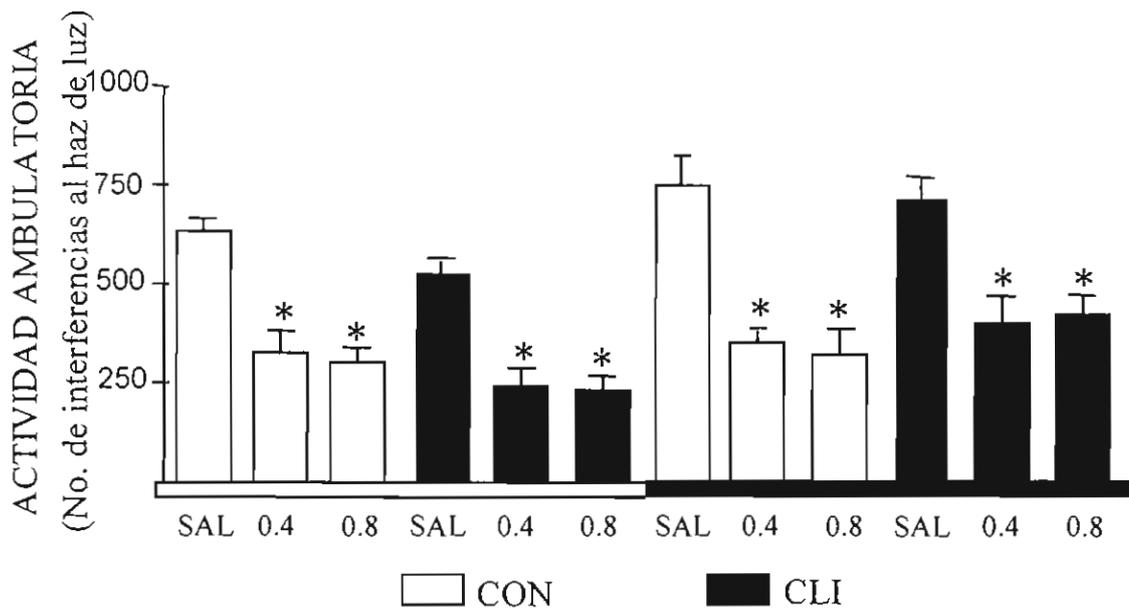
Los niveles plasmáticos de corticosterona después de la administración de fisostigmina se observan en la figura 14. En el grupo control, la fisostigmina indujo incremento en los niveles de corticosterona al inicio de ambas fases del ciclo de luz-oscuridad ( $F [7,95]=38.90$ ;  $p < 0.0001$ ). Mientras que los animales tratados postnatalmente con CLI, sólo respondieron en la fase de luz ( $F [3,45]=43.2855$ ;  $p < 0.0001$ ).

Los resultados obtenidos de los animales fueron sometidos al tratamiento farmacológico con oxotremorina en sus diferentes dosis, se muestran en la figura 15. En el caso de las ratas control, los niveles de corticosterona aumentaron en las dos fases del ciclo de luz-oscuridad, con ambas dosis ( $F[11,141]=37.41$ ;  $p < 0.001$ ). Sin embargo, en las ratas tratadas con CLI se observó un aumento significativo en los niveles de corticosterona, dependiendo del momento de administración del fármaco, así como de la dosis utilizada. Las ratas tratadas postnatalmente con CLI los niveles de corticosterona se incrementaron con las diferentes dosis de oxotremorina en la fase de luz ( $F[5,70]= 56.60$ ;  $p < 0.0001$ ), mientras que en la fase de oscuridad los niveles de corticosterona se incrementaron sólo con la dosis más alta de oxotremorina (0.8 mg/kg).

Cuando los animales tratados con CLI o con solución salina (CON) fueron sometidos a las diferentes pruebas conductuales ante la administración de oxotremorina a diferentes dosis para la determinación de la sensibilidad colinérgica se observan los siguientes resultados: las diferentes dosis de oxotremorina disminuyeron la actividad motora en los animales control, tanto en la luz ( $F [5,57]= 15.503$ ;  $p<0.0001$ ) como en la fase oscura ( $F[5,44]= p<0.0001$ ) del ciclo de luz-oscuridad. En los animales tratados con CLI se observó también un decremento significativo de la actividad motora en ambas fases del ciclo ante el tratamiento farmacológico con oxotremorina en las diferentes dosis (Fig. 16)



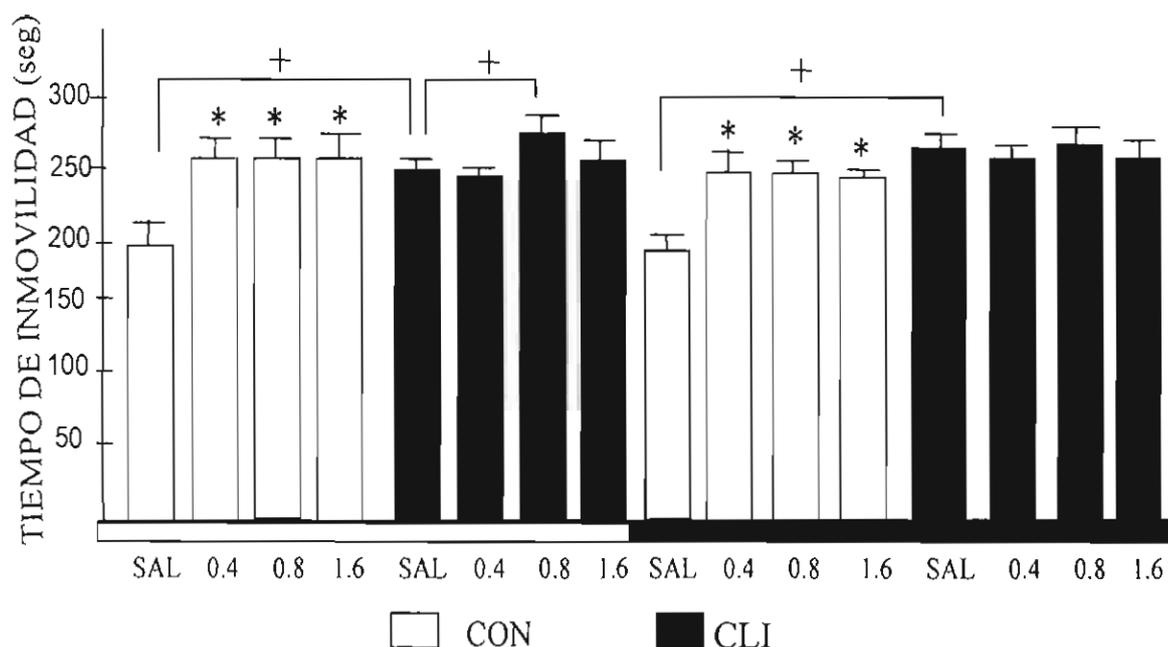
**Figura 15.** Efecto de la administración de oxotremorina en diferentes dosis (0.4; 0.8 mg/kg) en los animales tratados postnatalmente con solución salina (CON n= 10) y clomipramina (CLI; n= 12) en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. La corticosterona se incrementa en ambos grupos al inicio de la fase de luz. Sin embargo, en la fase de oscuridad los niveles de corticosterona aumentan sólo con la dosis más alta de oxotremorina (0.8 mg/kg) en el grupo CLI. Los resultados se presentan como media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(11,141)=37.41$ ) seguida de la prueba de Newman-Keuls \*  $p < 0.01$  vs su respectivo control basal; +  $p < 0.01$  comparación entre el grupo CON y el grupo CLI cuando se administra solución salina.



**Figura 16.** Efecto de la administración de oxotremorina a diferentes dosis en las ratas tratadas postnatalmente con clomipramina (CLI, n= 5) y solución salina (CON, n= 5) en ambas fases del ciclo luz-oscuridad. La actividad motora disminuyó de la misma manera en ambos grupos en cada una de las fases del ciclo-luz-oscuridad. ANOVA (F (11,57)=15.5034) seguida de Newman Keuls. Los resultados se muestran en media ± ee. \* p<0.01 respecto a la actividad motora basal.

El efecto de la administración de oxotremorina sobre la prueba de nado forzado o de Porsolt se muestra en la figura 17. Como se mencionó anteriormente, en condiciones basales (vehículo, solución salina) el tiempo de inmovilidad en los animales tratados postnatalmente con CLI fue significativamente mayor que en el grupo CON, en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad (F[15,93]= 6.004; p<0.0001). El tratamiento farmacológico con oxotremorina incrementó el tiempo de inmovilidad sólo en el grupo control. A diferencia del grupo control, en el grupo tratado postnatalmente con CLI el tiempo de inmovilidad no se modificó, observándose un valor similar al observado en condiciones basales en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad.

La respuesta hipotérmica al tratamiento farmacológico con diferentes dosis de oxotremorina (0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mg/kg. de peso) se observa en la Tabla 3. La administración de oxotremorina redujo la temperatura en las ratas control únicamente en la fase oscura. En contraste, en las ratas tratadas postnatalmente con CLI la temperatura disminuyó en ambas fases del ciclo luz-oscuridad con las diferentes dosis administradas.



**Figura 17.** Efecto de la administración de oxotremorina a diferentes dosis en las ratas tratadas postnatalmente con clomipramina (CLI; n= 6) y solución salina (CON n= 6) en la prueba de Porsolt en ambas fases del ciclo de Luz-oscuridad. El tiempo de inmovilidad se incrementó en el grupo control al mismo nivel que las ratas tratadas postnatalmente con CLI en las dos fases del ciclo de luz-oscuridad. Los resultados se presentan en media  $\pm$  ee. ANOVA ( $F(15,93)=6.004$ ,  $p < 0.0001$ ) seguida de Newman-Keuls. \* $p < 0.01$  respecto al tiempo de inmovilidad basal del grupo control; +  $p < 0.01$  comparación del tiempo de inmovilidad entre el grupo control y el experimental.

**Tabla 3.** Efecto de la administración de oxotremorina (mg/kg) sobre la respuesta de la temperatura rectal ( $^{\circ}\text{C}$ ) en las ratas CLI (n= 6) y en animales CON (n=6). La administración de oxotremorina induce una disminución de la temperatura rectal en la fase de luz. A diferencia de las ratas CON, la inyección de oxotremorina disminuye la temperatura en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. Los resultados se expresan en media  $\pm$  ee., ANOVA seguido de Newman Keuls. \* $p < 0.05$  con respecto a su basal.

	FASE DE LUZ				
	BASAL	0.2	0.4	0.8	1.6 (mg/kg)
CON	37.97 $\pm$ 0.10	37.2 $\pm$ 0.23	36.73 $\pm$ 0.35	36.73 $\pm$ 0.49	37.08 $\pm$ 0.48
CLI	37.95 $\pm$ 0.10	36.9 $\pm$ 0.12*	35.5 $\pm$ 0.19*+	36.21 $\pm$ 0.16*	36.25 $\pm$ 0.20*
	FASE DE OSCURIDAD				
CON	38.03 $\pm$ 0.10	36.3 $\pm$ 0.38 *	35.7 $\pm$ 0.35*	36.56 $\pm$ 0.26*	36.14 $\pm$ 0.28*
CLI	37.9 $\pm$ 0.14	36.7 $\pm$ 0.20*	35.11 $\pm$ 0.23*	36.06 $\pm$ 0.26*	36.03 $\pm$ 0.21*

## 10. DISCUSIÓN

Desde los primeros reportes de Mirmiran et al (1981) se sabe que el tratamiento postnatal (P8-P21) con CLI induce cambios conductuales permanentes que se manifiestan en la edad adulta. Estas alteraciones conductuales también se reportan con la administración postnatal de otros inhibidores de la recaptura de monoaminas, como la zimelidina y la imipramina, (Hilakivi y Sinclair 1986; Hilakivi y Hilakivi, 1987; Fernández Pardal y Hilakivi, 1989; Rosenwasser y Hayes, 1994). Aunque existe poca información referente a la participación de los sistemas de neurotransmisión en las alteraciones conductuales observadas en las ratas CLI, se ha sugerido que dichas alteraciones se deben a la interferencia de la clomipramina en el desarrollo y en la maduración normal de los diferentes sistemas de neurotransmisión. Es posible que la aparición de los diferentes estados conductuales alterados en las ratas CLI, sea resultado de la incapacidad del cerebro para compensar los efectos causados por la administración postnatal de clomipramina (Rodríguez y Broitman, 1983; Vogel y cols, 1990c).

La clomipramina es un fármaco con una potente capacidad inhibidora de la recaptura de la serotonina y noradrenalina, neurotransmisores que aparecen en el desarrollo temprano y cuyo mecanismo de recaptura es funcional desde el nacimiento, lo que lo hace farmacológicamente activo durante el periodo postnatal (Coyle y Axelrod, 1971; Karki y cols, 1962). Estudios sobre el desarrollo cerebral han revelado que las manipulaciones farmacológicas en un cerebro en desarrollo producen cambios de larga duración en los sistemas de neurotransmisión y en especial en la función monoaminérgica (Feestra y cols, 1996; Vijayakumar y Meti, 1999). Incluso se ha sugerido que estas manipulaciones alteran el número de los receptores presentes en los cerebros maduros (Whittaker-Azmitia, 1991). Es posible que la manipulación postnatal de la actividad de las aminas biogénicas, como es el caso del tratamiento postnatal con clomipramina, altere el proceso de maduración cerebral (Simpkins y cols, 1977), así como la relación recíproca con otros sistemas de neurotransmisión, como el sistema colinérgico (Butcher y Hodge, 1976). El presente estudio confirma la vulnerabilidad del sistema nervioso central durante el desarrollo temprano ante la exposición a la clomipramina cuya vida media en promedio es de 21 hrs (19-37 hrs) y la de su metabolito desmetilclomipramina con vida media

de 13.2 hrs, cuyos efectos a largo plazo se expresan en la edad adulta. Se ha observado que esta interferencia induce una disminución en la expresión del ARNm del transportador de serotonina (Hansen and Mikkelsen, 1998). Existen además estudios que muestran una disminución de los niveles de serotonina en el hipotálamo (Feenstra y cols, 1996), en la corteza frontal, en el hipocampo, en el tallo cerebral y en el septum (Vijayakumar y Meti, 1999; Zandio y cols, 2002) en las ratas tratadas con CLI, estructuras relacionadas de manera importante con la depresión. Lo anterior sugiere que la disminución de serotonina podría influir para que se presenten las anormalidades conductuales observadas en la edad adulta. Trabajos previos en el laboratorio han mostrado que la administración postnatal de clomipramina altera la actividad colinérgica y/o noradrenérgica en la conducta sexual masculina (Bonilla-Jaime y cols, 1998).

El mecanismo por el cual el tratamiento postnatal con clomipramina produce sus efectos a largo plazo hasta inducir todo el conjunto de alteraciones descritas arriba y que semejan el cuadro clínico de la depresión en la edad adulta ha sido poco investigado. La clomipramina es un antidepresivo que inhibe más fuertemente la recaptura de serotonina que la de noradrenalina (Zandio y cols, 2002). La serotonina influye diversos procesos durante el desarrollo cerebral, incluyendo neurogénesis, apoptosis, migración celular, desarrollo axónico y dendrítico, sinaptogénesis y plasticidad sináptica (Ver revisión: Whitaker-Azmitia, 2001). Además el sistema serotoninérgico alcanza su estado funcional en las etapas tempranas del desarrollo. Desde la etapa prenatal, los receptores serotoninérgicos son expresados por las neuronas y la glia a lo largo del desarrollo de las vías serotoninérgicas, además de que pueden ser reguladas por la exposición prenatal o postnatal a ligandos y drogas de los receptores a serotonina (Ver revisión: Whitaker-Azmitia, 2001). El mecanismo biológico utilizado por la serotonina para producir sus efectos sobre el desarrollo puede tener como blanco directo la estabilidad del citoesqueleto y en particular en la regulación y el mantenimiento de los microtubulos y microfilamentos que podría estar mediado por las llamadas proteínas asociadas a microtubulos (MAPs) (Ver revisión: Whitaker-Azmitia, 2001). Existen múltiples evidencias que involucran a los diversos receptores en estos efectos. Por ejemplo, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> aparece también en etapas tempranas y se encuentra en altos niveles en neuronas inmaduras e indiferenciadas, destinadas a convertirse en células gliales y neuronas, y decrece paulatinamente conforme estas

se desarrollan, lo que sugiere que que estos eventos son dependientes de la serotonina. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> induce maduración y estimula la liberación de la proteína S-100β, factor trófico importante en la extensión de las neuritas en diferentes tipos de neuronas (P.E. del tallo cerebral, del hipocampo, astrocitos corticales) permitiendo el desarrollo normal de estas regiones. Y que además regula el tamaño celular, la comunicación célula y célula, la traducción de señales intracelulares y el crecimiento celular (ver revisión Whitaker y Azmitia, 2001). Este receptor también participa en el ensamblaje del huso mitótico para promover la división celular e inclusive la tasa de diferenciación. Por otro lado, se ha postulado un periodo crítico del desarrollo cerebral alrededor del nacimiento para el humano y del día 7 al 21 postnatal (P7-P21) en la rata. Este periodo coincide con el pico de crecimiento cerebral y una exuberante producción de sinapsis (Anand y Scalzo, 2000). Si bien existen estudios que determinan el ARNm del receptores 5-HT<sub>1A</sub> no muestra cambio alguno, no se puede descartar que el tratamiento postnatal con clomipramina (del día P8-P21) que coincide con los eventos del desarrollo cerebral descritos arriba, podría modificar el equilibrio en las concentraciones de serotonina, sin descartar la noradrenalina, manteniendo un exceso del neurotransmisor durante este periodo crítico del desarrollo, pudiendo alterar el funcionamiento del receptor 5-HT<sub>1A</sub> u otros receptores implicados también en el desarrollo cerebral como el 5-HT<sub>2A</sub> o inclusive del mismo transportador de serotonina, (Ver revisión: Whitaker-Azmitia, 2001), y reduciendo o inhibiendo la síntesis de la proteína S-100β, u otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento neural, y en consecuencia la formación de microtubulos o en su caso del huso mitótico, derivando finalmente en el decremento en la formación de neuritas y sinapsis e inclusive alterando la división celular y la tasa de diferenciación. Estas modificaciones podrían a largo plazo inducir la expresión de las conductas alteradas observadas en estas ratas que las han sugerido como un modelo animal de depresión.

El transportador de serotonina es otro importante componente del sistema serotoninérgico involucrado en el desarrollo postnatal del sistema nervioso. En la rata, la densidad del transportador se incrementa entre el día P7 y alcanza su nivel máximo al P21 para decrecer progresivamente. Los niveles del transportador de la edad adulta se alcanzan al día P28 en áreas de proyección como el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo y la amígdala (Ver revisión:

Whitaker-Azmitia, 2001), todas ellas relacionadas con la depresión endógena. Se ha observado un incremento en el ARNm del transportador de serotonina al día 22, un día después que finaliza el tratamiento con CLI, sin embargo, cuando se analiza el ARNm al día 91 postnatal en las ratas CLI se observa una disminución del transportador (Hansen y Mikkelsen, 1998). Los bajos niveles de 5-HT encontrados en el hipotálamo (Feenstra y cols, 1996), en la corteza frontal, en el hipocampo, en el tallo cerebral y en el septum (Vijayakumar y Meti, 1999; Zandio y cols, 2002) en las ratas CLI se analizaron entre los 2-3 meses de edad. Este decremento en la función del transportador podría ser un mecanismo de compensación contra la disminución a largo-plazo en la liberación de 5-HT. Si el aumento en la concentración de 5-HT en el espacio sináptico durante los 14 días que se administra la clomipramina lleva a una reducción en el transportador de 5-HT y tal vez en una reducción en la concentración sináptica de 5-HT, esto podría ser el sustento sobre la disminución en los niveles de 5-HT involucrado en las conductas anormales. Cabe la posibilidad también que el incremento en la concentración de 5-HT durante la administración de CLI pudiera alterar también el funcionamiento del transportador al incrementar su actividad de recaptura del neurotransmisor y como consecuencia manteniendo los niveles disminuidos de 5-HT.

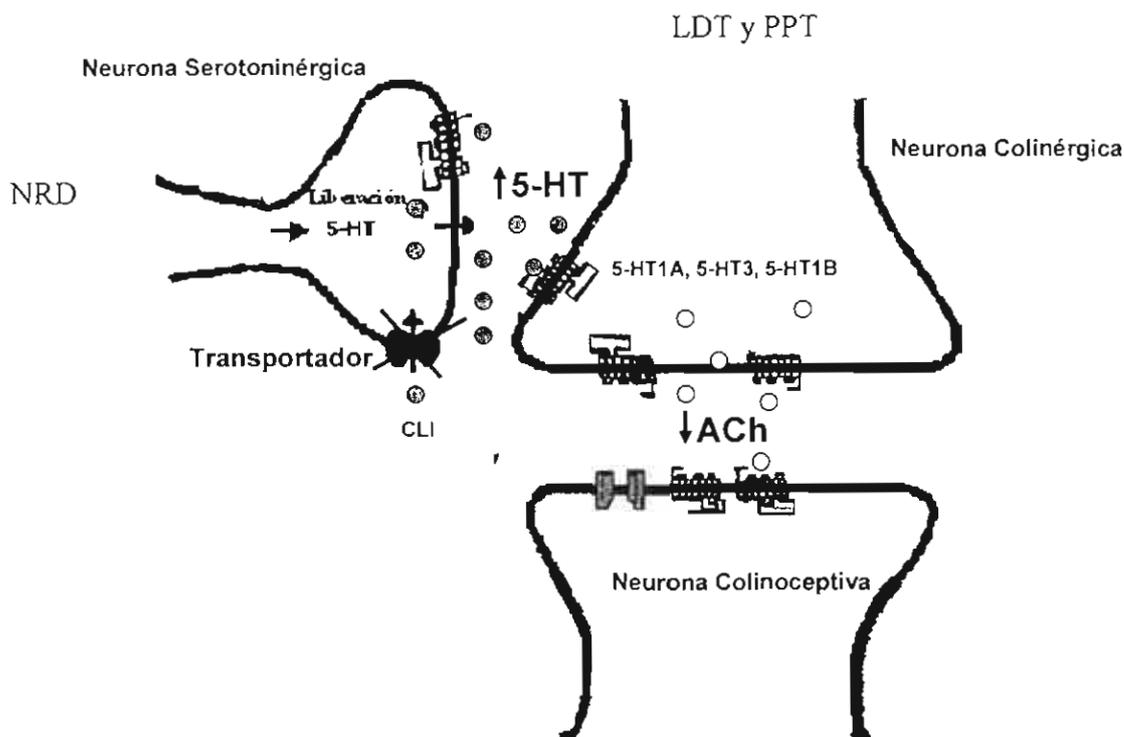
Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> regulan la liberación de 5-HT a través de inhibir el disparo neuronal. Se sabe que el disparo neuronal no solo es inhibido por la administración de agonista 5-HT<sub>1A</sub>, sino también por la administración de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), el cual induce una activación del autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> debido a un incremento inmediato en la concentración de 5-HT extracelular a nivel somatodendrítico (Piñeiro y Blier, 1999). La activación de los receptores somatodendríticos resulta en el cese de disparo neuronal y esto en una reducción en la liberación de serotonina en la terminal nerviosa. Sin embargo, después de un periodo de 2 a 3 semanas de tratamiento con ISRS induce una desensibilización de los autoreceptores, de esta manera el disparo y liberación de las neuronas se restaura, lo que conlleva a la liberación de 5-HT (Adrien, 2002). Por otro lado, el tratamiento postnatal con clomipramina disminuye la frecuencia del disparo neuronal en el núcleo del rafe dorsal (Yavari y cols, 1993) reflejando un déficit en la neurotransmisión 5-HT en diferentes regiones cerebrales involucradas en la depresión endógena (Feenstra y cols, 1996; Vijayakumar

y Meti, 1999; Zandio y cols., 2002) En las ratas tratadas con CLI no se observaron cambios en el ARNm del receptor 5-HT1A en el hipocampo y en el núcleo del rafe dorsal (Hansen y Mikkelsen, 1998) en el día 22 y 91 postnatal, sin embargo, no se puede descartar que exista una alteración en la funcionalidad de este receptor. Posiblemente la sensibilidad del receptor este alterada, pero no en una desensibilización como se induce por la administración de antidepresivos en ratas intactas en la edad adulta, sino por incremento en la sensibilidad del receptor que podría inducir una disminución en la liberación del neurotransmisor y ser un factor importante en las conductas anormales en la edad adulta.

Si bien parecería obvio el efecto de la clomipramina administrada postnatalmente sobre el desarrollo del sistema monoaminérgico por su capacidad de inhibir la recaptura de la serotonina y de la noradrenalina, su efecto sobre la privación de sueño MOR parece afectar al sistema colinérgico. Las interacciones entre los sistemas de neurotransmisión regulan diferentes conductas entre las que se encuentra el sueño MOR. Es posible que la alteración en un sistema, en este caso el serotoninérgico altere el funcionamiento de otros sistemas como el colinérgico. Se sabe que la clomipramina, además de tener capacidad inhibitoria de la recaptura de la serotonina y noradrenalina, también inhibe la aparición del sueño MOR, de ahí que también se ha sugerido que este efecto supresor del sueño MOR, inducido por la administración postnatal de clomipramina, provocaría las alteraciones conductuales observadas en la rata adulta. Dicha idea encuentra sustento en la hipótesis que considera que el sueño MOR juega un papel importante en el desarrollo cerebral normal (Mirmiran, 1981, 1986; Vogel y cols, 1990). Recientemente se ha observado que la privación postnatal de sueño MOR a través de métodos instrumentales no farmacológicos, como en el caso de las ratas CLI, también disminuye la actividad sexual, disminuye la actividad agresiva e incrementa el porcentaje de sueño MOR (Feng y Ma, 2002). Estos resultados apoyan la idea de que la privación postnatal de sueño MOR, instrumental o farmacológica, causa conductas depresogénicas como las anteriores, que permanecen por largo tiempo durante la edad adulta.

Es factible que la interacción recíproca que existe entre los sistemas monoaminérgico-colinérgico en el ciclo sueño-vigilia parece sugerir cómo el sistema colinérgico es alterado

cuando se modifica el funcionamiento monoaminérgico en las ratas CLI. Anatómicamente se sabe que las neuronas serotoninérgicas del núcleo del raqué dorsal proyectan al tegmento mesopontino del tallo cerebral, en donde se han identificado botones sinápticos serotoninérgicos que se encuentran asociados con neuronas colinérgicas del núcleo tegmental laterodorsal (LDT) y pedunculopontino (PPT; Luebke y cols, 1992; Morilak y cols, 1993; Semba y Fibiger, 1992), además de que estas estructuras, encargadas del mantenimiento del sueño MOR (Koyama y Kayama, 1993; Semba y Fibiger, 1992), son inmunorreactivas *in vitro* e *in vivo* a la serotonina, lo que indica la presencia de receptores serotoninérgicos en las neuronas colinérgicas (Kass, 1986; Luebke y cols, 1992). Aunque los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina no parecen bloquear directamente los receptores muscarínicos como tal, se ha determinado que la liberación de acetilcolina puede ser modulada por la serotonina (Maure y cols, 1989; Siniscalchi y cols, 1991). Saito y cols (1996) han demostrado que la liberación de acetilcolina parece estar regulada por el receptor inhibitorio 5HT1B localizado sobre la terminal nerviosa colinérgica. También se ha encontrado que el agonista del receptor 5-HT3 disminuye la liberación de acetilcolina (Crespi y cols, 1997). Además, la administración del 8-OH-DPAT, agonista 5-HT1A, inhibe a las neuronas colinérgicas que activan el sueño MOR (Thakkar y cols, 1998). Se ha propuesto que los inhibidores selectivos de la serotonina ejercen su efecto por disminuir la disponibilidad de acetilcolina o desviar el equilibrio acetilcolina-serotonina hacia esta última. La administración de imipramina un antidepresivo noradrenérgico disminuye la actividad de la acetilcolinesterasa en el hipocampo, sugiriendo una disminución en la liberación de acetilcolina (Camarini y Benedito, 1997). Posiblemente la administración de clomipramina reduce la liberación de ACh a través de activar los receptores serotoninérgico en las neuronas colinérgicas de los subtipos 5-HT3, 5-HT1B o en su caso del receptor 5-HT1A. Estos receptores sería el sitio de acción del tratamiento postnatal con clomipramina que alteraría la sensibilidad del sistema colinérgico y en consecuencia la expresión del sueño MOR (ver figura 18).



**Figura 18.** Posible mecanismo supresor de sueño MOR inducido por la administración de CLI en la etapa postnatal. La CLI bloquea la recaptura de 5-HT incrementando su viabilidad en el espacio sináptico. Este incremento en la concentración de 5-HT induce una disminución de ACh a través de los receptores 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT3 localizados en las neuronas colinérgicas de los núcleos PPT y LDT, dando como consecuencia un desequilibrio entre los dos sistemas de neurotransmisión dando como resultado la supresión o inhibición del sueño MOR. 5-HT=serotonina, CLI=clomipramina, ACh= acetilcolina, PPT= núcleo tegmental pedúnculo pontino, LDT= tegmento laterodorsal, NRD= núcleo del rafe dorsal.

Se ha determinado que pacientes con depresión manifiestan una mayor sensibilidad del sistema colinérgico responsable de la generación del sueño MOR y que se refleja en una disminución en la latencia de sueño MOR e incremento en la cantidad de sueño MOR (Ver revisión: Adrien, 2002). Estas alteraciones en el patrón de sueño MOR también se reflejan en las ratas CLI (Vogel y cols, 1990d). Se ha observado, además que al cesar la administración de CLI existe un rebote de sueño MOR hasta 14 días después, como un mecanismo compensatorio a la privación de sueño MOR (Mirmiran y cols, 1981; Feng y Ma, 2002). Se ha sugerido que los mecanismos para compensar la pérdida de sueño MOR podrían desarrollarse durante el

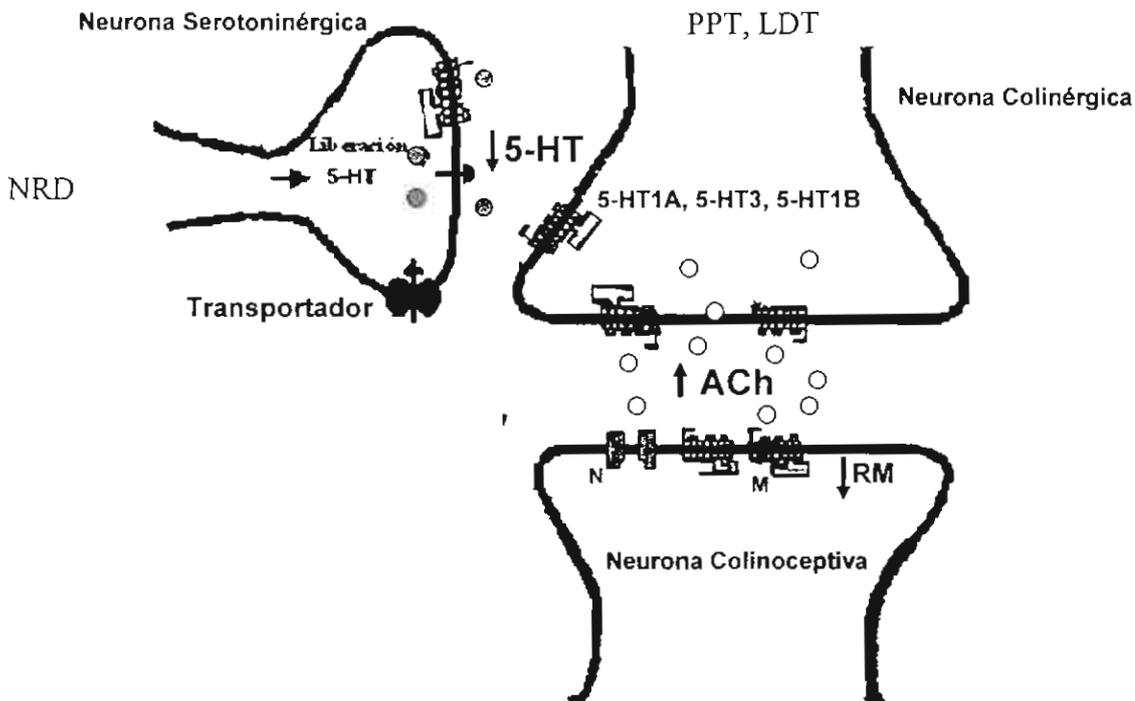
periodo comprendido entre la semana 2 y 4 postnatal (Feng y Ma, 2002). Conjuntamente, se ha observado que el tratamiento postnatal con clomipramina en la rata, reduce el sueño MOR (45-69%) con un posterior incremento de sueño NMOR (hasta de 45%) pero sin un aumento

proporcional de la vigilia, mientras que el mismo tratamiento, en la edad adulta, con la mayoría de los antidepresivos, incluyendo la clomipramina, disminuye el sueño MOR, acompañándose este efecto, por un incremento de la vigilia (Feng y Ma, 2002). Los autores sugieren que esta diferencia en la respuesta para compensar la privación postnatal de sueño MOR tanto farmacológica (con clomipramina) como instrumental, podría ser crucial en la generación del estado depresivo.

Una interrogante es pertinente ¿Cómo es que la administración de CLI, que inhibe la recaptura de serotonina, induce una sensibilidad en el sistema colinérgico en la edad adulta y altera la expresión y regulación del sueño MOR? Nosotros sugerimos que la administración de CLI del día 8 al 21 postnatal suprime el sueño MOR al inducir una mayor concentración de 5-HT en el espacio sináptico, lo que conlleva a una disminución en los niveles de ACh. Cuando se presentan el rebote de sueño MOR la liberación de ACh se incrementa en el PPT y LDT mientras que en el núcleo del rafe dorsal disminuye la liberación de 5-HT. Este incremento en la liberación de ACh como un mecanismo de compensación de la privación de sueño MOR podría tener efecto de larga duración en regiones que regulan el sueño MOR e inducir una latencia corta de sueño MOR y una mayor cantidad de este. Este incremento en la liberación de ACh también podría alterar regiones como el hipocampo e hipotálamo, estructuras ricamente inervadas por los núcleos colinérgicos, que regulan al eje HHA a través de inducir una regulación de los receptores muscarínicos hacia abajo (down-regulation) (ver figura 19).

En resumen, el tratamiento postnatal con CLI modifica la actividad serotoninérgica (Feestra y cols, 1996; Vijayakumar y Meti, 1999) y/o colinérgica (Prathiba y cols, 2000; Vijayakumar y Datta, 2002) y/o noradrenérgica (Bonilla-Jaime y cols, 1998) en diferentes regiones cerebrales relacionadas con la depresión (Zandio y Ferrin, 2002), mismas que parecen estar involucradas en regular las diferentes conductas que se encuentran alteradas en las ratas CLI adultas.

## REBOTE DE SUEÑO MOR



**Figura 19.** Posible mecanismo del rebote de sueño MOR posterior a la administración de CLI en la etapa postnatal. Al término del tratamiento con CLI, la 5-HT va disminuyendo su concentración en el espacio sináptico por efecto del desbloqueo del transportador. El efecto inhibitorio que ejerce la neurona serotoninérgica sobre la liberación ACh se abole al disminuir la concentración de 5-HT dando como consecuencia un incremento en la liberación de ACh de los núcleos colinérgico PPT y LDT y como resultado el rebote de sueño MOR. 5-HT=serotonina, CLI=clomipramina, ACh= acetilcolina, PPT= núcleo tegmental pedúnculo pontino, LDT= tegmento laterodorsal, NRD= núcleo del rafe dorsal, sueño MOR= sueño de movimientos oculares rápidos.

### 10.1. Validación del modelo animal de depresión.

Los resultados del presente trabajo muestran que las ratas CLI presentan marcadas alteraciones en los diferentes parámetros de la conducta copulatoria, tanto en su aspecto motivacional como ejecutorio, mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en las versiones de 15 y 5 minutos (Vogel y cols, 1990, Porsolt y cols, 1979, Bonilla-Jaime y cols, 1998) y alteraciones en la actividad circádica de liberación de corticosterona en la edad adulta. En contraste, la

actividad motora no muestra cambio en comparación con los animales controles.

El tratamiento postnatal con CLI induce alteraciones conductuales en la edad adulta (Mirmiran y cols, 1981). Estos cambios conductuales en las ratas tratadas con CLI tienen características equivalentes a la depresión endógena humana (Vogel y Vogel, 1982), entre las que se encuentran: alteraciones del patrón de sueño MOR y de la actividad motora, disminución de la conducta sexual, de la agresividad y de las conductas de búsqueda de placer (Bonilla-Jaime y cols, 1998; Neill y cols, 1990; Vogel y cols, 1982, 1990a, 1990b, 1990c, 1990d). Estudios realizados en el laboratorio mostraron que las ratas CLI, muestran un bajo porcentaje de sujetos activos que despliegan montas, intromisiones y eyaculaciones, así como alteraciones en los diferentes parámetros de la conducta sexual como son las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación incrementadas y disminución de la frecuencia de eyaculación, además de alargar el intervalo interintromisión e intercopulatorio (Bonilla-Jaime, y cols, 1998). Estas alteraciones de la conducta sexual masculina en la rata macho debidas al tratamiento postnatal con CLI concuerdan con los resultados reportados en estudios previos (Bonilla-Jaime y cols, 1998; Mirmiran y cols, 1981; Neill y cols, 1990; Velázquez-Moctezuma-Díaz Ruíz, 1992; Vogel y cols, 1996). Además nuestros resultados muestran que durante las pruebas de entrenamiento, el porcentaje de sujetos que despliegan cada uno de los componentes copulatorios se estancan, aún cuando se someten a una cuarta prueba de prueba de conducta sexual. Mientras el porcentaje de sujetos en el grupo CON alcanzan el 96 % desde la segunda prueba de conducta sexual. Estos resultados podrían indicar que existe una incapacidad de las ratas CLI para alcanzar una actividad copulatoria óptima a través de la experiencia, lo que se refleja en una deficiencia en la actividad copulatoria posiblemente como expresión de la anhedonia, como la observada en sujetos deprimidos. Por otro lado, se ha sugerido que las alteraciones en la conducta sexual masculina en este modelo son mediadas por la alteración de los sistemas colinérgico y/o noradrenérgico (Bonilla-Jaime y cols, 1998), sistemas que, como ha sido documentado extensamente, regulan la conducta sexual en la rata macho (Smith y cols, 1987; Bitran y Hull, 1987; Clark y cols, 1984; Clark y Smith, 1987) y que participan en la etiología de la depresión (Kandel y Schwartz, 1991, Zandio, 2002).

Los resultados obtenidos sobre el tiempo de inmovilidad en la prueba Porsolt o de nado forzado corroboran los resultados de trabajos anteriores realizados en el laboratorio (Velázquez-Moctezuma y Díaz-Ruíz, 1992). Hallazgos similares han sido reportados en ratas tratadas postnatalmente con otros bloqueadores de la recaptura de monoaminas (Hilakivi y Hilakivi, 1987; Fernández-Pardal y Hilakivi, 1989). La prueba de Porsolt se ha convertido en la prueba más ampliamente utilizada para evaluar los efectos conductuales de drogas antidepresivas en modelos animales como la rata (Porsolt y cols, 1977; Armario y cols, 1988; Lucki, 1997). Esta prueba es sensible a todas las clases de antidepresivos, incluyendo los tricíclicos (p.e. imipramina y desimipramina), los inhibidores selectivos de serotonina (p.e. fluoxetina) y de noradrenalina (p.e. reboxetina), los inhibidores de la amino oxidasa (p.e. tranilcipromina y clorgilina) y los antidepresivos atípicos (p.e. iprindol, buspirona, mianserina y nomifensina) (Borsini y Meli, 1988; Cesana y cols, 1993, Nixon y cols, 1994; Bourin y cols, 1996; Redrobe y cols, 1996; Da-Rocha y cols, 1997; Sanchez y Maier, 1997).

La prueba de nado forzado fue considerada originalmente como un modelo animal de depresión (Porsolt y cols, 1977; 1981) con un importante nivel de validez predictiva, mientras que la conducta de inmovilidad fue vista como un reflejo del retardo psicomotor o de la anergia mostrada por muchos pacientes deprimidos, lo que le daba un cierto nivel de validez de apariencia, sin embargo, su sustento teórico ha sido controversial. Se ha sugerido que la prueba de nado forzado muestra cierta similitud con otros modelos como el desamparo aprendido, en cuanto a la incapacidad del sujeto para escapar a la situación estresante, de ahí que a la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado se le llamara desamparo conductual. Formulaciones teóricas más recientes han sugerido otras relaciones conductuales que dan sustento teórico importante a diversos modelos conductuales de depresión, como el caso de la prueba de nado forzado (Dixon, 1998; Gilbert y Allan, 1998). En este sentido se ha propuesto que los síntomas psicopatológicos de la depresión pueden estar relacionados con la activación de mecanismos de defensa para responder a la amenaza y a la pérdida de control (p.e. conducta de inmovilidad). De esta manera, la inmovilidad conductual en la prueba de nado forzado es un mecanismo de defensa que libera al animal del estrés del nado forzado y que le permite alternar

la postura de inmovilidad con otras conductas de escape activo (nado y escalamiento) como parte de una estrategia para enfrentar al estrés (coping; Thierry y cols, 1984) o alternativamente, como reflejo de un estado específico del repertorio defensivo de los mamíferos conocido como interrupción del escape (“arrested flight”), que involucra la supresión de conductas exploratorias, para buscar escapar de la situación de estrés, como el nado y el escalamiento, y la adopción de posturas crípticas estáticas, como la inmovilidad, que protegen y permiten la vigilancia continua del medio que lo rodea, estas conductas se han correlacionado con el constructo psicológico de entrapamiento (“entrapment”) observado y evaluado recientemente en la depresión endógena humana (Dixon, 1998; Gilbert y Allan, 1998; Fullilove, 2002). En el contexto humano, la interrupción del escape o de la posibilidad de escapar (“arrested flight”), ha sido ligada al suicidio (Baumeister, 1990). Así, las bases teóricas de la inmovilidad conductual en la PNF pueden ser relacionadas con las variaciones en la depresión conductual inducida por el estrés como reflejo de conductas defensivas, como la interrupción del escape y el entrapamiento, observados en pacientes con depresión, lo que le proporcionaría al modelo de nado forzado no solo un importante valor predictivo sino un importante sustento teórico y de apariencia.

Originalmente se sugirió que la inmovilidad evaluada en la prueba de Porsolt reflejaba un bajo estado de ánimo o de desesperanza, pues esta conducta se reduce con el tratamiento con antidepresivos efectivos para aliviar la depresión en humanos (Porsolt y cols, 1979). Otros autores han propuesto que la conducta de inmovilidad es un reflejo del retardo psicomotor o de la anergia mostrada por muchos pacientes deprimidos (Djuric y cols, 1999). Por lo que se ha sugerido que la cantidad de inmovilidad podría ser considerada como indicador de una conducta similar a la depresión (Djuric y cols, 1999; Velázquez-Moctezuma y Díaz-Ruiz, 1992). De este modo, se ha sugerido que la prueba de Porsolt puede ser utilizada para la determinación del estado conductual de la rata y para la validación de los modelos animales de depresión (Hédou y cols, 2001), además de ser una prueba de cernimiento con importante selectividad para drogas antidepresivas (Porsolt y cols, 1979).

El procedimiento usado originalmente por Porsolt (1977) fue modificado por Lucki y

cols, (1997) para evaluar las conductas activas. A diferencia del procedimiento original, no permite que el animal apoye sus patas en el fondo pero ocasionalmente puede apoyar la cola conteniendo agua a 25°C con una profundidad de 30 cm. Además de evaluar el tiempo de inmovilidad se analiza también las conductas activas como el nado y el escalamiento que presentan las ratas. Se ha determinado que la administración de fármacos antidepresivos que ejercen su efecto principalmente en el sistema 5-HT como los ISRS reducen el tiempo de inmovilidad a consecuencia de incrementar el nado, mientras que la administración de los ISRN (inhibidores selectivos de noradrenalina) disminuyen la inmovilidad a consecuencia de aumentar el escalamiento (Lucki y cols, 1997). Recientes trabajos en el laboratorio muestran que el tratamiento con un ISRS, fluoxetina, reducen el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado tanto en ratas control como en el modelo animal de depresión de las ratas CLI, estos resultados sugieren también que este efecto es mediado por algún mecanismo que involucra al sistema serotoninérgico. Las ratas CLI muestran alteraciones del sistema serotoninérgico, expresadas en el incremento en el tiempo de inmovilidad y en valores de nado menores que las ratas tratadas neonatalmente con solución salina. Este dato conductual apoya las observaciones sobre la disminución de la actividad neuronal del núcleo del rafe (Yavari y cols, 1993), así como disminución en la expresión del transportador de serotonina, en este mismo núcleo, que podrían resultar en una alterada neurotransmisión serotoninérgica en el sistema nervioso central de las ratas CLI (Hansen y Mikkelsen, 1998).

Los altos niveles de corticosterona observados en las ratas CLI podrían tener un papel importante en el incremento del tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt. Se ha considerado que el desarrollo del tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt depende fundamentalmente de la presencia de los corticosteroides y de los sistemas de neurotransmisión que participan en la postura de inmovilidad (Jefferys y cols, 1983). Se ha observado que las ratas adrenalectomizadas presentan un déficit para desarrollar inmovilidad, misma que se revierte con la administración de corticosterona en altas dosis (Jefferys y cols, 1983), mientras que el bloqueo de los receptores para glucocorticoides con la administración del RU 38486 en el giro dentado del hipocampo bloquea la inmovilidad (De Kloet y cols, 1988). Es posible que los altos niveles de corticosterona en las ratas CLI, después de iniciar la prueba de nado

forzado, promuevan procesos que participan en la consolidación de la adquisición de información (p.e. que no hay posibilidad de escape) e influya en el incremento en el tiempo de inmovilidad. Acorde con lo anterior, se ha mostrado en el modelo de desamparo aprendido, que la inactividad conductual durante la exposición a choques eléctricos, sin la posibilidad de escape, está asociada también con altos niveles de corticosterona (Báez y cols, 1996).

Comúnmente, en la depresión endógena se observan alteraciones del movimiento (enlentecimiento o agitación; Nelson y Charney, 1981). Los resultados de este trabajo no mostraron cambios en la actividad motora en este modelo animal de depresión. En contraste, Mirmiran y cols, (1981) observaron que las ratas CLI presentan hiperactividad en la prueba de campo abierto. Sin embargo, se han observado inconsistencias al evaluar esta conducta en las ratas CLI en diversos reportes: mientras que algunos autores citan elevada actividad en la prueba de campo abierto (Hartley y cols, 1990), otros no observan cambio alguno (File y Tucker, 1983; Vogel y cols, 1996). Algunos autores sugieren un efecto dependiente de la cepa y de la dosis de clomipramina utilizada en el tratamiento postnatal. Por otra parte, el grupo de Hartley en 1990, observó que el tratamiento postnatal con clomipramina sólo modifica la actividad ambulatoria a los tres meses de edad, sin que esta alteración se establezca en los siguientes meses (el 5 y 7 mes), por lo que ellos concluyen que la administración de CLI en la etapa postnatal no afecta la actividad ambulatoria. Los presentes resultados concuerdan con los autores que el tratamiento postnatal con CLI no afecta este parámetro, por lo que se concluye que la evaluación de la actividad motora no tiene utilidad para validar el estado depresivo en este modelo animal de depresión. Sin embargo, los resultados en la actividad motora refleja que la disminución en la actividad sexual y el incremento en el tiempo de inmovilidad no son consecuencias por un problema a nivel motor.

#### **10.1.1. Variaciones circádicas de corticosterona.**

Desde hace mucho tiempo se sabe que cerca del 50% de los pacientes que sufren de depresión mayor presentan una elevación sustancial de los niveles basales de cortisol plasmático durante las 24 horas del día, signo que se considera un marcador biológico de este padecimiento (Gold y cols, 1986; Sachar y cols, 1973; Rubin y cols, 1989). De hecho, la

actividad general del eje HHA refleja alteraciones en su variación diurna en pacientes con depresión. En este estudio se observó que la curva de secreción de corticosterona (la contraparte del cortisol en humanos) en las ratas CLI, presenta un incremento al inicio y a la mitad de la fase de luz, sin cambio alguno en la fase oscura del ciclo de luz-oscuridad. A diferencia de los humanos, en los animales de hábitos nocturnos, como la rata, se observa un patrón circádico en los niveles plasmáticos de corticosteroides invertido, con un pico máximo de corticosterona al inicio de la fase oscura, poco antes del periodo de actividad nocturna, y valores más bajos al inicio de la fase luminosa o de inactividad (Critchlow y cols, 1963). El incremento en los niveles de corticosterona en las ratas CLI en la fase de luz (fase de reposo) semeja las alteraciones en la actividad circádica de cortisol basal que presentan los pacientes con depresión, caracterizada por un incremento en los niveles de cortisol basal durante la noche (fase de reposo en humanos; Gold y cols, 1986; Sachar y cols, 1973; Rubin y cols, 1989). Existen otros estudios en modelos animales de depresión en los que se muestran resultados similares como en el modelo de bulbectomía olfatoria bilateral (Marcilhac y cols, 1997) y las ratas Wistar Kyoto modelo de depresión genético (Solberg y cols, 2001). Estos resultados permiten sugerir que el modelo de ratas CLI es un modelo apropiado para investigar las anormalidades del eje HHA observadas en la depresión humana. Además que el tratamiento postnatal con CLI o con otros inhibidores de la recaptura de monoaminas induce también cambios de larga duración en otros ritmos circádicos como la actividad motora (Yanielli y cols, 1998), el patrón de sueño (Mirmiran et al 1981) o el consumo de agua (Rosenwasser y Hayes, 1994).

La prueba de supresión con dexametasona (DST) es una prueba de laboratorio estandar en psiquiatría que refleja la severidad de la depresión que permite analizar la integridad del eje HHA en pacientes deprimidos (Willner, 1985). La prueba de supresión con dexametasona es el marcador de estado más estudiado en la depresión y consiste en administrar 1 mg de dexametasona a las 11 p.m y determinar los niveles de cortisol a las 8 a.m. y 4 p.m. del siguiente día. La no supresión está asociada con rasgos endógenos, melancólicos y tiene lugar cuando el paciente está en periodo sintomático y la normalización se acompaña generalmente del mejoramiento de la patología. El 50% de los pacientes deprimidos exhiben no-supresión de

la secreción de cortisol luego de la administración de dexametasona. La normalización de esta respuesta es un marcador de rasgo de mejoramiento, señalando la eficacia del tratamiento antidepresivo administrado. La Dexametasona, un glucocorticoide sintético, se liga a los receptores glucocorticoideos localizados en la hipófisis anterior, reduciendo así la secreción de ACTH y, en última instancia, la producción de cortisol. La prueba de supresión con dexametasona permite sugerir que la alteración del eje HHA en los pacientes con depresión puede ser a nivel del hipotálamo o en regiones superiores como el hipocampo (Carroll y cols, 1976). Uno de los pocos estudios realizados en las ratas CLI con relación a la regulación del eje HHA, reporta un incremento en los niveles de corticosterona basal previa a la prueba de supresión de corticosterona por dexametasona (DST) y una incapacidad para suprimir los niveles de corticosterona en respuesta a este glucocorticoide sintético (Prathiba y cols, 1998). Sin embargo, cuando las ratas tratadas con CLI se someten a la privación de sueño MOR, como un tratamiento antidepresivo, los niveles de corticosterona se normalizan y se suprimen en respuesta a la DST. Estos resultados permiten sugerir que el incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona en las ratas CLI posiblemente se debe a una alteración en el control de la retroalimentación negativa del eje HHA, misma que se observa en los pacientes depresivos con hipercortisolismo. Dado que la dexametasona no suprime los niveles altos de corticosterona en las ratas CLI sugiere que hay una alteración en la retroalimentación negativa. Además de ser una prueba que mide el retraso en el control de la retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis (De Kloet y cols, 1991) y que el eje HHA se normaliza ante un tratamiento antidepresivo como la privación de sueño MOR (Prathiba y cols, 1998). Esta alteración podría ser a nivel del hipocampo, del hipotálamo y de la misma hipófisis.

El incremento en la concentración basal de corticosterona en las ratas CLI posiblemente sea el resultado de una alteración en la retroalimentación negativa. Esta alteración puede estar mediada por el hipocampo, el cual es el principal sitio de control de la regulación del eje HHA dentro del sistema nervioso central (Barden y cols, 1995). Una disminución en el número de receptores a glucocorticoides y a mineralocorticoides en esta región, causado por el mal funcionamiento del sistema que regula la expresión del gen de ambos receptores, podría ser un factor causal en la acción de retroalimentación negativa alterada de corticosterona en las ratas

CLI, misma que se observa en pacientes que sufren de depresión severa (Barden y cols, 1995). Se ha propuesto que el sistema serotoninérgico juega un papel importante en la retroalimentación negativa de los corticosteroides sobre la función del eje HHA. Se ha observado que una disminución en los niveles de serotonina en el hipocampo atenua la retroalimentación que ejercen los corticosteroides sobre el eje HHA a través de disminuir el número de receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides (Brady y cols, 1991). Acorde con esto se ha determinado que los animales tratados con antidepresivos muestran un incremento en el ARNm de los receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides. (Brady y cols, 1991). Así, la acción de los antidepresivos sobre los receptores a corticosteroides esta estrechamente relacionada con el mejoramiento de la depresión (Barden y cols, 1995). Además se ha propuesto que la administración de fármacos antidepresivos normaliza los niveles de cortisol al incrementar la concentración de los receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides en las células hipocampales (Barden y cols, 1995). Es posible que una disminución en la actividad serotoninérgica en las ratas CLI atenua la retroalimentación negativa que ejercen los receptores a glucocorticoides y a mineralocorticoides sobre la liberación del CRH hipotálamico. Esto como consecuencia de una reducción en la expresión de los receptores a glucocorticoides y a mineralocorticoides a nivel del hipocampo (Vijayakumar y Meti, 1999; Zandio y Ferrin, 2002) y del hipotálamo (Feestra y cols, 1996). La atenuación en la retroalimentación negativa que induce incremento en la secreción de CRH estimula la actividad del eje HHA e incrementa los niveles de glucocorticoides. Cuando las ratas CLI son expuestas a un tratamiento antidepresivo conductual (privación de sueño MOR), los niveles de corticosterona se normalizan después del tratamiento (Prathiba y cols, 1998). Se ha encontrado que la privación selectiva de sueño MOR (por 4 días) o la privación total por 24 hrs incrementa los niveles de 5-HT a través de inducir una desensibilización de los autoreceptores 5-HT1A (Adrien, 2002). Esto parece reflejar que el aumento en los niveles de 5-HT por efecto de la privación de sueño MOR, incrementa el número de receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides dando como resultado la normalización en los niveles de corticosterona.

Como ya se ha mencionado, los receptores a mineralocorticoides son sensibles a bajos niveles de corticosterona, mientras que los receptores a glucocorticoides son sensibles a los

niveles altos de corticosteroides como en el pico circádico y en la respuesta de estrés. Cabe la posibilidad también de que haya una disminución en la sensibilidad de los receptores a mineralocorticoides en el hipocampo. Esto podría explicar que los niveles de corticosterona al inicio de la fase de luz sean mayores en las ratas CLI. En el caso de los receptores a glucocorticoides en el hipocampo e hipotálamo podrían tener una sensibilidad igual o mayor que en las ratas CON, ya que no se observa diferencia cuando los niveles alcanzan la acrofase. Esta alteración en la sensibilidad de los receptores podría a su vez modificar la secreción de CRH, así como de la ACTH vía CRH, resultando en un exceso de la corticosterona en la fase luminosa. Existe también la posibilidad de que el incremento en los niveles de corticosterona en las ratas CLI, se deba a una desensibilización de los receptores a CRH en las células corticotróficas y/o a una mayor sensibilidad de la glándula adrenal a la ACTH en la fase de luz.

Los resultados del análisis del ritmo de secreción de cortisol indican un avance de fase de dos horas, una disminución en la amplitud, así como un incremento en el nadir y en el mesor (Fig. 11). Varias observaciones sugieren una relación entre las alteraciones en la función circádica y la depresión. Numerosos estudios en pacientes deprimidos han encontrado alteraciones en diferentes ritmos circádicos, incluyendo temperatura, ciclo sueño-vigilia, y en la secreción de melatonina y cortisol (ver revisión: Bunney y Bunney, 2000). Tanto en pacientes deprimidos como en algunos modelos animales (Ratas Flinders y bulbectomizadas) las alteraciones de fase, periodo, amplitud y coherencia han sido documentadas, sin embargo no se ha establecido una relación causa-efecto. Una de las anormalidades en el ritmo más consistentes en la depresión ha sido un nadir (niveles mínimos de corticosterona) temprano en la hipersecreción de cortisol. La sincronización del nadir parece estar bajo control genético y no ser influenciado por factores ambientales mientras que el nivel medio de secreción de corticosterona y la sincronización del pico matutino (la acrofase) son influenciados por el medio ambiente. De esta manera el nadir es un importante marcador de la fase circádica en humanos que además sugiere un avance de fase en pacientes deprimidos. También se ha observado que los pacientes deprimidos muestran una amplitud del ritmo de temperatura y de secreción de melatonina disminuidos. Los resultados del presente trabajo, sobre el ritmo de secreción de corticosterona sugieren de manera importante que el modelo de las ratas CLI

refleja alteraciones circádicas análogas a las observadas en pacientes con depresión y en consecuencia proporcionan un mayor nivel de validez de apariencia al reproducir uno de los signos del trastorno.

Uno de los mecanismos que mantiene los niveles de glucocorticoides plasmáticos estables en todo momento, es el núcleo supraquiasmático, quien regula el ritmo circádico de actividad basal de cortisol (Bunney y Bunney, 2000). La eficacia de terapéutica de los inhibidores selectivos de serotonina han sugerido que el sistema serotoninérgico está involucrado en el trastorno depresivo. Existen múltiples evidencias que apoyan el papel modulador de la serotonina en la regulación de la ritmicidad circádica en los mamíferos. El núcleo supraquiasmático contiene uno de los plexos serotoninérgicos más densos en el cerebro y recibe muchas aferencias del núcleo del rafe medio (ver revisión: Morin, 1999). Este sistema podría ser el sustrato anatómico por el cual los trastornos afectivos alteran al sistema circádico en los pacientes deprimidos y en modelo de las ratas CLI. La pérdida de neuronas serotoninérgicas en el rafe medio produce un inicio tardío de la fase de actividad nocturna, un alargamiento de la fase de actividad y un incremento de la sensibilidad del ritmo circádico ante la luz. El mecanismo sugerido involucra a los receptores presinápticos 5-HT<sub>1A</sub> y 1B y a los receptores postsinápticos 5-HT<sub>7</sub> en el tracto hipotalámico retinal. La activación de estos receptores disminuye el efecto de la luz sobre el núcleo supraquiasmático reduciendo así la respuesta a la misma (ver revisión: Morin, 1999). Otros trabajos también han implicado al transportador de serotonina sobre estos efectos (Morin, 1999). La mayor evidencia de esta relación entre la serotonina y las alteraciones circádicas en la depresión se han originado de estudios sobre la depresión estacional. Este trastorno se caracteriza por recurrentes ciclos de depresión durante el otoño-invierno que remiten durante la época de primavera-verano. La naturaleza estacional de los síntomas sugiere inmediatamente un papel importante del sistema circádico como mediador de los cambios conductuales y fisiológicos de una estación a otra. Además de que este trastorno es tratado con éxito con la exposición a luz brillante (Morin, 1999). Sin embargo el papel del sistema circádico en los trastornos afectivos está en debate y abierto a su investigación, por lo que el modelo de las ratas CLI es una opción viable para ello.

En resumen, el tratamiento postnatal con CLI altera la conducta sexual a través de modificar los sistemas de neurotransmisión ACh y NA en el APOm que recibe inervaciones del locus coeruleus y el núcleo del rafe dorsal, neurotransmisores que están alterados en las ratas CLI. Por otro lado, se ha sugerido que la prueba de Porsolt puede usarse para la determinación del estado conductual de la rata y para la validación de los modelos animales de depresión. El incremento en la concentración basal de corticosterona en las ratas CLI posiblemente sea el resultado de una alteración en la retroalimentación negativa. Esta alteración puede estar mediada por una disminución en el número de receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides y/o en la sensibilidad de los mismos, así como una disminución en la sensibilidad de las células corticotróficas al CRH a nivel de la hipófisis, como un incremento en la sensibilidad de la glándula adrenal.

## **10.2. Estimulación del eje HHA**

### **10.2.1. Por actividad copulatoria**

Existe poca información respecto a la respuesta endocrina a diferentes estímulos en este modelo animal de depresión, específicamente la conducta sexual. El estudio de la activación del eje HHA evaluada a través de los niveles plasmáticos de corticosterona después de la conducta sexual en el presente trabajo es uno de los primeros en llevarse a cabo en un modelo animal de depresión. Los resultados muestran un efecto estimulador de la liberación de corticosterona inducido por la actividad copulatoria tanto en el grupo control como en las ratas CLI. Sin embargo, la respuesta del eje HHA es significativamente menor en las ratas CLI. Estudios en la rata macho intacta muestran que la actividad sexual *per se* es capaz de incrementar significativamente los niveles plasmáticos de esta hormona (Retana-Márquez y cols, 1998; Szechtman y cols, 1974). Los resultados en los animales control corroboran estos reportes y son consistentes con otros estudios realizados en el ratón (Bronson y Desjardins, 1982), el caballo (Rabb y cols, 1989; Colborn y cols, 1991), el cerdo (Borg y cols, 1991) y en anfibios (Orchinik y cols, 1988)

Por otra parte, el significado fisiológico del incremento en los niveles plasmáticos de

corticosteroides en respuesta a la conducta sexual no ha sido aclarado. En el ratón se ha sugerido que los cambios en los niveles de corticosterona pueden ser un reflejo directo del proceso de activación (Bronson y Desjardins, 1982). Para el caballo, sin embargo se ha propuesto que el componente físico de la excitación sexual puede ser el principal factor del incremento en los niveles de cortisol (Colborn y cols, 1991). En el caso de la rata, Szechtman y cols, (1974) sugieren que la razón de este incremento puede ser debido a una baja habituación a un estímulo novedoso, como una hembra receptiva. Es probable que el incremento en los niveles de corticosterona en las ratas machos intacta sexualmente expertas ante las diferentes condiciones copulatorias pueda ser debido al proceso de activación sexual como se ha sugerido (Bronson y Desjardins, 1982). Se ha propuesto que la activación sexual presenta diversas manifestaciones conductuales y endocrinas, por ejemplo la activación del eje HHA (Bronson y Desjardins, 1982), que se expresa en un incremento en los niveles de corticosterona que estimula el olfateo (Morely and Levine, 1982), la conducta exploratoria (Takahashi y cols, 1989), la atención, la motivación (De Wied, 1980), el alertamiento (Vázquez-Palacios y cols, 2001) y otras conductas que podrían participar en un proceso de preparación o anticipación a las demandas físicas propias de la actividad copulatoria. Cabe la posibilidad que el incremento en los niveles de corticosterona en las ratas macho que no alcanzaron una cópula exitosa (machos separados por una rejilla y con hembras obstruidas en la vagina) sea debido a un factor ansiogénico al no poder completar la conducta sexual de manera total. Sin embargo, no es posible concluir al respecto, por lo que son necesarios más estudios para poder dilucidar el papel que desempeña la corticosterona sobre la conducta sexual. Por otro lado, la baja respuesta en los niveles de corticosterona en las ratas CLI que alcanzan a eyacular hasta dos veces podría ser debido a que la capacidad de respuesta en las ratas CLI después de que se inicia la cópula se modifique conforme transcurre en el despliegue de la conducta sexual.

El déficit de la actividad copulatoria y la baja respuesta en los niveles de corticosterona en los animales CLI pudieran estar participando factores que regulan la liberación de corticosterona y a su vez la conducta sexual. Entre los que se encuentran los sistemas de neurotransmisión noradrenérgico (NA), colinérgico (ACh) y serotoninérgico (5-HT), neurotransmisores que tiene gran importancia en la etiología de la depresión. Tanto la NA

como la ACh tienen un papel facilitador en la conducta sexual masculina (Mc Intosh, 1984a, 1984b; Bitran y Hull, 1987, Retana-Márquez y Velázquez-Moctezuma, 1993), mientras que la serotonina inhibe la conducta sexual (Lorrain y cols, 1997). En el caso del eje HHA, los diferentes neurotransmisores mencionados previamente inducen la liberación del CRH en el núcleo paraventricular (Calogero y cols, 1988).

El tratamiento con CLI induce cambios de larga duración en la función de las aminas biogénicas y en su interacción con otros sistemas de neurotransmisión vinculados con la etiología de la depresión, en la regulación de la conducta sexual y en la activación del eje HHA. Diversos estudios reportan que las ratas CLI presentan bajos niveles de serotonina en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el hipotálamo y el hipocampo (Feenstra y cols, 1996; Vijayakumar and Meti, 1999), así como actividad alterada en el sistema colinérgico (Prathiba y cols, 1995). Aunado a esto trabajos previos en el laboratorio, sugieren que el tratamiento postnatal con CLI induce alteraciones en la conducta sexual masculina a través de modificar el sistema ACh y/o NA, sin alterar al sistema serotoninérgico (Bonilla-Jaime y cols, 1998). Considerando lo anterior es posible que la alteración en los sistemas de neurotransmisión que juegan un papel facilitador en la conducta sexual como NA y ACh modifique la regulación que ejercen en estructuras como el área preóptica media (APOm), área cerebral de importancia crítica en la regulación de la conducta sexual masculina (Meisel y Sachs, 1994), involucrada en los aspectos tanto motivacionales como en los de ejecución de la conducta sexual (Ginton y Merari, 1977). Esta área recibe aferencias de los núcleos colinérgico del puente y noradrenérgicos del locus coeruleus (Simerly y cols, 1998). Esto permite sugerir que el tratamiento con CLI induce modificación en sistemas noradrenérgico y/o colinérgicos, neurotransmisores que juegan un papel facilitador en la conducta sexual y que proyectan sus inervaciones al APOm, área que regula la conducta sexual masculina. Las inervaciones provenientes de núcleos colinérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos no sólo parecen inervan al APOm, sino también al núcleo paraventricular, sin embargo a diferencia de la conducta sexual masculina la 5-HT induce la liberación de CRH en esta región cerebral, así como la NA y ACh. Es posible que los bajos niveles de corticosterona que se observan en las ratas CLI sea el producto que los sistemas de neurotransmisión como la 5-HT que se encuentra

disminuida en el hipotálamo, así como la NA y ACh que están alterados no estimulen adecuadamente la liberación de CRH en el núcleo paraventricular.

### **10.2.2. Estimulación del eje HHA por administración de fármacos**

Cuando se activa el eje HHA a través de la administración de fármacos colinérgicos como el agonista muscarínico oxotremorina y el colinomimético fisostigmina, se incrementan los niveles plasmáticos de corticosterona (Hasey y Hanin, 1990; 1991). Estos efectos fueron confirmados con los presentes resultados en las ratas control en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. En las ratas CLI, la administración de fisostigmina, así como de la dosis baja de oxotremorina no incrementaron los niveles de corticosterona en la fase de oscuridad. Sin embargo, ante la administración de una dosis mayor de oxotremorina, la respuesta en los niveles de corticosterona en las ratas CLI es similar al de las ratas control. Los resultados de este trabajo permiten suponer que en las ratas CLI podría existir una hiposensibilidad de los receptores muscarínicos y/o una alteración en la actividad circádica de estos receptores en áreas involucradas con la regulación del eje HHA, tales como el hipocampo y el hipotálamo.

Se considera que la administración de fisostigmina, que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE), estimula la actividad del eje HHA a través del sistema colinérgico, incrementando los niveles de corticosterona en ratas y humanos intactos (Hasey y Hanin, 1990; 1991). Además, la fisostigmina estimula al eje HHA ejerciendo su efecto directamente en el sistema nervioso central, ya que la neostigmina, fármaco inhibidor de la AChE, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, no produce dicho efecto (Janowsky y cols, 1986; Hasey y Hanin, 1990). El mecanismo por el cual se considera que la fisostigmina y la oxotremorina aumentan los niveles de corticosterona, implica la estimulación específica de receptores muscarínicos de las neuronas colinérgicas localizadas en numerosas regiones cerebrales del sistema nervioso central, como el hipocampo y varios núcleos hipotalámicos como el núcleo paraventricular (Feldman y cols, 1996; Rubin y cols, 1999). En el caso de la fisostigmina, se ha propuesto que el efecto que ejerce sobre el eje HHA está mediado por un mecanismo muscarínico (Kosasa y cols, 1990; Messamore y cols, 1993; Janowsky y cols, 1986; Bhatnagar y cols, 1997), ya que la administración de escopolamina, pero no de metilscopolamina,

bloquea los efectos de la fisostigmina (Janowsky y cols, 1986; Bhatnagar y cols, 1997). La elevación extracelular de ACh, inducida por la fisostigmina, podría ejercer su efecto sobre los receptores colinérgicos postsinápticos (Becker y Giacobini, 1988) estimulando la liberación de CRH y AVP en el núcleo paraventricular y desencadenando la respuesta de liberación de corticosterona (Rubin y cols, 1999).

Un mecanismo similar podría proponerse para la activación del eje HHA inducido por la administración de oxotremorina. Diversos estudios en hipotálamo-hipófisis aislados de rata, han demostrado que la acetilcolina induce la liberación de CRH (Jones y cols, 1976; Buckingham y Hodges, 1977), mediada por la estimulación de receptores pre y postsinápticos en el sistema nervioso central (Lang y cols, 1976). Además, la administración de atropina, bloqueador muscarínico, inhibe los niveles de corticosterona plasmática en respuesta a la oxotremorina, lo que confirma que el mecanismo por el cual la oxotremorina estimula al eje HHA es central más que periférico.

Es importante señalar que si bien la administración de fisostigmina u oxotremorina produce incrementos en los niveles de corticosterona en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad en los animales control, el efecto de la administración de oxotremorina es mayor con respecto a la administración de fisostigmina en la fase de luz. Esta diferencia en el nivel de la respuesta se debe al mecanismo de acción del fármaco. La fisostigmina aumenta la concentración de ACh en el espacio extracelular al inhibir a la AChE, efecto que estimula tanto a los receptores muscarínicos como a los nicotínicos, mientras que la oxotremorina estimula específicamente a los receptores muscarínicos, efectos que confirman la idea de que la activación del eje HHA es mediada por receptores muscarínicos.

Diversos factores pueden estar influyendo en la falta de respuesta de las ratas CLI a la activación colinérgica del eje HHA en la fase oscura del ciclo. Uno de estos factores puede involucrar una actividad circádica alterada de los receptores muscarínicos. Se ha mostrado que la administración crónica de imipramina, bloqueador de la recaptura de monoaminas preferencialmente NA, a ratas adultas, altera al ritmo circádico de los receptores muscarínicos

(Kafka y cols, 1981). Además que los elevados niveles basales de corticosterona que se presentan en las ratas CLI podrían estar influyendo en la falta de respuesta ante la estimulación colinérgica del eje HHA, e inclusive podrían estar interviniendo en la alteración de la respuesta de los receptores muscarínicos a los colinomiméticos en la fase de oscuridad. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el tratamiento con corticosterona en ratas adrenalectomizadas disminuye la afinidad de los receptores muscarínicos en el hipocampo (Biegon y cols, 1985), región del sistema nervioso central que regula la actividad del eje HHA, además de que la administración de corticosterona o dexametasona, reduce el número de receptores muscarínicos (Nabishah y cols, 1991). Se sabe que la administración de corticosterona y la exposición al estrés, que incrementa los niveles de corticosterona, disminuyen la sensibilidad del sistema colinérgico ante la administración de carbacol (Hesen y Joël, 1996). Tomando los datos en conjunto, es posible que la administración postnatal de clomipramina, así como su metabolito activo (desmetilclomipramina), que tiene mayor afinidad por inhibir la recaptura de noradrenalina, pudiera alterar la actividad circádica de los receptores muscarínicos, disminuyendo el número de receptores muscarínicos a nivel del hipotálamo al inicio de la fase oscura, cuando se presenta el máximo número de receptores muscarínicos (Kafka y cols, 1981). Esta disminución en el número de receptores muscarínicos posiblemente este mediada por el incremento en los niveles de ACh por efecto del rebote de sueño MOR que se presenta al término del tratamiento postnatal con CLI. El aumento en la liberación de ACh podría inducir también efecto de larga duración en los receptores muscarínicos. La disminución en el número de receptores muscarínicos podría ser debido a que el incremento de las ACh cerca de 14 días, tiempo que dura aproximadamente el rebote de sueño MOR induzca una regulación de los receptores muscarínicos hacia abajo (Down regulation) como un mecanismo de regulación y/o una desensibilización de los receptores colinérgicos.

Tomando los datos en conjunto, es posible que las ratas tratadas con CLI presenten no sólo alteración en la actividad circádica de los receptores muscarínicos disminuyendo el número de receptores al inicio de la fase oscura, sino también disminución en la sensibilidad de los receptores muscarínicos que podría ser inducida por el incremento en los niveles de corticosterona que se presentan en las ratas CLI. Por lo que esta disminución en el número y/o

en la sensibilidad de los receptores muscarínicos parece estar influyendo así en la falta de respuesta de las ratas CLI en la etapa de oscuridad ante la activación colinérgica del eje HHA por la fisostigmina y la oxotremorina.

### **10.2.3. Activación del eje HHA por estrés agudo y crónico**

Cuando se induce la activación del eje HHA a través del estrés, los resultados muestran que el estrés por inmersión en agua fría (IMS) altera los niveles de corticosterona de manera dependiente de la duración de la exposición (aguda o crónica) y del momento del día en el cual el estresor es aplicado. Estudios realizados en el laboratorio y por otros investigadores muestran que la exposición aguda (Retana-Márquez y cols, 2003) y crónica (Mizoguchi y cols, 2001; Retana-Márquez y cols, 2003) al estrés por IMS incrementan los niveles de corticosterona en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad en ratas macho normales. Los resultados en este trabajo confirman estos efectos en las ratas control. De manera similar, en las ratas CLI se activa el eje HHA cuando son expuestas al estrés agudo por IMS. Sin embargo, ante el estrés crónico, el eje HHA en las ratas CLI se activa únicamente en la fase de luz del ciclo de luz-oscuridad, lo que sugiere que la capacidad de respuesta del eje HHA ante el estrés crónico es menor en la etapa de oscuridad, cuando naturalmente la rata esta en su mayor actividad. La respuesta diferencial ante el estrés agudo y el crónico en las ratas CLI en la fase de oscuridad permiten suponer que la capacidad de respuesta en las ratas CLI va disminuyendo conforme transcurren los días de exposición al estrés y que esto podría ser reflejo de baja reactividad y de una inadecuada capacidad de respuesta ante las demandas excesivas del medio ambiente.

Ogawa et al (1994) observaron que el estrés agudo por inmovilización induce una hiporespuesta del eje HHA y, como consecuencia, un menor incremento en los niveles de corticosterona en las ratas CLI en la fase de luz. En el presente estudio se observó que los niveles plasmáticos de corticosterona se incrementan de manera similar tanto en los animales control tratados con solución salina como en los tratados con CLI ante la exposición al estrés agudo por IMS en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad. Las características del estresor aplicado podrían explicar las diferencias de nuestros resultados con los de esos autores. Con base en la idea de que la activación del eje HHA ante el estrés parece depender de la naturaleza

del estresor utilizado tanto en las ratas normales (Retana-Márquez y cols, 1996, 2003), como en las ratas CLI, puede decirse que el estrés por inmovilización utilizado por Ogawa et al (1994) se considera un estresor preponderantemente psicológico, mientras que el estrés por IMS es clasificado como un estresor mixto, que incluye tanto un componente psicológico como un componente físico, además de considerarse como un estresor que induce una respuesta al estrés más intensa (Retana-Márquez y cols, 2003). Esto último puede confirmarse al comparar los niveles de corticosterona obtenidos en ambos trabajos, lo que permite observar un mayor incremento de los niveles de corticosterona cuando las ratas son expuestas al estrés agudo por IMS que cuando son expuestas al estrés por inmovilización, ambos durante la fase de luz (25  $\mu\text{g}/\text{dl}$  para el estrés por inmovilización vs. 65  $\mu\text{g}/\text{dl}$  para el estrés por IMS), confirmando la idea de que la respuesta del eje HHA depende de las características estresor (Retana y cols, 1996).

Los resultados sobre el efecto del estrés agudo sobre la reactividad del eje HHA en las ratas CLI concuerdan con uno de los pocos estudios realizados en humanos con depresión expuestos a diferentes estresores aplicados de manera aguda, al no observarse una mayor respuesta respecto al grupo control (Young y cols, 2000). Se ha considerado que la preservación de una respuesta normal al estrés a pesar del incremento en los niveles de cortisol pre-estrés, podría deberse a que los pacientes depresivos están respondiendo continuamente a los estresores cotidianos.

Se ha propuesto que los pacientes que padecen depresión presentan mayor vulnerabilidad al estrés, lo que se manifiesta en un mayor incremento en los niveles de cortisol (Von Bardeleben y Holboer, 1989; Von Bardeleben y cols, 1988). Sin embargo, esta propuesta no ha sido corroborada en los pocos trabajos con pacientes que padecen depresión mayor e inclusive entre estos pocos estudios existen resultados contradictorios. Mientras algunos han encontrado incrementos en los niveles de cortisol similares a los sujetos sanos, cuando ambos son expuestos de manera aguda a un estresor social, a pesar de que los pacientes deprimidos muestran un nivel mayor de cortisol antes de la aplicación del estrés (Young y cols, 2000), otros han encontrado una respuesta abrupta del cortisol ante el estrés hipoglucémico por la administración de insulina (Kathol y cols, 1992). Finalmente, en otros estudios no se han

encontrado diferencias en los niveles de cortisol de los pacientes deprimidos y de los sujetos control expuestos a un estresor cognitivo, como un problema aritmético (Trestman y cols, 1991; Gotthart y cols, 1995). Estas discrepancias podrían ser debidas a las características del estresor utilizado, así como a la vulnerabilidad del individuo y a los factores genéticos que influyen en la respuesta de estrés.

El presente trabajo es el primer acercamiento al estudio del efecto del estrés crónico sobre la estimulación del eje HHA en las ratas CLI. Los resultados indican que el estrés crónico estimula al eje HHA únicamente en la fase de luz, pero no durante el periodo de oscuridad. Los pocos datos publicados refuerzan nuestros resultados, al menos para el periodo de luz, ya que muestran que la activación del eje HHA en las ratas Flinders (otro modelo animal de depresión) inducida por el estrés crónico leve impredecible, es similar al grupo control en la fase de luz, sin embargo los autores no realizan la evaluación de los niveles de corticosterona en el periodo de oscuridad (Ayensu y cols, 1995).

Si bien existen pocos estudios en humanos deprimidos que analizan la activación del eje HHA ante una exposición aguda, el estudio del efecto de la exposición crónica ha sido aún más difícil. Se considera que una sobre expresión de cortisol en pacientes deprimidos en respuesta a un estresor, podría tener consecuencias múltiples para el organismo, que redundaría en mayores cambios cognitivos y del estado de ánimo, y esto a su vez exacerbar más la condición depresiva (Wolkowitz, 1994; Starkman y cols, 1992).

Diferentes factores podrían estar influyendo en la falta de efecto del estrés crónico por IMS sobre los niveles de corticosterona en la fase oscura. Entre los que se encuentran que no haya una estimulación adecuada de factores que inducen la liberación del CRH en el núcleo paraventricular (NPV) como los sistemas de neurotransmisión, una alteración en la afinidad y/o densidad de receptores al CRH en los corticotropos o una disminución en la sensibilidad de las glándulas adrenales a la ACTH, todo ello por efecto del estrés crónico. En relación a esto último, existen evidencias de que el CRH juega un papel importante en la respuesta al estrés y en la fisiopatología de la depresión, al coordinar una serie de respuestas conductuales y

fisiológicas que son adaptativas durante el estrés (Mitchell, 1998) y en la depresión endógena humana (Nemeroff y cols, 1984; Roy y cols, 1987a, 1987b), que incluyen, entre otras, la activación del eje HHA. Así, pacientes con depresión estacional (Vanderpool y cols, 1991; Demitrack y cols, 1991) y con depresión atípica presentan una disminución crónica de la secreción de CRH durante el estado depresivo (Gold y Chrousos, 2002).

Por otro lado, es bien sabido que diversos sistemas de neurotransmisión regulan la liberación de CRH en el NPV. Tanto la NA, la A, la ACh, y 5HT son mediadores excitadores que participan en la liberación de CRH, así como en el estrés y en los trastornos afectivos. Se ha observado en animales normales que la exposición repetida a la inmovilización (De Turk y Vogel, 1980), al estrés por frío (Ostman y Smith, 1979) o a los choques eléctricos (Konarska, 1989) induce cambios físicos en los niveles de catecolaminas plasmáticas, produciéndose primero una rápida elevación, para después decaer rápidamente aún antes que la exposición al estresor termine. En el estrés crónico por inmovilización, los niveles de serotonina disminuyen y se incrementa su metabolito, el ácido 5-hidroxi-indol acético en la mayoría de las regiones estudiadas (Adell y cols, 1988), mientras que el estrés aplicado de manera crónica (como en el nado forzado repetido y choques eléctricos diarios en la patas), producen hipersensibilidad de los receptores muscarínicos centrales en la rata (Dilsaver, 1988). Esto parece reflejar un mecanismo de adaptación, aunque el fenómeno ocurre en 3-4 semanas de exposición diaria al estresor. Posiblemente las deficiencias reportadas en los bajos niveles de serotonina y en la actividad de la ACh en las ratas CLI (Vijayakumar y Meti, 1999; Prathiba y cols, 1998), impidan la adecuada y prolongada estimulación de las neuronas que liberan CRH, reflejándose en una disminución de los niveles de CRH y esto a su vez en una baja o nula respuesta del eje HHA.

Los receptores a glucocorticoides que se encuentran en altas concentraciones en el hipotálamo, particularmente en las neuronas-CRH del núcleo paraventricular. Estos se activan el pico circadiano de corticosterona o durante el estrés y son los responsables del efecto de la retroalimentación negativa de los corticosteroides sobre el eje HHA en condiciones de estrés (Sapolsky y McEwen, 1985). Los bajos niveles de corticosterona en las ratas CLI posiblemente podrían ser ocasionados por un incremento en el número y/o en la sensibilidad de los receptores

a glucocorticoides y en consecuencia ejerzan una retroalimentación negativa mas intensa.

Otro factor que podría influir en la falta de respuesta del eje HHA, podría encontrarse a nivel de la hipófisis, donde la afinidad y/o densidad de los receptores al CRH en los corticotropos posiblemente esté alterada, por efecto del estrés crónico. Estudios en las ratas Wistar-kyoto, un modelo propuesto de depresión (Solberg y cols, 2001), muestran signos de incremento en la actividad del eje HHA. Estas ratas muestran una baja capacidad de unión del CRH a sus receptores en la hipófisis anterior y una disminución en la expresión de su ARNm (Hauger y cols, 2002). Por último, no se puede descartar una disminución en la sensibilidad de las glándulas adrenales a la ACTH en la fase de oscuridad.

Los niveles de corticosterona se incrementan en respuesta al estrés agudo, mientras que no se observa aumento ante el estrés crónico en las ratas CLI. Los resultados muestran que el eje HHA responde al estrés agudo, sin embargo como no se realizó el seguimiento en los niveles de corticosterona durante los 10 días, no es posible concluir en ningún caso si hubo habituación o no y en qué momento el eje HHA dejo de responder. Estas dudas podrían responderse sí se hace una evaluación continua en los niveles de corticosterona durante los 10 días de exposición al estrés. Y para determinar sí existe habituación podría modificarse el esquema de exposición al estrés añadiendo un nuevo estresor al día 11 y poder evaluar la respuesta en los niveles de corticosterona.

### **10.3. Sensibilidad colinérgica.**

Los datos muestran que el tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt en las ratas CLI no se modifica después de la administración de oxotremorina, en contraste con su incremento en las ratas control. La administración de oxotremorina a diferentes dosis disminuye la actividad motora de manera similar tanto en las ratas CLI como en las ratas control, lo que sugiere que la actividad motora no se modifica por el tratamiento postnatal con CLI. En el caso de la respuesta de la temperatura corporal, el tratamiento con oxotremorina disminuye la temperatura en las ratas control en la fase oscura a diferencia de las ratas CLI, en las que se observa una disminución de la temperatura en ambas fases del ciclo de luz-oscuridad, lo que sugiere que, en

este parámetro fisiológico, las ratas CLI son más sensibles a los agonistas colinérgicos.

Existe poca información referente a la participación del sistema colinérgico en las ratas CLI en la prueba de Porsolt. Se sabe que la inyección de fármacos colinomiméticos, como oxotremorina y arecolina en animales intactos, prolongan el tiempo de inmovilidad en esta prueba (Mrowiec y cols, 1991), lo que sugiere que el sistema colinérgico participa en la postura de inmovilidad, mismo que se observa en el tiempo de inmovilidad en los animales control, después de la administración de oxotremorina. Además, la microinyección local del agonista arecolina en el núcleo accumbens inhibe la conducta de nado y la conducta de escape en favor de la conducta de inmovilidad, de manera similar al efecto sistémico; mientras que el bloqueo de los receptores M1 con el antagonista específico pirenzepina, incrementa la conducta de nado, lo que sugiere una participación importante, al menos permisiva, de estos receptores en la conducta de inmovilidad (Chau y cols, 2001). Los resultados obtenidos en el tiempo de inmovilidad en las ratas tratadas postnatalmente con CLI ante la administración de oxotremorina no permiten determinar si el sistema colinérgico está hipoactivo o hiperactivo, ya que el tiempo de inmovilidad no se modifica después de la administración de oxotremorina, observándose un tiempo de inmovilidad similar al de las condiciones basales. Por ello, es necesario realizar más estudios para determinar la participación del sistema colinérgico, a través de la administración de drogas colinérgicas que se sabe, disminuyen el tiempo de inmovilidad en ratas normales como el antagonista colinérgico, clorhidrato de escopolamina. Cabe señalar que la prueba de Porsolt no es una prueba adecuada para la evaluación de la sensibilidad colinérgica, dado que el tiempo de inmovilidad no se modifica ante un agonista colinérgico. Sin embargo, alargar el tiempo de evaluación de la segunda prueba, que normalmente es de 5 min, podría permitir determinar los posibles efectos de los agonistas colinérgicos. Por otro lado, se tiene la limitante de que las ratas tratadas con CLI presentan en promedio hasta 12 min de inmovilidad, desde la prueba de 15 minutos (pretest).

La información existente reporta un incremento en la actividad colinérgica como uno de los correlatos de las anomalías en el patrón de sueño MOR y alteraciones conductuales que presentan las ratas CLI (Prathiba y cols, 1995). Los autores sugieren que existe una

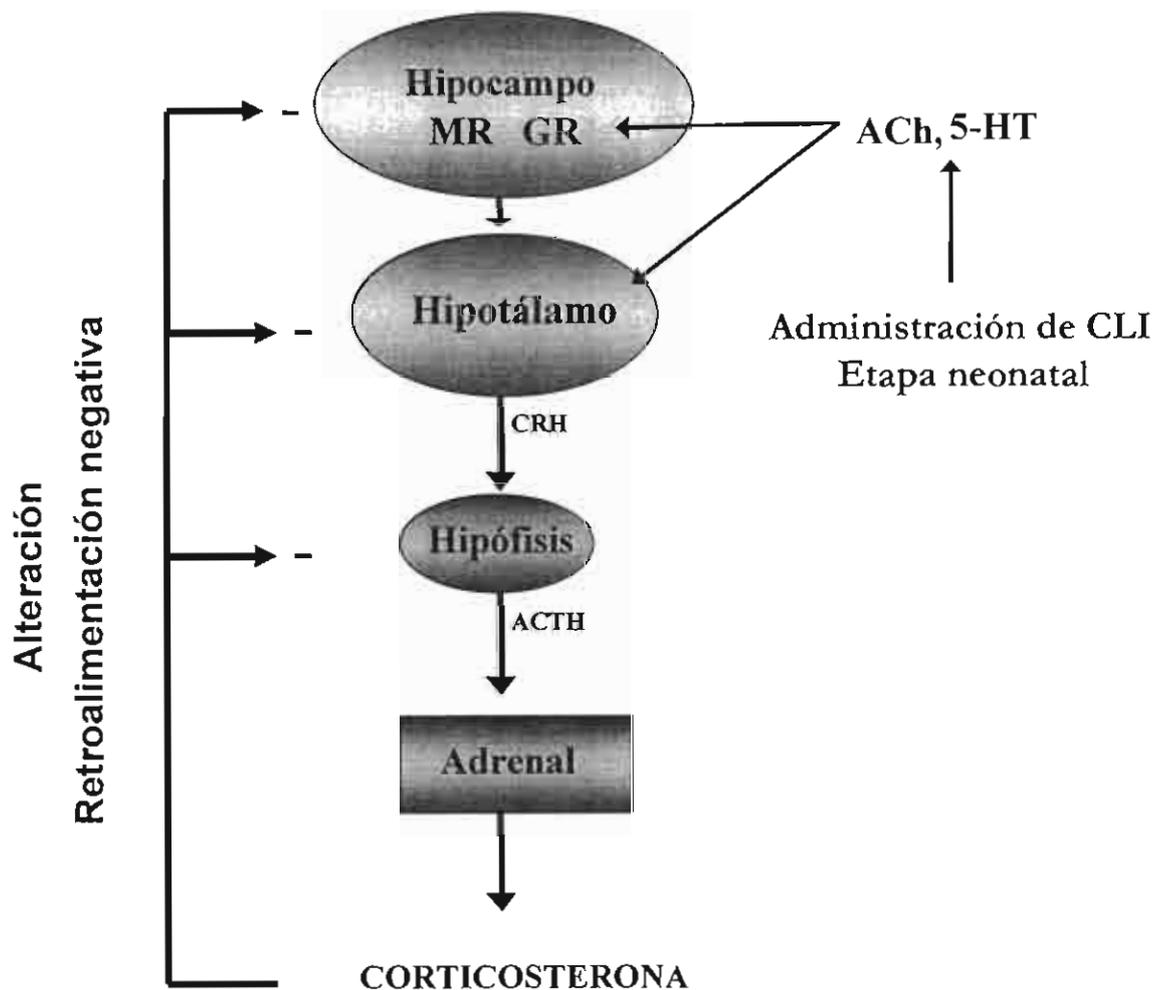
hipersensibilidad colinérgica, específicamente muscarínica, basándose en el hecho de que la administración de oxotremorina induce hipotermia en las ratas CLI en la fase de luz (Prathiba y cols, 1995). Los presentes datos corroboran las observaciones descritas por estos autores y además muestran que la hipotermia inducida por la administración de oxotremorina se observa también en la fase oscura. Este incremento en la actividad colinérgica se ha reportado previamente con el estrés por choques eléctricos en las patas (Dilsaver y Alessi, 1987; Dilsaver y cols, 1986), así como en otros modelos animales de depresión como el de nado forzado y en la línea de ratas Flinders (Daws y Overstreet, 1999; Shiromani y cols, 1991). Este último es uno de los pocos modelos con mayor sustento teórico acerca de la hipersensibilidad colinérgica (Overstreet, 1993). Los estudios realizados en las ratas Flinders muestran una mayor respuesta en la temperatura, en la actividad motora (Daws y cols, 1991) y un incremento mayor en los niveles de corticosterona (Overstreet y cols, 1986) ante la administración de agonistas muscarínicos como la oxotremorina y la arecolina, lo que sustenta la presencia de hipersensibilidad colinérgica en este modelo animal de depresión. Sin embargo, nuestros resultados no son suficientes para demostrar hipersensibilidad colinérgica en las ratas CLI, pues aunque en un parámetro como la temperatura se observa cierta hipersensibilidad colinérgica, en conductas como la actividad motora, la prueba de Porsolt o la respuesta endocrina este efecto no se observa, por lo que no es posible concluir que las ratas CLI presentan hipersensibilidad colinérgica.

La ausencia de hipersensibilidad colinérgica en las diferentes conductas podría deberse a un efecto diferencial del tratamiento postnatal sobre las estructuras que regulan cada una ellas (actividad motora, tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt, reactividad del eje HHA y temperatura corporal), lo que podría sugerir que la sensibilidad colinérgica en este modelo animal de depresión puede estar localizada en ciertas regiones cerebrales como en el hipotálamo que regula la temperatura corporal, mientras que el núcleo accumbens, septum lateral y en el estriado para el caso de la actividad motora y en la prueba de Porsolt y finalmente el hipotálamo e hipocampo relacionadas con la actividad del eje HHA. Estudios recientes determinaron la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en diferentes regiones cerebrales en las ratas CLI, como un marcador del recambio de la acetilcolina cerebral (Vijayakumar y Datta,

2002). Los resultados obtenidos muestran que la actividad de la AChE es mayor en el hipocampo y menor en la corteza cerebral, sin alterar la actividad de la AChE en otras regiones cerebrales como el hipotálamo, septum y tallo cerebral. La falta de uniformidad en la actividad de AChE puede ser un reflejo de la heterogeneidad del efecto de la clomipramina sobre el sistema colinérgico central, sugiriendo que una función alterada del sistema colinérgico en algunas regiones puede ser responsable de la falta de sensibilidad colinérgica general, como se ha propuesto. La administración de CLI parece no alterar la actividad de AChE en el hipotálamo, estructura encargada de regular la temperatura corporal (Ryan y cols, 1996). Sin embargo, la determinación de la temperatura rectal en las ratas CLI muestra una hipersensibilidad colinérgica. Estos resultados podrían ser debidos posiblemente a una hipersensibilidad de los receptores muscarínicos más que a un aumento en los niveles de acetilcolina o a su recambio a nivel del hipotálamo.

Otro dato importante se sustenta en el hecho de que la serotonina, la noradrenalina y la dopamina son detectables en grupos de núcleos en el cerebro de la rata al día 13 de la etapa embrionaria (E13) (Lauder and Krebs, 1986), siendo importantes en la neurogénesis cortical. La noradrenalina ha sido asociada con el inicio del desarrollo cortical los días E18 en la rata y E70 en el mono (Jones, 1991), debido a que fibras noradrenérgicas inervan la corteza temprana y por su participación en la plasticidad sináptica en el sistema visual (Jacobson y Sapolsky, 1991). Las fibras serotoninérgicas invaden la corteza temprana funcionando como factor trófico para el desarrollo de la arquitectura cortical (Lauder y Moore, 1983), de hecho los niveles de serotonina en la neocorteza en la edad temprana es el doble que en la edad adulta (Hohman y cols, 1988). Por otra parte, otros neurotransmisores, como la acetilcolina son detectados en etapas relativamente tardías del desarrollo de la rata, apareciendo en la corteza hasta la segunda o tercera semana postnatal (Coyle, y Yamamura, 1976; Dori y cols, 1985) mientras que el GABA y el glutamato alcanzan sus mayores concentraciones en el día 15 postnatal (Kvale y cols, 1983). En este contexto, el periodo de administración postnatal de clomipramina, del día 8 al 21, podría afectar el desarrollo y la maduración (neurogénesis, migración, conectividad e inclusive la mielinización) de múltiples sistemas, no solo monoaminérgicos, asociados con el desarrollo normal de conductas hasta la edad adulta, de acuerdo al concepto de que la actividad

neural de alguna manera refuerza la formación de circuitos específicos, así, cuando la célula A excita a la célula B diversos cambios suceden para incrementar la eficiencia de A para excitar a B. Esto podría ejemplificarse como las células serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal inhibe a las células colinérgicas del PPT y LDT y los cambios que suceden es la privación del sueño MOR.



**Figura 20.** El tratamiento postnatal con CLI modifica el ritmo de secreción de corticosterona, así como la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal al modificar la neurotransmisión colinérgica y/o serotoninérgica. CRH= hormona liberadora de corticotropina, ACTH= hormona adrenocorticotrópica, MR= receptores a mineralocorticoides, GR= receptores a glucocorticoides, ACh= acetilcolina, 5-HT= serotonina, CLI= clomipramina.

En resumen, la administración de clomipramina en la etapa postnatal modifica la actividad serotoninérgica. Posiblemente, los bajos niveles de serotonina influye en el ritmo circádico de secreción de corticosterona en las ratas CLI al atenuar la retroalimentación negativa que ejercen los receptores a glucocorticoides y a mineralocorticoides sobre la liberación del CRH hipotámico. Esto como consecuencia de una reducción en la expresión de los receptores a glucocorticoides y a mineralocorticoides a nivel del hipocampo y del hipotálamo ocasionado por los bajos niveles de serotonina que presentan las ratas CLI. Esto bajos niveles de serotonina parece influir también en el incremento del tiempo de inmovilidad en la prueba de Porsolt o nado forzado. La administración de clomipramina en la etapa postnatal modifica también la neurotransmisión colinérgica que juega un papel importante en la estimulación del eje HHA. A través de disminuir el número y/o el ritmo, así como la sensibilidad de receptores muscarínicos y como consecuencia modificar la respuesta en las ratas CLI ante la administración de oxotremorina y fisostigmina. El tratamiento postnatal con CLI modifica también la respuesta del eje HHA ante la conducta sexual a través de alterar la neurotransmisión colinérgica y/o noradrenergica ante la exposición al estrés crónico (figura 20).

## 11. CONCLUSIONES

1. El tratamiento postnatal con clomipramina a las ratas macho produce un modelo adecuado de depresión al observarse un incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, disminución de la conducta sexual masculina (en su aspecto motivacional y ejecutorio), así como incremento en los niveles de corticosterona.
2. Las ratas deprimidas presentan hipo-respuesta en los niveles de corticosterona por la estimulación colinérgica, estrés crónico por inmersión en agua fría en la fase oscura del ciclo.
3. La respuesta del eje HHA a la conducta sexual es menor en el modelo animal de depresión estudiado.
4. La administración postnatal con CLI induce sensibilidad colinérgica local.

## 12. PERSPECTIVAS

Debido a la poca información existente sobre la estimulación del eje HHA ante las diferentes conductas analizadas en este trabajo, y mucho menos en las ratas tratadas postnatalmente con CLI, sería importante realizar diversos experimentos que permitan dilucidar los posibles mecanismos de alteración, tanto en el eje HHA como en los sistemas de neurotransmisión que pudieran estar involucrados en la actividad de dicho eje así como en las conductas evaluadas en este trabajo. Sería importante incrementar el tiempo en la prueba de Porsolt de 5 a 10 minutos, así como administrar fármacos antagonistas del sistema colinérgico para poder determinar si este sistema está participando en la conducta de inmovilidad que se evalúa en esta prueba. Es importante también determinar el posible papel de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico en la estimulación del eje HHA y su interacción con el sistema colinérgico. Además de evaluar el número de receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides en áreas involucradas en la regulación del eje HHA y en la depresión como el hipocampo, el septum lateral y el hipotálamo en las ratas tratadas postnatalmente con CLI, con el objetivo de determinar el posible papel que están jugando en la alteración de la curva circádica de corticosterona. Evaluar el efecto de la administración de fármacos con actividad antidepresiva en el restablecimiento de la actividad circádica de corticosterona y del papel que pudieran jugar los receptores mineralocorticoides y glucocorticoides es a futuro un interesante campo poco investigado. Otro punto importante sería determinar los niveles de corticosterona durante los diez días de exposición al estrés con la intención de poder determinar en qué momento del transcurso de la exposición al estrés crónico las ratas tratadas postnatalmente con CLI dejan de responder. Sin embargo, no se puede descartar que los bajos niveles de corticosterona observada en las ratas CLI se deban a una respuesta de habituación. Esta pregunta podría responderse estresando, por inmersión en agua fría, durante 10 días a las ratas CLI y cambiando el estresor al día siguiente. Finalmente es importante determinar los niveles de ACh, 5-HT, NA después de la exposición al estrés y la conducta sexual para establecer cuál es el papel que pudieran estar jugando dichos neurotransmisores en esta respuesta.

### 13. REFERENCIAS

1. Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E. (1988). Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J Neurochem.* 50: 1678-1681.
2. Adrien J. (2002). Neurobiological bases for the relation between sleep and depresión. *Sleep Med Rev.* 6(5): 341-351.
3. American Psychiatric Association. (2003). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales-Texto revisado (DSM-IV-TR). Tomo II Ed. Masson Doyma, México, D.F, pp 387-427, 667-669.
4. Akana S, Cascio C, Du J, Levin N, Dallman M. (1986). Reset of feedback in the adrenocortical system: An apparent shift in sensitivity of adrenocorticotropin to inhibition by corticosterone between morning and evening. *Endocrinology.* 119: 2325-2332.
5. Anisman HA, Zacharko RM. (1982). Depression: The predisposing influence of stress. *Behav Brain Sci.* 5: 89-137.
6. Anand KJ, Scalzo FM . (2000). Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate.* 77 (2): 69-82.
7. Armario A, Gavalda A, Marti O. (1988). Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, and immobility and defecation rate. *Eur J Pharmacol.* 158(3): 207-212.
8. Atcheson JB, Tyler FH. (1975). Circadian rhythm: Man and animals. En: Greep RO, Astwood AB. (Eds). *Handbook of Physiology*, section 7, vol. VI. American Physiological Society. Washington, pp. 127-134.
9. Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. (1995). Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiol Behav.* 57: 165-9.
10. Báez M, Siriczman I, Volosin M. (1996). Corticosterone is involved in foot shock-induced inactivity in rats. *Physiol Behav.* 60: 795-801.
11. Beach FA. (1956). Characteristics of masculine sex drive. En: Jones MR. (Ed). *The Nebraska Symposium on Motivation.* Lincoln, N.E. University of Nebraska Press. pp.1-32.
12. Barden JN, Reul MH, Holsboer F. (1995). Do antidepressants stabilize mood through actions on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system? *TINS.* 18: 6-11.
13. Baumeister AF. (1990). Suicide as escape from the self. *Psychological Bull.* 97: 90-113.
14. Beaulieu S, Pelletier G, Vaudry H, Barden N. (1989). Influence of the central nucleus of the amygdale on the content of corticotrophin-releasing factor in the median eminence. *Neuroendocrinology.* 49: 255-261.
15. Beaulieu S, Di Paolo T, Cote J, Barden N. (1987). Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology.* 45: 37-46.
16. Becker R, Giacobini E. (1988). Mechanisms of cholinesterase inhibition in senile dementia of the Alzheimer type: clinical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Drug Dev Res.* 12: 163-195.

17. Bertolini A, Vergoni W, Gessa GL, Ferrari W. (1969). Induction of sexual excitement by the action of adrenocorticotrophic hormone in brain. *Nature*. 221: 667-669.
18. Bhatnagar S, Costall B, Smythe JW. (1997). Hippocampal cholinergic blockade enhances hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Brain Res*. 776: 244-248.
19. Biegon A, Rainbow TC, McEwen BS. (1985). Corticosterone modulation of neurotransmitter receptors in rat hippocampus: A quantitative autoradiographic study. *Brain Res*. 332: 309-314.
20. Bitran D, Hull E. (1987). Pharmacological analysis of male sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 11: 363-389.
21. Bohus B, De Kloet E, Veldhuis H. (1983). Adrenal steroids and behavioral adaptation: relationships to brain corticoid receptors. En: Ganten, R. Pfaff D. (Ed) *Progress in Neuroendocrinology*. Vol 2. Springer-Verlag, Berlin. pp.1
22. Bonilla-Jaime H, Retana-Marquez S, Velazquez-Moctezuma J. (1998). Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 60: 39-45.
23. Borg KE, Esbenshade KL, Johnson BH. (1991). Cortisol, growth hormone and testosterone concentrations during mating behavior in bul and boar. *J Anim Sci*. 69: 3230-3240.
24. Borsini, F, Meli A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*. 94, 147-160.
25. Bourin M, Redrobe JP, Hascoet M, Baker GB, Colombel MC. (1996). A schematic representation of the psychopharmacological profile of antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*. 20(8): 1389-1402.
26. Bronson FH, Desjardins C. (1982). Endocrine responses to sexual arousal in male mice. *Endocrinology*. 111: 1286-1291.
27. Brady LS, Whitfield HJ Jr, Fox RJ, Gold PW, Herkenham M. (1991). Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest*. 87(3): 831-7.
28. Brady G, Calogero AE, Charanjit SA, Szemeredi K, Murphy DL. (1989). Long-term cortisol treatment impairs behavioral and neuroendocrine response to 5-HT<sub>1</sub> agonists in rat. *Neuroendocrinology*. 50: 241-247.
29. Buckingham JC, Hodges JR. (1977). Production of corticotrophin releasing hormone by the isolated hypothalamus of the rat. *J Physiol*. 272: 469-479.
30. Bugajski J, Borycz J, Gadek-Michalska A. (1998a). Involvement of the central noradrenergic system in cholinergic stimulation of the pituitary-adrenal response. *J Physiol Pharmacol*. 49(2): 285-292.
31. Bugajski J, Gadek-Michalska A, Borycz J, Glod R. (1998b). Effect of indomethacin on nicotine-induced ACTH and corticosterone response. *J Physiol Pharmacol*. 49(1): 165-173.
32. Bugajski J, Turon M, Gadek-Michalska A, Borycz JA. (1991). Catecholaminergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *J. Physiol. Pharmacol*. 42(1): 93-103.

33. Bunney WE, Bunney BG. (2000). Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*. 22(4): 335-345.
34. Butcher LL, Hodge GK. (1976). Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate-putamen nucleus and substantia nigra of rats. *Brain Res*. 106: 223-240.
35. Calogero AE, Bagdy G, Moncada ML, Dagata R. (1993). Effect of selective serotonin agonists on basal, corticotrophin-releasing hormone-induced and vasopressin-induced ACTH release *in vitro* from rat pituitary cells. *J Endocrinol*. 136: 381-387.
36. Calogero AE, Galluci WT, Gold PW, Chrousos GP. (1988). Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotrophin-releasing hormone secretion. *J Clin Invest*. 82: 767-774.
37. Calogero AE, Kamilaris TC, Gomez MT, Johnson EO, Tartaglia ME, Gold PW, Chrousos GP. (1989). The muscarinic cholinergic agonist arecoline stimulates the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a centrally-mediated corticotrophin-releasing hormone-dependent mechanism. *Endocrinology*. 125(5): 2445-53.
38. Camarini R, Benedito MA. (1997). Chronic imipramine treatment-induced changes in acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) activity in discrete rat brain regions. *Braz J Med Biol Res*. 30(8): 955-960.
39. Carroll BJ, Curtis GC, Mendels J. (1976). Neuroendocrine regulation in depression: II. Discrimination of depressed from nondepressed patients. *Arch Gen Psychiatry* 33: 1051-1058.
40. Carroll BJ, Martin FI, Daves B. (1968). Resistance to suppression by dexamethasone of plasma 11-OHCS levels in severe depressive illness. *Br Med J*. 3: 285-287.
41. Cesana R, Ceci A, Ciprandi C, Borsini F. (1993). Mesulergine antagonism towards the fluoxetine anti-immobility effect in the forced swimming test in mice. *J Pharm Pharmacol*. 45(5): 473-475.
42. Chau DT, Rada P, Kosloff RA, Taylor JL, Hoebel BG. (2001). Nucleus accumbens muscarinic receptors in the control of behavioral depression: antidepressant-like effects of local M1 antagonist in the Porsolt swim test. *Neuroscience*. 104(3): 791-798.
43. Chrousos GP, Laue L, Nieman L, Kawai S, Udelsman R, Brandon D, Loriaux D. (1988). Glucocorticoids and glucocorticoids antagonists: Lessons from RU486. *Kidney Int*. 34 (suppl 26): 18-23.
44. Clark JT, Smith ER. (1987). Effects of apomorphine on sexual behavior in young and middle-aged rats. *Neurobiol Aging*. 8(2): 153-157.
45. Clark JT, Smith ER, Davidson JM. (1984). Enhancement of sexual motivation in male rats by yohimbine. *Science*. 225: 847-849.
46. Colborn DR, Thompson DL, Roth TL, Capehart JS, White KL. (1991). Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Anim Sci*. 69: 2556-2562.
47. Coyle JT, Yamamura HI. (1976). Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res*. 118: 429-440.
48. Coyle JT, Axelrod J. (1971). Development of the uptake and storage of L-H<sup>3</sup>-norepinephrine in the rat brain. *J Neurochem*. 18: 2061-2075.
49. Convey EM, Bretschneider E, Hafs HD, Oxeder WD. (1971). Serum levels of LH, prolactin and growth hormone after ejaculation in bulls. *Biol Reprod*. 5: 20-24.

50. Costa E, Garattini S, Valzelli L. (1960). Interaction between reserpine chlorpromazine and imipramine. *Experientia*. 16: 461-463.
51. Crespi D, Gobbi M, Mennini T. (1997). 5-HT<sub>3</sub> serotonin hetero-receptors inhibit [3H] acetylcholine release in rat cortical synaptosomes. *Pharmacol Res.* 35(4): 351-354.
52. Critchlow V, Liebelt RA, Bar-Sela M, Mountcastle W, Lipscomb HS. (1963). Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am J Physiol*. 205: 807-815.
53. Dallman MF, Engeland WC, Rose JC, Wilkinson CW, Shinsako J, Siedenburg F. (1978). Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *Am J Physiol*. 223: 402-405.
54. Da-Rocha MA Jr, Puech AJ, Thiebot MH. (1997). Influence of anxiolytic drugs on the effects of specific serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol.* 11(3): 211-218.
55. Daws LC, Schiller GD, Overstreet DH, Orbach J. (1991). Early development of muscarinic supersensitivity in a genetic animal model of depression. *Neuropsychopharmacology.* 4(3): 207-217.
56. Daws LC, Overstreet DH. (1999). Ontogeny of muscarinic cholinergic supersensitivity in the Flinders sensitive line rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 62: 367-380.
57. De Turk KH, Vogel W. (1980). Factors influencing plasma catecholamine levels in rats during immobilization. *Pharmacol Biochem Behav.* 13: 129-131.
58. De Kloet ER, Reul JM. (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: A concept arising from heterogeneity of brain receptor systems. *PsychoNeuroendocrinology.* 2: 83-105.
59. De Kloet ER. (1991). Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front. Neuroendocrinology.* 12: 95-164.
60. De Kloet ER, De Kock S, Schild V, Veldhuis HD. (1988). Antiglucocorticoid RU 38486 attenuates retention of behaviour and disinhibits the hypothalamic-pituitary adrenal axis at different brain sites. *Neuroendocrinology.* 47: 109-115.
61. Demitrack MA, Dale JK, Straus S. (1991). Evidence for impaired activation of the hypothalamic pituitary-adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 73: 1224-1234.
62. Depue, RA, Monroe, SM. (1979). The unipolar-bipolar distinction in the depressive disorders: implications for stress-onset interactions. En: R.A. Depue (Ed). *The psychobiology of the depressive disorders: implications for the effects of stress.* Academic Press, New York. pp. 25-53.
63. De Turk KH, Vogel WH. (1980). Factors influencing plasma catecholamine levels in rats during immobilization. *Pharmacol Biochem Behav.* 13: 129-131.
64. De Wied D. (1980). Pituitary-adrenal system hormones and behavior. En: Selye H. (Ed) *Selye's guide to stress research.* Vol 1. Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 252-279.
65. Dilsaver SC, Alessi NE. (1987). Chronic inescapable foot shock produces cholinergic system supersensitivity. *Biol Psychiatry.* 22: 910-914.
66. Dilsaver SC, Snider RM, Alessi NE. (1986). Stress induced supersensitivity of the cholinergic system in rats. *Biol Psychiatry.* 21: 1093-1096.
67. Dilsaver SC. (1988). Effects of stress on muscarinic mechanisms. *Neurosci. Biobehav Rev.* 12: 23-28.
68. Dinan TG. (1994). Glucocorticoids and the genesis of depressive illness: a psychobiological model. *Br. J. Psychiatry* 164: 365-371. Dixon AK. (1998). *Ethological*

- strategies for defence in animal and humans: their role in some psychiatric disorders. *Brit J Med Psychology*. 71: 417-445.
69. Djuric VJ, Overstreet DH, Dragomir A, Steiner M. (1999). Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of flinders resistant and sensitive lines. *Physiol Behav*. 67: 533-537.
  70. Doerr P, Berger M. (1983). Physostigmine-induced escape from dexamethasone suppression in normal adults. *Biol Psychiatry*. 18: 261-268.
  71. Dori I, Parnavelas JG, Eckenstein F. (1985). The postnatal developmental of cholinergic system in the rat visual cortex. *Neurosci Lett. (Suppl)* 22: 354.
  72. Dorworth TR, Overmaier JB. (1977). On learned helplessness: The therapeutic effects of electroconvulsive shock. *Physiol Behav*. 5: 355-358.
  73. Engelnad WC, Shinsako J, Winget CM, Vernikos-Danellis J, Dallman, MF. (1977). Circadian patterns of stress-induced ACTH secretion are modified by corticosterone responses. *Endocrinology*. 100: 138-147.
  74. Feestra MG, Van Galen H, Te Riele JM, Botterblom MH, Mirmiran M. (1996). Decreased hypothalamic serotonin levels in adults rats treated postnatally with clomipramine. *Pharmacol Biochem Behav*. 55: 647-652.
  75. Feldman SR, Meyer SJ, Quenzer LF. (1997). *Principles of neuropsychopharmacology*. Sinaver Associates, Inc. Publisher Sunderland, Massachusetts.
  76. Feng P, Ma Y. (2002). Clomipramine suppresses postnatal REM sleep without increasing wakefulness: Implications for the production of depressive behaviors. *Sleep*. 25(2): 177-184.
  77. Fernández-Pardal J, Hilakivi LA. (1989). Effect of low alcohol dose on behavioral "despair" in rats neonatally treated with antidepressant drugs. *Alcohol*. 6(2): 93-5.
  78. Fuxe K, Agnati LF, Jansson A, von Euler G, Tanganelli S, Andersson K, Eneroth P. (1990). Regulation of endocrine function by the nicotinic cholinergic receptor. *Ciba Found Symp*. 152: 113-127.
  79. File SC, Tucker JE. (1983). Prenatal treatment with clomipramine has an anxiolytic profile in the adolescent rat. *Physiol Behav*. 31(1): 57-61.
  80. Fullilove MT. (2002). Social and economic causes of depression. *J Gent Specif Med*. 5(2): 38-41.
  81. Gibbons JL, McHugh PR. (1962). Plasma cortisol in depressive illness. *Psychiatry Res*. 1: 162-167.
  82. Gilbert P, Allan S. (1998). The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. *Psychological Med*. 28: 535-598.
  83. Ginton A, Merari A. (1977). Long range effects of mPOA lesion on mating behavior in the male rat. *Brain Res*. 120: 158-163.
  84. Gold PW, Chrousos G, Kellner C. (1984). Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotrophin-releasing factor. *Am J Psychiatry*. 141: 619-627.
  85. Gold PW, Loriaux DL, Roy A, Kling MA, Calabrese JR, Kellner CH, Nieman LK, Post RM, Pickar D, Galluci W. (1986). Response to corticotrophin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease: Pathophysiologic and diagnostic implications. *N Engl J Med*. 314: 1329-1335.

86. Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP. (1988a). Clinical and biochemical manifestations of depression: relationship to the neurobiology of stress. Part 1. N. Engl J Med. 319: 348-353.
87. Gold P, Goodwin F, Chrousos G. (1988b). Clinical and biochemical manifestations of depression: Relationship to the neurobiology of stress. (Second of two parts). N Engl J Med. 319: 413-420.
88. Gold PW, Chrousos GP. (2002). Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. Mol Psychiatry. 7: 254-257.
89. Gotthardt U, Schwiger U, Fahrenger J, Lauer CJ, Holsboer F, Heuser I. (1995). Cortisol, ACTH and cardiovascular response to a cognitive paradigm in aging and depression. Am J Physiol. 268: 865-873.
90. Graham JM, Desjardins C. (1980). Classical conditioning: induction of luteinizing hormone and testosterone secretion in anticipation of sexual activity. Science 218: 1039-1041.
91. Guillemin R, Rosenberg B. (1955). Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: A study with combined with tissue cultures. Endocrinology. 57: 599-607.
92. Haleem DJ. (1992). Repeated corticosterone treatment attenuates behavioral and neuroendocrine responses to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in rat. Life Sci. 1: 225-230.
93. Hansen HH, Mikkelsen JD. (1998). Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic postnatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. Eur J Pharmacol. 352:307-315.
94. Hasey G, Hanin I. (1990). Plasma corticosterone is increased and correlated with brain acetylcholine in physostigmine- but not in neostigmine-treated rats. PsychoNeuroendocrinology. 15(5-6): 357-69.
95. Hasey G, Hanin Y. (1991). The cholinergic-adrenergic hypothesis of depression reexamined using clonidine, metropolol, and physostigmine in an animal model. Biol Psychiatry. 29: 127-138.
96. Hartley P, Neill D, Hagler M, Kors D, Vogel G. (1990). Procedure- and age-dependent hyperactivity in a new animal model of endogenous depression. Neurosci Biobehav. Rev.14 (1): 69-72.
97. Hauger RL, Shelat SG, Redei EE. (2002). Decreased corticotrophin-releasing factor receptor expression and adrenocorticotrophic hormone responsiveness in anterior pituitary cells of Wistar-Kyoto rats. Neuroendocrinology. 14: 126-134.
98. Hédou G, Pryce C, Di Iorio L, Heidbreder C, Feldon J. (2001). An automated analysis of rat behavior in the forced swim test. Pharmacol Biochem Behav. 70: 65-76.
99. Heslen W, Joël M. (1996). Cholinergic Responsiveness of rat CA1 hippocampal neurons *in vitro*: Modulation by corticosterone and stress. Stress 1: 65-72.
100. Hilakivi LA, Hilakivi Y. (1987). Increased adult behavioral despair in rats postnatally exposed to desipramine or zimelidine: An animal model of depression. Pharmacol Biochem Behav. 28: 367-369.
101. Hilakivi L, Sinclair JD. (1986). Effect of neonatal clomipramine treatment on adult alcohol drinking in the AA and ANA rat lines. Pharmacol Biochem Behav. 24(5):1451-1455.

102. Hohman CF, Hamon R, Batshaw ML, Coyle JT. (1988). Transient postnatal elevation of serotonin levels in mouse neocortex. *Dev Br Res.* 43: 163-166.
103. Holsboer F. (1983). Prediction of clinical course of dexamethasone suppression test (DST) response in depressed patients-physiological and clinical construct validity of the DST. *Pharmacopsychiatria* 16: 186-191.
104. Horrocks P, Jones A, Ratcliffe W, Holder G, White A, Holder R, Ratcliffe J, London D. (1990). Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty-four hours on normal males and females. *Clin Endocrinol.* 32: 127-134.
105. Jacobson L, Sapolsky R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinol Rev.* 12: 118-34.
106. Janowsky DS, Risch SC, Kennedy B, Ziegler M, Huey L. (1986). Central muscarinic effects of physostigmine on mood, cardiovascular function, pituitary and adrenal neuroendocrine release. *Psychopharmacology.* 89: 150-154.
107. Jefferys D, Copolov D, Irby D, Funder J. (1983). Behavioral effect of adrenalectomy: reversal by glucocorticoids or (D-Ala<sup>2</sup>, Met<sup>5</sup>) enkephalinamide. *Eur J Pharmacol.* 92: 99-103.
108. Jones EG. (1991). The development of the primate neocortex-an overview. En: Mednick SA, Cannon TD, Barr CE, Lyon M, eds. *Fetal Neural Development and Adult Schizophrenia*, New York, Cambridge University Press pp. 40-65.
109. Jones MT, Hillhouse EW, Barden J. (1976). Effect of various putative neurotransmitters on the secretion of corticotrophin-releasing hormone from the rat hypothalamus *in vitro*-a model of the neurotransmitters involved. *J Endocrinol.* 10: 203-205.
110. Kafka MS, Wirtz-Justice A, Naber D, Wehr TA. (1981). Circadian acetylcholine receptor rhythm in rat brain and its modification by imipramine. *Neuropharmacology.* 20:421-425.
111. Kandel RE, Schwartz HJ. (1991). *Principles of neural science.* 2da. Ed. Elsevier Science Publishing Co., New York. pp. 720-724.
112. Karki N, Kunstzman R, Brodie BB. (1962). Storage, synthesis and metabolism of monoamines in the developing brain. *J Neurochem.* 9: 53-58.
113. Kass P. (1986). The cholinergic systems in brain and spinal cord. *Progress in Neurobiol.* 26: 211-272.
114. Kats RJ. (1982). Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol, Biochem Behav.* 16: 965-968.
115. Kathol RG, Gehris TL, Carroll BT, Samuelson SD, Pitts AF, Meller WH, Carter JL. (1992). Blunted ACTH response to hypoglycemic stress in depressed patients but not in patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 26: 103-116.
116. Kelle-Wood M., Dallman, M. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 5: 1-24.
117. Keller SE, Weiss JM, Schleiffer SJ, Miller NE, Stein MS. (1981). Suppression of immunity by stress: effect of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science.* 213: 1397-1400.
118. Kennett GA., Chaouloff F, Marcou M, Curzon G. (1986). Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression. *Brain Res.* 382: 416-421.
119. Kling A, Borowitz, G, Cartwright RD. (1972). Plasma levels of 17-hydrocorticosteroids during sexual arousal in man. *J Psychosom Res.* 116: 215-221.

120. Konarska M, Sewart RE, McCarthy R. (1989). Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiol Behav.* 45: 255-261.
121. Kosasa T, Yamanishi Y, Ogura H, Yamatsu K. (1990). Effects of E2020 on the extracellular level of acetylcholine in the rat cerebral cortex measured by micro dialysis without addition of cholinesterase inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 183: 1936.
122. Koyama Y, Kayama Y. (1993). Mutual interactions among cholinergic, noradrenergic and serotonergic neurons studied by studied iontophoresis of these transmitters in rat brainstem nuclei. *Neuroscience.* 55:1117-1126.
123. Kuroda Y, Mikuno M, Ogawa T, Takahashi K. (1992). Effect of ACTH, adrenalectomy and combination treatment on the density of 5-HT<sub>2</sub> receptor binding sites in neocortex of rat forebrain and 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated wet-dog shake behaviors. *Psychopharmacology.* 108: 27-32.
124. Kvale I, Fosse VM, Fonnum F. (1983). Development of neurotransmitter parameter in lateral geniculate body, superior colliculus and visual cortex of the albino rat. *Dev Brain Res.* 7: 137-145.
125. Lang RE, Voigt KH, Fehm HL, Pfeiffer EF. (1976). Localization of corticotrophin-releasing activity in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 2: 19-22.
126. Lauder JM, Wallace JA, Wilkie MB, DiNome A, Krebs H. (1983). Roles for serotonin in neurogenesis. *Monogr NeuralSci.* 9:3-10.
127. Leshner AI, Remler H, Biegon A, Samuel D. (1979). Effects of desmethyylimipramine (DMI) on learned helplessness. *Psychopharmacology.* 66: 207-213.
128. Levine S, Goldman L, Coover G. (1972). Expectancy of the pituitary-adrenal system En: *Physiology, Emotion and psychosomatic illness.* CIBA foundation symposium 8. Amsterdam: Elsevier/Excerpta Medica. pp. 281-291.
129. Lorrain DS, Matuszewich L, Friedman RD, Hull EM. (1997). Extracellular serotonin in the lateral hypothalamic area is increased during the postejaculatory interval and impairs copulation in male rats. *J Neurosci.* 17: 9361-9366.
130. Lucki I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol.* 8: 523-432.
131. Luebke JL, Greene RW, Semba K, Kamodi A, McCarley R, Reiner PB. (1992). Serotonin hiperpolarizes cholinergic low-threshold burst in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 743-747.
132. Maes M, Jacobs MP, Suy ED, Vandewoude M, Minner BF, Raus J. (1990b). Effects on dexamethasone on the availability of L-tryptophan and on the insulin and FFA concentrations in unipolar depressed patients. *Biol Psychiatry.* 27: 854-862.
133. Maes M, Herbert Y, Meltzer P, Cosyns P, Blockx P. (1995). Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoides on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *PsychoNeuroendocrinology.* 2: 149-167.
134. Marcilhac A, Maurel D, Anglade G, Ixart G, Mekaouche, Hery F, Siaud P. (1997). Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats. *Arch Physiol Biochem.* 105: 552-559.
135. Mason JW. (1968). A review of psychoendocrine research on the sympatho adrenal medullary system. *Psychosom Med.* 30: 576-607.

136. Mason JW. (1972). Organization of psychoendocrine mechanisms. En: Greenfield NS, Sternbach RA. (Eds), Handbook of psychophysiology. Holt, Rinehart and Winston. pp.3-91.
137. Matta SG, Fu Y, Valentine JD, Sharp BM. (1998). Response of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to nicotine. *Psychoneuroendocrinology*. 23(2): 103-113.
138. Maure G, Fedele E, Raiteri M. (1989). Acetylcholine release from rat hippocampal slices is modulated by 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol*. 20:165(2-3): 173-179.
139. Mc Intosh TK, Barfiel RJ. (1984a). Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. I. Serotonin and postejaculatory refractory period. *Behav Brain Res*. 12: 255-265.
140. Mc Intosh TK, Barfiel RJ. (1984b). Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. III. Norepinephrine and postejaculatory refractory period. *Behav Brain Res*. 12: 275-279.
141. Meisel RL Sachs BD. (1994). The physiology of male sexual behavior. En: Knobil E y Neil J (Eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York pp 3-105.
142. Mendel J, Cochrane C. (1968). The nosology of depression: the endogenous-reactive concept. *Am. J Psychiatry* 124 (suppl.1):1-11.
143. Mendel J. (1970). *Concept of the depression*. John Willey & Sons. New York. pp.37-38.
144. Mendelson SD, McEwen BS. (1992). Autoradiographic analyses of the effects of adrenalectomy and corticosterone on 5-HT1A and 5-HT1b receptors in the dorsal hippocampus and cortex of the rat. *Neuroendocrinology*. 55: 444-450.
145. Messamore E, Ogane N, Giacobini E. (1993). Cholinesterase inhibitor effects on extracellular acetylcholine in rat striatum. *Neuropharmacology*. 32: 291-296.
146. Mirmiran M. (1986). The importance of fetal/postnatal REM sleep. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 21(5-6): 283-291.
147. Mirmiran M, Van de Poll NE, Comer HG, Van Oyen H, Boer G. (1981). Suppression of active sleep by chronic treatment with clomipramine during early postnatal development: effect on adult sleep and behavior in the rat. *Brain Res*. 204: 129-146.
148. Mitchell AJ. (1998). The role of corticotrophin releasing factor in depressive illness: a Critical Review. *Neurosci Biochem Rev*. 22: 635-651.
149. Mizuno T, Arita J, Kimura F. (1994). Spontaneous acetylcholine release in the hippocampus exhibits a diurnal variation in both young and old rats. *Neurosci Lett*. 178: 271-274.
150. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. (2001). Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 26: 443-459.
151. Morely JE, Levine AS (1982). Corticotropin-releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci*. 31: 1459-1464.
152. Morilak DA, Garlow SJ, Cianranello RD. (1993). Immunohistochemical localization and description of neurons expressing serotonin receptors in the brain. *Neuroscience*. 54: 701-717.
153. Morin LP (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Annals of Medicine* 31: 12-33.
154. Mrowiec J, Plech A, Brus R. (1991). Effects of cholinomimetics and cholinolytics in despair in mice. *Homeost Health Dis*. 33: 195-198.

155. Munk A, Guyre PM. (1986). Glucocorticoid physiology. *Pharmacology and stress*. En: Chousos GP, Loriaux DL, Lipsett MB. (Eds). *Steroid hormone resistance*. New York. Plenum Press. pp. 81-96.
156. Munk A, Guyre P, Holbrook N. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinol Rev.* 5: 25-44.
157. Nabishah BM, Morat PB, Kadir BA, Khalid BA. (1991). Effect of steroid hormones on muscarinic receptors of bronchial smooth muscle. *Gen Pharmacol.* 22: 389-392.
158. Neill D, Vogel G, Hagler M, Kors D, Hennessey A. (1990). Diminished sexual activity in a new model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 14: 73-76.
159. Nelson JC, Charney D. (1981). The symptoms of major depressive illness. *Am J Psychiatry.* 138:1-13.
160. Nemeroff CB, Wilderl6v E, Bissette G. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science.* 226: 1342-1344.
161. Nemeroff CB, Stout SC, Owens MJ. (1995). Stress peptides and HPA axis reactivity in depression. *Eur Neuropsychopharmacol.* 5: 242-243.
162. Nixon MK, Hascoet M, Bourin M, Colombel MC. (1994). Additive effects of lithium and antidepressants in the forced swimming test: further evidence for involvement of the serotonergic system. *Psychopharmacology.* 115(1-2): 59-64.
163. Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KJ, Takahashi K. (1994). Effects of the altered serotonergic signaling by postnatal treatment with 5, 7-dihydroxytryptamine, ritanserin or clomipramine on adrenocortical stress response and the glucocorticoid receptor binding in the hippocampus in adult rats. *J Neural Transm.* 96: 113-123.
164. Orchinik MP, Licht MP, Crews D. (1988). Plasma steroid concentrations change in response to sexual behavior in *bufu marinus*. *Horm Behav.* 22: 338-350.
165. Ostman-Smith I. (1979). Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiol Scand.* 477: 1-118.
166. Overstreet DH, Booth RA, Risch SC, Janowsky DS. (1986). Enhanced elevation of corticosterone following arecoline administration to rats selectively bred for increased cholinergic function. *Psychopharmacology.* 88 (1): 129-130.
167. Overstreet DH. (1993). The flinders sensitive line rats: A genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 17: 51-68.
168. Peskind ER, Raskind MA, Wingerson D, Pascualy M, Thal LJ, Dobie DJ, Veith RC, Dorsa DM, Murray S, Sikkema C. (1995). Enhanced hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to physostigmine in normal aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: 114-120.
169. Petty F, Sherman AD. (1980). Reversal of learned helplessness by imipramine. *Commun Psychopharmacol.* 3:371-373.
170. Philip W, Golg MD, Frederick K, Goodwin MD, George P. (1988). Clinical and biochemical manifestation of depression. *New Engl J Med.* 3 (19): 413-420.
171. Piñeiro G, Blier P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev.* 51(3): 533-591.

172. Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB. (1998). Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatry Clin North Am.* 21: 293-307.
173. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. (1977). Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn.* 229:327.
174. Porsolt RD, Bertin A, Blavet M, Daniel M, Jalfre M. (1979). Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agent with modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol.* 57: 201-210.
175. Porsolt RD. (1981). Behavioral Despair. En: Enna SJ, Malick JB and Richelson E (Eds): *Antidepressants: Neurochemical, Behavioral and clinical perspectives.* Raven Press. New York. pp 107-129.
176. Prathiba J, Kumar KB, Karanth KS. (1995). Effects of postnatal clomipramine on cholinergic receptor sensitivity and passive avoidance behavior in adult rats. *J Neural Transm.* 100: 93-99.
177. Prathiba J, Kumar KB, Karanth KS. (1998). Hyperactivity of hypothalamic pituitary axis in postnatal clomipramine model of depression. *J Neural Transm.* 105: 1335-1339.
178. Rabb MH, Thompson DL, Barry BE, Colborn DR, Garza F, Hehnke E. (1989). Effects of sexual stimulation, with and without ejaculation, on serum concentrations of LH, FSH, testosterone, cortisol and prolactin in stallions. *J Anim Sci.* 67: 2724-2730.
179. Redrobe JP, MacSweeney CP, Bourin M. (1996). The role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* 30: 213-20.
180. Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. (1998). Lack of Effect of corticosterone administration on sexual behavior of rats. *Physiol Behav.* 63: 367-370.
181. Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García, Velázquez-Moctezuma J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic in male rats. *Horm Behav.* 44: 327-337.
182. Retana-Márquez S, Velázquez-Moctezuma J. (1993). Evidence that the M1 muscarinic receptor subtype mediates the effects of oxotremorine on masculine sexual behavior. *Neuropsychopharmacology.* 4: 267-270.
183. Retana-Marquez S, Salazar ED, Velazquez-Moctezuma J. (1996). Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology.* 21(1): 39-50.
184. Reul J, De Kloet E. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 177: 2505-2512.
185. Risch SC, Cohen PM, Janowsky DS, Kalin NH, Insel TR, Murphy DL. (1981a). Physostigmine induction of depressive symptomatology in normal human subjects. *J Psychiatry Res.* 4:89-94.
186. Risch SC, Janowsky DS, Gillin JC. (1981b). Muscarinic supersensitivity of anterior pituitary ACTH and beta endorphin release in major depressive illness. *Peptides.* 9: 789-792.
187. Risch SC, Janowsky DS, Kalin NH, Cohen RM, Aloji JA, Murphy DL. (1982). Cholinergic beta endorphin hypersensitivity associated with depression. En: Hanin I, Usdin E (Eds). *Biological markers in psychiatry and neurology.* Oxford: Pergamon Press pp. 269-278.

188. Risch SC, Siever LJ, Gillin JC. (1983). Muscarinic supersensitivity of anterior pituitary ACTH release in mayor depressive illness, adrenal cortical dissociation. *Psychopharmacol Bull.* 19:696-698.
189. Rodríguez EL, Broitman ST. (1983). Effect of prenatal and postnatal exposure to therapeutic doses of chlorimipramine on emotionality in the rat. *Psychopharmacology.* 79: 236-241.
190. Rosenwasser AM., Hayes MJ. (1994). Postnatal desipramine treatment alters free-running circadian drinking rhythms in rat. *Psychopharmacology.* 115: 237-244.
191. Roy A, Pickar D, Linnoila M, Chrousos GP, Gold PW. (1987). Cerebrospinal fluid corticotrophin-releasing hormone in depression: Relationship to noradrenergic function. *Psychiatry Res.* 20: 229-237.
192. Roy A, Pickar D, Paul S, Doran A, Chrousos GP, Gol PW. (1987). CSF corticotrophin-releasing hormone in depressed patients and normal control subjects. *Am J Psychiatry.* 144:641-645.
193. Rubin RT, Poland R, Lesser IM. (1989). Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression VIII. Pituitary activity in male patients and matched control subjects. *Psychoneuroendocrinology.* 14: 217-219.
194. Rubin RT, O Toole SM, Rhodes ME, Sekula LK, Czambel RK. (1999). Hypothalamus-pituitary-adrenal cortical responses to low-dose physostigmine and arginine vasopresin administration: sex differences between major depressives and matched control subjects. *Psychiatry Res.* 13: 1-20.
195. Ryan PM. Kelly JP. Chambers PL. Leonard EB. (1996). The characterization of oxotremorine-induced hypothermic response in the rat. *Pharmacol Toxicol.* 79: 238-240.
196. Sachar EJ. Hellman L, Roffwarg HP. (1973). Disrupted 24-hour cortisol secretion in psychotic depression. *Archives of general Psychiatry.* 28: 19-24.
197. Sachar E. (1985). Disorder of feeling: Affective disorders. En: Kandel E, Schwartz JF. (Eds). *Principles of Neuroscience.* Elsevier, Nueva York. pp 17-726.
198. Saito H, Matsumoto M, Togashi H, Yoshioka M. (1996). Functional interaction between serotonin and other neuronal systems: focus on in vivo microdialysis studies. *Jpn J Pharmacol.* 70 (3): 203-205
199. Sanchez C, Meier E. (1997). Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology* 129(3): 197-205.
200. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1986). The Neuroendocrinology.. of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrinol Rev.* 7: 284-301.
201. Sapolsky R, McEwen BS. (1985). Down regulation of neural corticosterone receptor by corticosterone or dexamethasone. *Brain Res.* 339:161-165.
202. Seligman MEP. (1975). *Helplessness: On depression, development and death.* Freeman: San Francisco.
203. Selye H. (1936). A syndrome produces by diverse nocous agent. *Nature* 138:32
204. Selye H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol.* 6: 117-230.
205. Selye H. (1950). *Stress: The physiology and pathophysiology of exposure to stress.* Montreal Acta.
206. Selye H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin Endocrinol.* 6: 117-230.

207. Semba K, Fibiger HC. (1992). Afferent connections of laterodorsal and pedunculopontino tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 323: 387-410.
208. Shiromani PJ, Klemfuss H, Lucero S, Overstreet DH. (1991). Diurnal Rhythm of core body temperature is phase advance in a Rodent model of depression. *Biol Psychiatry* 29: 923-930.
209. Simerly RB, Gorka RA, Swanson LW. (1998). Neurotransmitter specificity of cell and fibers in the medial preoptic nucleus: An immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol.* 246: 343-363.
210. Simpskins JW, Mueller FP, Huang HH, Meites J. (1977). Evidence for depressed catecholamines and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology.* 100: 1672-1678.
211. Sirinathsingji, DJ. (1983). Regulation of lordosis behavior in the female rat by corticotropin-releasing factor, beta-endorphin/corticotrophin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the medial preoptic area. *Brain Res.* 375: 49-56.
212. Siniscalchi A, Bianchi C, Beani L. (1991). Influence of acute and chronic clorimipramine treatment on the 5-HT receptor mediated modulation of acetylcholine release from the cerebral cortex of freely moving guinea pigs. *Br J Pharmacol.* 102(4): 837-840.
213. Smith ER, Lee RL, Schnur SL, Davidson JM. (1987). Alpha adrenoreceptor antagonist and male sexual behavior: I. Mating Behavior. *Physiol Behav.* 41:7.
214. Solberg LC, Olson SL, Turek FW, Redei E. (2001). Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(3): 786-794.
- Stanford C. (1993). Monoamines in responses and adaptation to stress. En: Stanford SC, Salmon P. *Stress: from synapse to syndrome.* Academic Press, London. pp. 282-321.
215. Stanley WJ. (1986). *Historia de la melancolía y la depresión.* Ed. Turner, Madrid. pp 13, 221.
216. Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Scheuingart DE. (1992). Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry.* 32: 756-765.
217. Steiner JA, Graham-Smith D. (1980). Central pharmacological control of corticosterone secretion in the intact rat. Demonstration of cholinergic and serotonergic facilitatory and alpha-adrenergic inhibitory mechanisms. *Psychopharmacology.* 71(3): 213-217.
218. Stokes EP, Sikes CR. (1987). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in affective disorders. En: Meltzer HY. (Ed). *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress.* Raven Press, New York, pp 589-606.
219. Stokes PE. (1966). Pituitary suppression in psychiatric patients. Abstract No. 150. Program of the 48<sup>th</sup> Meeting of the endocrines Society, Chicago, Illinois. pp 101.
220. Szechtman H, Lambrou PJ, Caggiula AR, Redgate ES. (1974). Plasma corticosterone levels during sexual behavior in male rats. *Horm Behav.* 5: 191-200.
221. Szafarczyk A, Alonso G, Ixart G, Malaval F, Assenmacher I. (1985). Diurnal-stimulated and stress-induced ACTH release in rats is mediated by ventral noradrenergic bundle. *Am J Physiol.* 249: 219-26.

222. Takahashi LK, Kalin NH, Vanden Burgt JA, Sherman JE. (1989). Corticotropin releasing factor modulates defensive-withdrawal and exploratory behavior in rats. *Behav Neurosci.* 103: 648-654.
223. Tamanini C, Giordano N, Chiesa F, Seren E. (1983). Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating. *Acta Endocrinol.* 102(3):447-450.
224. Thierry B, Steru L, Chermat R, Simon P. (1984). Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav Neural Biol.* 41(2): 180-189.
225. Thakkar MM, Strecker RE, McCarley RW. (1998). Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J Neurosci.* 18(4): 5490-5497.
226. Trestman R.L, Coccaro EF, Bernstein D, Lawrence T, Gabriel SM., Horvath TB, Siever LJ. (1991). Cortisol responses to mental arithmetic in acute and remitted depression. *Biol Psychiatry.* 29: 1051-1054.
227. Terman G, Shavit Y, Lewis J, Cannon J, Liebeskind J. (1984). Intrinsic mechanisms in pain inhibition: activation by stress. *Science.* 226: 1270-1277.
228. Tidors FJ, Berkenbosch F, Smelik PG. (1982). Adrenergic mechanisms involved in the control of pituitary-adrenal activity in the rat: a beta-adrenergic stimulatory mechanism. *Endocrinology.* 110(1):114-120.
229. Van de Kar LD. (1989). Neuroendocrine aspects of the serotonergic hypothesis of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 13: 237-246.
230. Vanderpool J, Rosenthal N, Chrousos GP, Wher T, Gold PW. (1991). Evidence for hypothalamic CRH deficiency in patients with seasonal affective disorder. *J Clin Endocrinol Metab.* 72: 1382-1387.
231. Vázquez-Palacios G, Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. (2001). Further definition of the effect of corticosterone on the sleep-Wake pattern in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 70: 305-310.
232. Velázquez-Moctezuma J, Díaz-Ruiz O. (1992). Postnatal treatment with clomipramine increased immobility in the forced swim test: An attribute of animal models of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 42: 737.
233. Velázquez-Moctezuma J. (1994). Panorámica actual de los modelos animales de depresión. *Psiquis* 1: 11-13.
234. Vijayakumar M, Datta S. (2002). Clomipramine treatment in postnatal rats alters the brain acetylcholinesterase activity in adulthood. *Neurosci Lett.* 330: 119-121.
235. Vijakumar M, Meti BL. (1999). Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine-induced animal model of endogenous depression. *Neurochem Res.* 24 (3): 345-349.
236. Vogel GW. (1983). Evidence for REM sleep deprivation as the mechanism of action of antidepressant drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 7: 343-349.
237. Vogel GW, Buffenstein A, Minter K, Hennessey A. (1990a). Drug effects on REM sleep and on endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 14: 49-63.
238. Vogel G, Neill D, Hagler M, Kors D, Hartley P. (1990b). Decreased intracranial self-stimulation in a new animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 14: 65-68.
239. Vogel G, Neill D, Hagler M, Kors D. (1990c). A new animal model of endogenous depression: A summary of present findings. *Neurosci Biobehav Rev.* 14: 85-87.

240. Vogel G, Neill D, Kors D, Hartley P. (1990d). REM sleep abnormalities in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 14: 77-83.
241. Vogel G, Hagler M, Hennessey A, Richard C. (1996). Doses-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after postnatal clomipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav.* 54: 605-609.
242. Vogel G, Vogel FA. (1982). A new animal model of human endogenous depression. *Sleep Res.* 11:222.
243. Von Bardeleben, U, Stalla G.K., Mueller O.A. Holboer F. (1988). Blunting of ACTH response to ACTH in depressed patients is avoided by metyrapone pretreatment. *Biol Psychiatry.* 24:782-786.
244. Von Bardeleben U, Holboer F. (1989). Cortisol response to a combined dexamethasone hCRH challenge in patients with depression. *J Neuroendocrinology.* 1:485-488.
245. Weidenfeld J, Bodoff M, Saphier D, Brenner T. (1989). Further studies on the stimulatory action of nicotine on adrenocortical function in the rat. *Neuroendocrinology.* 50(2): 132-138.
246. Whittaker-Azmitia PM. (1991). Role of serotonin and other neurotransmitter receptor in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 553-561.
247. Whittaker-Azmitia PM. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull.* 56(5): 479-85.
248. Willner P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83:1-16.
249. Willner P. (1985). *Depression: a psychobiological synthesis.* Wiley, New York.
250. Willner P, Towell A, Sapon D, Sophokleus Muscat R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology.* 93: 358-364.
251. Willner P. (1991). Animal models of depression. En: *Behavioral models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives.* Willner P (Ed). Cambridge University, London England. pp. 91-125.
252. Wolkowitz OM. (1994). Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids. *Psychoneuroendocrinology.* 19: 233-256.
253. Woodward JH, Emery PW. (1987). Determination of plasma corticosterone using high performance liquid chromatography. *J Chromatography.* 4119: 280-284.
254. Yanielli PC, Cutrera RA, Cardinali DP, Golombek C. (1998). Postnatal clomipramine treatment of Syrian hamsters: effect on the circadian system. *Eur J Pharmacol.* 349:143-150.
255. Yates E, Marsh D, Maran J. (1980). The adrenal cortex. En: Mountcastle V. (Ed). *Medical Physiology.* Vol. II. 14<sup>th</sup> ed. C.V. Mosby. St Louis. pp. 1558-1601.
256. Yavari P, Vogel GW, Neill DB. (1993). Decreased raphe unit activity in a rat model of endogenous depression. *Brain Res.* 14; 611(1):31-6.
257. Young EA, Watson SJ, Kotun J, Haskett RF, Grunhaus L, Murphy-Weinberg V, Vale W, Rivier J, Akil H. (1990). Response to low dose CRH in endogenous depression. Role of cortisol feedback. *Arch Gen Psychiatry.* 47: 449-457.

258. Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V., Watson SJ, Akil H. (2000). Hormonal evidence for alters responsiveness to social stress in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 23: 411-418.
259. Zandio M, Ferrín M, Cuesta MJ. (2002). Neurobiología de la depresión. *A Sist Sanit Navar*. 3: 43-62.
260. Zar JH. (1984). *Bioestadistical análisis*. 2nd (ed) Engelwood cliff, Prentice-Hall Internacional Inc. New Jersey.

## APENDICE

## Corticosterone and Testosterone Levels after Chronic Stress in an Animal Model of Depression

H. Bonilla-Jaime S. Retana-Marquez G. Vazquez-Palacios  
J. Velázquez-Moctezuma

Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

### Key Words

Animal models of depression · Stress · Corticosterone · Testosterone · Clomipramine

### Abstract

Neonatal administration of clomipramine (CMI) in rats induces behavioral changes during adulthood, such as impairments of pleasure-seeking behaviors. However, the endocrine changes induced by this treatment are controversial. In the present study, we analyzed the levels of corticosterone and testosterone in rats neonatally treated with CMI in response to chronic stress by repeated immersion in cold water. Results obtained in the forced swim test corroborated the effect of neonatal CMI administration, showing a significant increase in immobility time. The testosterone response to stress was similar in both control and CMI-treated rats. Concerning corticosterone, there was a significantly lower response to stress in CMI-treated rats. The data suggest that CMI induces permanent changes in the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, without affecting the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Neonatal administration of clomipramine (CMI) in rats produces behavioral abnormalities during adulthood [1–3] that closely resemble some of the symptoms observed in human depression. These behavioral abnormalities include locomotor hyperactivity in open field tests [4], increased percentage of REM sleep [3], increased immobility in forced swim tests (Porsolt test) [5], increased voluntary intake of ethanol [6, 7], decrease in pleasure-seeking behaviors such as intracranial self-stimulation [3], as well as a decrease in male sexual behavior [8–11]. In addition, some reports indicate that classical antidepressant treatment (such as imipramine administration or REM sleep deprivation) normalize these altered behaviors [3]. Administration of nicotine, whose antidepressant properties have been reported [12, 13], also reverses some of the behavioral abnormalities in this model [14]. Therefore, this procedure has been suggested as an animal model of depression [3].

It is well known that human depression often includes high cortisol levels [15, 16]. These elevated cortisol levels cannot be diminished by dexamethasone administration [17]. As neonatal treatment with CMI has been proposed as an animal model of depression, some studies have analyzed the circulating levels of corticosterone. Prathiba et al. [18] have reported high levels in basal conditions. In contrast, Ogawa et al. [19] have found no differences

KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel  
0302-792X/03/482-0055\$19.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/nps

Dr. Javier Velázquez-Moctezuma  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
09340 Iztapalapa, Mexico City (Mexico)  
Tel. +525 58044701, Fax +525 58044704, E-Mail jvelazq@ciqa.iamm.unam.mx

between controls and animals treated with CMI, but they reported a low response of corticosterone to acute immobilization stress. Thus, despite of the contradictory results of these studies, it seems that the regulatory system of corticosterone release is altered in CMI-treated rats. As corticosterone release is a major expression of the stress response, it would be expected that neonatal CMI-treated rats show an abnormal stress response.

In addition, reciprocal interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG) have been reported. Activation of the HPA axis by stress exerts an inhibitory effect on the HPG axis [20, 21]. In the present study, we analyzed the reactivity of the HPA and the HPG axes and the possible interactions between them in rats neonatally treated with CMI. To this end, we assessed plasma levels of both corticosterone and testosterone after chronic stress by repeated immersion in cold water.

## Methods

Pregnant Wistar rats from our own vivarium were used in this study. Three days after delivery, female pups and male pups were cross-fostered, keeping the same size ( $n = 4$ ) in all the litters. All animals were kept on a reversed 12-hour light cycle with lights on at 21.00 h. Food and water were available ad libitum. Management of the rats throughout the experiments was in accordance to NIH guidelines. Male pups were injected subcutaneously twice a day (09.00 and 18.00) from 8 to 21 days of age. Each litter received the same treatment. One group ( $n = 20$ ) received CMI (15 mg/kg 0.1 ml) in each injection. In order to assess the effects of handling, injections and disruptions of maternal behavior inherent to the treatment, a control group ( $n = 20$ ) received saline in the same volume and the same number of injections. At 23 days of age, the pups were weaned and housed in groups (5 per cage with the same treatment).

### Forced Swim Test

To evaluate the depressive effect of neonatal CMI treatment, 40 rats ( $n = 20$  for each group) were submitted to the forced swim test during adulthood (at 4–5 months of age). In brief, the test consists of placing the animal in a column of water (15 cm deep, 21 °C) during 15 min the first day and 5 min the following day, and recording the time of immobility the rats display during these periods [22]. The rat was judged immobile if it was passively standing up, making only small movements to keep its head above the water [5].

One week after being submitted to the forced swim test, rats neonatally treated with CMI (approximately 5 months of age) were randomly assigned to one of the following groups: group A: neonatally treated with CMI and submitted to stress ( $n = 10$ ), and group B: neonatally treated with CMI and kept undisturbed ( $n = 10$ ). Control rats (approximately 5 months of age) were randomly assigned to one of the following groups: group C: control subjects neonatally treated with saline submitted to stress ( $n = 10$ ), and group D: control subjects neonatally treated with saline kept undisturbed ( $n = 10$ ).

### Stress by Immersion in Cold Water

Chronic stress by immersion in cold water was achieved by placing the animals in a tank of cold water (depth = 16 cm; temperature = 15 °C) where they either swam or remained in an upright position keeping their head above the water level. This had a 15-min duration and was performed daily for 10 days during the second or third hour of the dark phase of the cycle. Animals were sacrificed by decapitation, half an hour after the last stress test, i.e., 3 h after the onset of the dark phase of the cycle.

### Hormonal Assessment

A blood sample was collected in the dark phase (3 h after the beginning of darkness) and the time difference between the first and the last subject was approximately 10 min. Males were decapitated and trunk blood was collected. Corticosterone and testosterone were extracted from plasma and quantified by high-performance liquid chromatography using a modification of the method reported by Woodward and Emery [23]. Interassay and intra-assay coefficients of variation (CV) were determined using 4 plasma pools in the 1.5–50 µg/dl (corticosterone) and 0.2–8 ng/ml (testosterone) ranges, covering the normal ranges in rat plasma. The average CV for intraday and CV for intraday and interday precision for testosterone were 2.93 and 7.12%, respectively. The detection limit of the assay for corticosterone was 0.05 µg/dl, and the detection limit of the assay for testosterone was 0.05 ng/ml, at a signal to noise ratio of 2:1. The average recovery of the steroids after extraction from blood was about 85%.

### Statistical Analysis

Immobilization time during the forced swim test was analyzed using the Student *t* test. Comparisons of plasma levels of both corticosterone and testosterone between the control and experimental groups were analyzed by a two-factor ANOVA followed, when significant, by the Newman-Keuls analog test.

## Results

Time of immobility was significantly longer in rats treated neonatally with CMI both in the 15-min (control  $686 \pm 9.8$  s versus CMI-treated  $791 \pm 7.9$  s;  $p < 0.01$ ) and in the 5-min tests (control  $207 \pm 7.7$  s versus CMI-treated  $262 \pm 3$  s;  $p < 0.01$ ) compared with animals treated with saline.

Hormonal assessment showed that basal levels of testosterone were similar between the groups (B and D) that were kept undisturbed. After 10 days of exposure to stress by immersion, plasmatic levels of testosterone decreased significantly in both stressed groups [A and C;  $F(1, 36) = 97.96$ ;  $p < 0.0001$ ; fig. 1a]. This decrease in testosterone was also similar in both groups of rats submitted to stress, regardless of the neonatal treatment.

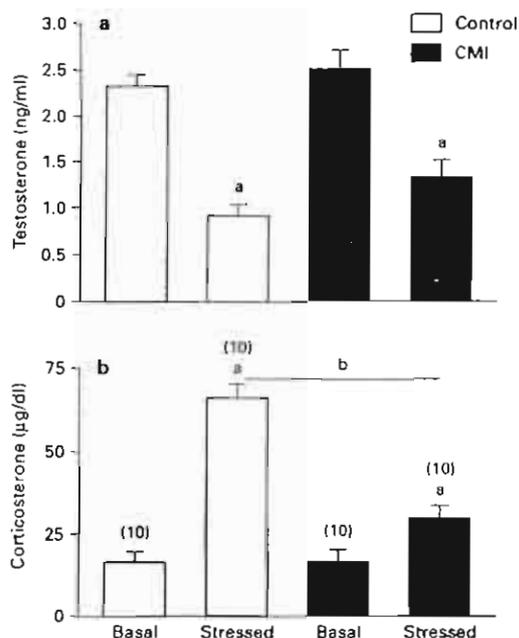
Concerning corticosterone, basal plasma levels of this steroid were similar in both groups that were kept undisturbed (groups B and D). Stress induced a signifi-

cant increase in both stressed groups [groups A and C;  $F(1, 36) = 55.147$ ;  $p < 0.0001$ ] when compared with their nonstressed controls. However, when comparing both stressed groups, the increase induced by stress in rats neonatally treated with CMI (group A) was significantly lower than that observed in the group of rats neonatally treated with saline (group C; Newman-Keuls,  $p < 0.01$ ). The increase in corticosterone in group C (stressed treated with saline) was about 256%, while in group A (stressed treated with CMI), it was 175% compared with their respective nonstressed controls. Factorial analysis shows that the diminished increase in the plasma levels of corticosterone in the subjects of group A may be due to the neonatal treatment with CMI [ $F(1, 36) = 13.32$ ;  $p < 0.0009$ ].

## Discussion

It seems clear that the response of the HPA axis to chronic stress is diminished in subjects neonatally treated with CMI. Studies mentioned above reported contradictory results concerning corticosterone levels in rats neonatally treated with CMI [18, 19]; however, the moment of the light cycle in which the samples were taken was not reported. In the present study, the levels of corticosterone are similar to those reported in the literature for the dark phase of the cycle. Dunn et al. [24] reported 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , Torrelas et al. [25] reported 30.7  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , Persengiev et al. [26] reported 24  $\mu\text{g}/\text{dl}$  and Ottenweller et al. [27] reported 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Thus, it seems that the high levels of cortisol observed in depressed humans are not reproduced in this suggested animal model of depression.

Previous studies have reported that the activation of the HPA axis by stress exerts an inhibitory effect on the HPG axis [20, 21]. Our results show that exposure to stress caused an increase in plasma corticosterone levels and a decrease in testosterone in both saline- and CMI-treated groups, which may be a reflection of this proposed inhibitory influence of the HPA axis on the HPG axis. However, in males neonatally treated with CMI, the increase in the levels of corticosterone was significantly lower compared with their saline-treated controls, while the levels of testosterone showed no differences when both treatments were compared. These results suggest that CMI treatment induces an impairment in the regulatory communication that normally exists between both HPA and HPG axes. It is also possible that other factors, such as the opioidergic system, could be involved in the lack of testosterone response to stress.



**Fig. 1.** Plasma levels of testosterone (a) and corticosterone (b) in rats neonatally treated with saline or CMI. <sup>a</sup>  $p < 0.01$  compared with their respective undisturbed controls. <sup>b</sup>  $p = 0.01$  comparing both stressed groups. ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test.

The forced swim test has been used mainly to evaluate potential antidepressant treatments in normal rats [28]. It has also been suggested as a tool to assess depressive states in animal models of depression [5]. These results corroborate previous findings concerning permanent alterations of performance in the forced swim test in CMI-treated animals [5].

Our results are in concordance with previous studies, which have reported that different neonatal manipulations induce a decrease in the response of the HPA axis to stress during adulthood. In 1989, Meaney et al. [29] reported that neonatal handling of rats decreases their response to restraint stress during adulthood, suggesting that the negative feedback of corticosterone is enhanced due to an increase in glucocorticoid receptor binding capacity. Neonatal treatment with dexamethasone results in the attenuation of ACTH and corticosterone elevation after restraint stress [30]. The decrease in corticosterone levels after water immersion stress observed in the present study is also similar to that reported by Ogawa et

al. [19] after immobilization stress during 2 h in rats neonatally treated with CMI. Furthermore, REM sleep deprivation, which is a well-known stressor [31, 32], induced a paradoxical decrease in corticosterone in rats neonatally treated with CMI [18]. Thus, it seems that regardless of the stressor used, the response of the HPA axis is diminished in animals neonatally treated with CMI.

## Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Edith Monroy for her expert advice on language. This study was partly supported by CONACyT 400200-5-26442M (J.V.-M.).

## References

- Mirmiran M, Van de Poll NE, Corner MA, Van Oyen HG, Bour HL: Suppression of active sleep by chronic treatment with clomipramine during early postnatal development: Effects upon adult sleep and behavior in the rat. *Brain Res* 1981;204:129-146.
- Vogel GW, Vogel F: A new animal model of human endogenous depression. *Sleep Res* 1982;11:222a.
- Vogel GW, Hartley P, Neill D, Hagler M, Kors D: A new animal model of endogenous depression: A summary of present findings. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:85-91.
- Hartley P, Neill D, Hagler M, Kors D, Vogel G: Procedure- and age-dependent hyperactivity in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:69-72.
- Velázquez-Moctezuma J, Díaz-Ruiz O: Neonatal treatment with clomipramine increased immobility in forced swim test: An attribute of animal models of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;42:737-739.
- Hilakivi LA, Sinclair JD: Effect of neonatal clomipramine treatment on adult alcohol drinking in the AA and ANA rat lines. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1451-1455.
- Dwyer SM, Rosenwasser AM: Neonatal clomipramine treatment, alcohol intake and circadian rhythms in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1998;138:176-183.
- Neill D, Vogel GW, Hagler M, Kors D, Hennessey A: Diminished sexual activity in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:73-76.
- Velázquez-Moctezuma J, Aguilar-García A, Díaz-Ruiz O: Behavioral effects of neonatal treatment with clomipramine, scopolamine, and idazoxan in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46:215-217.
- Vogel G, Hagler M, Hennessey A, Richard C: Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clomipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;564:605-609.
- Bonilla-Jaime H, Retana-Marquez S, Velázquez-Moctezuma J: Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:39-45.
- Djune VJ, Dunn E, Overstreet DH, Dragomir A, Sciner M: Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of Flinders resistant and sensitive lines. *Physiol Behav* 1999;67:533-537.
- Tizabi Y, Overstreet DH, Rezvani AH, Louis VA, Clark E, Janowsky DS, Kling MA: Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;142:193-199.
- Martínez-González D, Prospero-García O, Mihailescu S, Drücker-Colin R: Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72:355-364.
- Sachar EJ, Hellman L, Roffwarg HP, Halpern FS, Fukushima DK, Gallagher TF: Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Arch Gen Psychiatry* 1973;28:19-24.
- Chockley S: The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull* 1996;52:597-617.
- Heuser I, Yassourides A, Holsboer F: The combined dexamethasone/CRH test: A refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 1994;28:341-356.
- Prathiba J, Kumar KB, Karanth KS: Hyperactivity of hypothalamic pituitary axis in neonatal clomipramine model of depression. *J Neural Transm* 1998;105:1335-1339.
- Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muncoka K, Mori KJ, Takahashi K: Effect of the altered serotonergic signalling by neonatal treatment with 5,7-dihydroxytryptamine, ritanserin or clomipramine on the adrenocortical stress response and the glucocorticoid receptor binding in the hippocampus in adult rats. *J Neural Transm* 1994;96:113-123.
- Calogero AE, Burrello N, Bosboom AM, Garofalo M, Weber RF, D'Agata R: Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level. *J Endocrinol Invest* 1999;22:666-670.
- Collu R, Gibb W, Ducharme GR: Effects of stress on the gonadal function. *J Endocrinol Invest* 1984;7:529-537.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M: Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730-732.
- Woodward CJ, Emery PW: Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987;419:280-284.
- Dunn J, Scheving L, Millet P: Circadian variation in stress-evoked increases in plasma corticosterone. *Am J Physiol* 1972;223:402-406.
- Torrellas A, Guaza C, Borrell J, Borrell S: Adrenal hormones and brain catecholamines responses to morning and afternoon immobilization stress in rats. *Physiol Behav* 1981;26:129-133.
- Persengiev S, Kanchev L, Verzenkova G: Circadian patterns of melatonin, corticosterone and progesterone in male rats subjected to chronic stress: Effect of constant illumination. *J Pineal Res* 1991;11:57-62.
- Ottewill JE, Servatius R, Natelson BJ: Repeated stress persistently elevates morning, but not evening, plasma corticosterone levels in male rats. *Physiol Behav* 1994;55:337-340.
- Borsini F, Meli A: Is the forced swim test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 1988;94:147-160.
- Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A: Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 1989;50:597-604.
- Felszeghy K, Bagdy G, Nyakas C: Blunted pituitary-adrenocortical stress response in adult rats following neonatal dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol* 2000;12:1014-1021.
- Hairston IS, Ruby NF, Brooke S, Peyron C, Denning DP, Heller HC, Sapolsky RM: Sleep deprivation elevates plasma corticosterone levels in neonatal rats. *Neurosci Lett* 2001;315:29-32.
- SucHECKI D, Lobo LL, Hipolide DC, Tufik S: Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 1998;7:276-281.



# Plasma levels of corticosterone and testosterone after sexual activity in male rats treated neonatally with clomipramine

H. Bonilla-Jaime, S. Retana-Marquez, G. Vazquez-Palacios and J. Velázquez-Moctezuma

Neonatal treatment with clomipramine (CMI) in rats, induces alterations of pleasure-seeking behaviors during adulthood. Alterations of hormonal responses to stressful situations have also been reported. In this study, the levels of corticosterone and testosterone in response to sexual activity were assessed in rats treated neonatally with CMI. Male pups received subcutaneous injections of CMI (15 mg/kg, 0.1 ml), twice a day (09.00 hours and 18.00 hours) from 8 to 21 days of age. A control group received saline in the same number of injections. Four months after CMI treatment, subjects (Ss) were submitted to the forced swim test to verify the effect of CMI. Thereafter, they were tested to assess their spontaneous sexual activity. Plasma levels of corticosterone and testosterone were assessed under different conditions. Results of sexual behavior and the forced swim test corroborate the depressive-like effect of CMI. The sole presence of an estrogenized stimulus female caused an increase in plasma levels of testosterone in both control and CMI-treated Ss. The same was true for corticosterone; however, this increase was significantly lower in the CMI-treated group. There is a discrepancy

between the normal hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) response and the decreased sexual behavior. The data suggest that CMI induces permanent changes in the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Behavioural Pharmacology* 00:000-000 © 2003 Lippincott Williams & Wilkins.

*Behavioural Pharmacology* 2003, 00:000-000

**Keywords:** animal models of depression, sexual behavior, corticosterone, testosterone, neonatal clomipramine, forced swim test, rat

Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico.

Sponsorship: This study was supported partly by CONACyT 400200-5-28442M (JVM).

Correspondence and requests for reprints to Dr Javier Velázquez Moctezuma, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C.P. 09340, Iztapalapa, D.F. México. E-mail: jvm@xanum.uam.mx

Received 4 February 2003 Accepted as revised 4 April 2003

## Introduction

Neonatal administration of clomipramine (CMI) in rats produces behavioral abnormalities during adulthood (reviewed by Vogel and Vogel, 1982; Vogel *et al.*, 1990), which closely resemble some of the symptoms observed in human depression. These behavioral abnormalities include locomotor hyperactivity in open field tests (Hartley *et al.*, 1990), increased percentage of rapid eye movement (REM) sleep (Vogel *et al.*, 1990), increased immobility in forced swim tests (Porsolt test) (Velázquez-Moctezuma and Diaz-Ruiz, 1992), increased voluntary intake of ethanol (Hilakivi and Sinclair, 1986; Dwyer and Rosenwasser, 1998), a decrease in pleasure-seeking behaviors such as intracranial self-stimulation (Vogel *et al.*, 1990), as well as a decrease in male sexual behavior (Neill *et al.*, 1990; Velázquez-Moctezuma *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1996; Bonilla-Jaime *et al.*, 1998). In addition, some reports indicate that classical antidepressant treatment (such as imipramine administration or REM sleep deprivation) normalize these altered behaviors (Vogel *et al.*, 1990). Administration of nicotine, for which antidepressant properties have been reported (Salin-Pascual and Druicker-Colin, 1998; Djuric *et al.*, 1999; Tizabi *et al.*,

1999), also reverses some of the behavioral abnormalities seen in this model (Martinez Gonzalez *et al.*, 2002). Therefore, this procedure has been suggested as an animal model of depression (Vogel *et al.*, 1990).

Since the pioneering work of Mirmiran *et al.* (1981), it has been suggested that these long-term effects of neonatal clomipramine treatment are due to developmental interference in which the suppression of REM sleep is involved. However, pharmacological studies using neonatal treatment with more specific drugs that also suppress REM sleep, such as zimelidine, desipramine (Hilakivi and Hilakivi, 1987; Hilakivi *et al.*, 1987; Frank and Heller, 1997), sepolamine (Velázquez-Moctezuma *et al.*, 1993), or the selective serotonin-reuptake inhibitor, LU 10-134-C (Hansen *et al.*, 1997), have suggested that the altered development of the serotonergic system could be responsible for the behavioral alterations in adulthood, rather than early REM sleep deprivation.

On the other hand, it is known that human depression often includes high cortisol levels (Sachar *et al.*, 1973; Checkley, 1996). As neonatal treatment with clomipra-

mine has been proposed as an animal model of depression, it would be important to verify that this treatment induces high levels of corticosterone. Some studies have analyzed circulating levels of corticosterone in rats treated neonatally with CMI, reporting controversial results, including hyperactivity (Prathiba *et al.*, 1998) or diminished responsiveness (Ogawa *et al.*, 1994). However, it seems that the regulatory system of corticosterone release is altered in CMI-treated rats.

In addition, it has been reported that the activation of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis by stress exerts an inhibitory effect on the hypothalamus–pituitary–gonadal (HPG) axis (Collu *et al.*, 1984; Calogero *et al.*, 1999). However, it has been shown that there is an increase of both corticosterone and testosterone after masculine sexual behavior in several mammalian species (Szachman *et al.*, 1974; Agmo, 1976; Kamel and Frankel, 1978; Rabb *et al.*, 1989; Borg *et al.*, 1991; Retana-Márquez *et al.*, 1998), suggesting that both axes are activated simultaneously by sexual behavior.

To further analyze the reactivity and the possible interactions of the HPA and the HPG axes in rats treated neonatally with CMI, the present study assessed the plasma levels of both corticosterone and testosterone after different sexual conditions.

## Methods

### Subjects

Pregnant Wistar rats from our own vivarium were used in this study. Three days after delivery, male pups were cross-fostered, keeping the same size ( $n = 4$ ) in all the litters. All animals were kept on a reversed 12-h light–dark cycle, with lights on at 21.00 hours. Food and water were freely available. Management of the rats throughout the experiments was in accordance to NIH guidelines. Male pups were injected s.c. twice a day (09.00 and 18.00 hours) from 8 to 21 days of age. Each litter received the same treatment. One group (CMI,  $n = 28$ ) received clomipramine (15 mg/kg, 0.1 ml) in each injection. In order to assess the effects of handling, injections and disruptions of maternal behavior inherent in the treatment, a control group (CON,  $n = 26$ ) received saline in the same volume and the same number of injections. At 23 days of age the pups were weaned and housed in groups (six per cage with the same treatment).

### Forced swim test

To evaluate the effect of neonatal clomipramine treatment, 54 Ss (CMI = 28 and CON = 26) were submitted to the forced swim test during adulthood (at 4–5 months of age). In brief, the test consists of placing the animal in a cylinder of water (15 cm deep, 21°C) for 15 min the first day and 5 min the following day, and recording the time of immobility that the rats display during these periods

(Porsolt *et al.*, 1977). The rat was judged immobile if it was passively floating, making only small movements to keep its head above the water (Velázquez Moctezuma and Diaz Ruiz, 1992).

### Sexual behavior test

One week after the Porsolt test, 5-month-old subjects were tested three times for spontaneous masculine sexual behavior, with 3 days between successive tests. Behavioral tests were conducted during the dark phase of the cycle, under dim red illumination. Male rats were placed in a circular Plexiglass arena (45 cm diameter) for 5 min, for habituation, before introducing a stimulus female, artificially brought into estrous with sequential treatment with 10 µg of estradiol benzoate (s.c., 0.1 ml corn oil, 48 h before testing) plus 1 mg of progesterone 44 h later. Each test lasted 30 min. The following indicators of male sexual behavior were measured: latencies and frequencies of mount, intromission and ejaculation, postejaculatory interval, intercopulatory and interintromission interval, as well as the hit rate [(number of intromissions + number of mounts)/number of intromissions]. The full definition of each parameter can be found elsewhere (Sachs and Meisel, 1988).

Four days after the three sexual behavior tests, both groups (control and CMI treated) were randomly subdivided. In one group of rats treated neonatally with CMI (CMI-Basal,  $n = 10$ ), basal levels of corticosterone and testosterone were determined without sexual behavior testing. In another group of rats, treated neonatally with CMI (CMI-SB,  $n = 18$ ), plasma hormone levels were determined immediately after a fourth sexual behavior test (i.e. blood samples were obtained within 10 min after the end of the behavioral test). Control subjects, injected neonatally with saline, were also randomly subdivided in two groups: CON-Basal ( $n = 10$ ), testosterone and corticosterone levels were assessed without sexual activity; and CON-SB ( $n = 16$ ), steroid levels were determined after a fourth sexual behavior test. Experiments were done within the first 3 h of the dark period.

### Hormonal assessment

A blood sample was collected in the dark phase (3 h after the beginning of darkness); the time difference between the first and the last subject was approximately 10 min. Males were decapitated and trunk blood was collected. Corticosterone and testosterone were extracted from plasma and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a modification of the method reported by Woodward and Emery (1987). Blood samples were centrifuged and plasma (1 ml) was mixed with 100 µl 19-nortestosterone solution (5 mg/ml in methanol) as an internal standard. Steroids were extracted into 5 ml diethyl ether–dichloromethane (60/40 v/v), mixed by vortex, and centrifuged immediately for

5 min. The supernatant was vortex mixed with 1 ml HPLC-grade water. After centrifugation, the supernatant (3 ml) was evaporated at room temperature under nitrogen. The residue was redissolved in 100 µl of methanol-water (60/40 v/v). The guard column and the column were equilibrated using HPLC-grade methanol-water (60/40 v/v) at a flow rate of 0.4 ml/min. Separations were made at a temperature of 40°C, in a Waters Symmetry C18 column. A Waters 600-MS system controller was used to flush the mobile phase and the steroids were assessed with a 486 Waters UV absorbance detector (fitted at 250 nm). Results were analyzed using the Maxima 820 Chromatography Workstation, obtained from Waters (Milford, Massachusetts, USA). Inter-assay and intra-assay coefficients of variation (CV) were determined using four plasma pools in the 1.5–50 µg/dl (corticosterone) and 0.2–8 ng/ml (testosterone) ranges, covering the normal ranges in rat plasma. The average CV for intra-day and the CV for intra-day and inter-day precision for testosterone were 2.93% and 7.12%, respectively. The detection limit of the assay for corticosterone was 0.05 µg/dl, and the detection limit of the assay for testosterone was 0.05 ng/ml, at a signal to noise ratio of 2:1. The average recovery of the steroids after extraction from blood was about 85%.

#### Statistical analysis

Immobilization time during the forced swim test was analyzed using Student's *t*-test. Percentages of males displaying mounts, intromissions and ejaculations were analyzed using the Chi-square test. Analysis of the parameters of sexual activity was performed using the Mann-Whitney U-test. Comparisons of both corticosterone and testosterone plasma levels between the control and experimental groups were analyzed by an ANOVA, followed, when significant, by the Newman-Keuls analog test.

#### Results

Time of immobility was significantly longer in rats treated neonatally with CMI, both in the 15 min (CON 673 ± 9 s versus CMI 787 ± 6 s;  $t_{25,27} = -9.409$ ;  $P < 0.001$ ) and in the 5 min tests (CON 199 ± 6 s versus 255 ± 3 s;  $t_{25,27} = -8.1014$ ;  $P < 0.001$ ) compared to animals treated with saline.

Analysis of the fourth test of sexual behavior showed that neonatal treatment with clomipramine significantly

reduced the percentage of Ss displaying mounts (9 of 18) ( $\chi^2(1) = 32.00$ ,  $P < 0.001$ ), intromissions (9 of 18) ( $\chi^2(1) = 32.00$ ,  $P < 0.001$ ), and ejaculations (6 of 18) ( $\chi^2(1) = 61.01$ ,  $P < 0.001$ ), while almost all the Ss treated with saline (14 out of 16) displayed activity. Sexually inactive Ss during the preliminary tests (1–3) remain inactive during the fourth test, showing that CMI treatment completely inhibits sexual behavior in 50% of the Ss. When analyzing the behavioral features of active Ss, there were significant differences between CMI-treated and saline-treated rats. Table 1 shows sexual parameters in males after sexual behavior testing. A significant increase in mount (Mann-Whitney U-test;  $P < 0.05$ ), intromission ( $P < 0.05$ ), and ejaculation latencies ( $P < 0.05$ ) was observed in CMI-treated rats. The number of mounts and intromissions preceding ejaculation did not show any differences between experimental and control groups. Ejaculatory frequency and hit rate displayed a significant reduction ( $P < 0.01$ ), whereas the intercopulatory interval and the interintromission interval were significantly increased ( $P < 0.01$ ) in the CMI-treated rats.

Figure 1A shows the levels of testosterone after different sexual conditions. As CMI treatment induced a total inhibition of sexual behavior in some Ss, the experimental Ss were subdivided in two groups according to their sexual activity. Males that failed completely to display even a mount, were grouped as Ss without sexual activity (CMI-SB-A,  $n = 9$ ). Those males displaying from one mount to several ejaculations were grouped as Ss with sexual activity (CMI-SB-B,  $n = 9$ ). Data show that when both saline- (CON-SB) and CMI (CMI-SB-A and CMI-SB-B)-treated Ss were kept with a stimulus female, there was a significant increase in plasma levels of testosterone [ $F(4,53) = 13.77$ ,  $P < 0.001$ ] when compared to the saline (CON-Basal) and CMI (CMI-Basal) Ss that were not in the presence of a stimulus female. This rise of testosterone levels was similar in both groups. Concerning Ss treated with CMI, the data obtained from copulating and from noncopulating Ss showed that testosterone increased to the same extent regardless of sexual performance. In both cases, the levels of testosterone were higher than basal levels. The presence of a receptive female also induced a significant rise of corticosterone levels in both experimental and control groups [ $F(4,53) = 21.77$ ,  $P < 0.001$ , panel B]. When compared to their controls, the increase of corticosterone

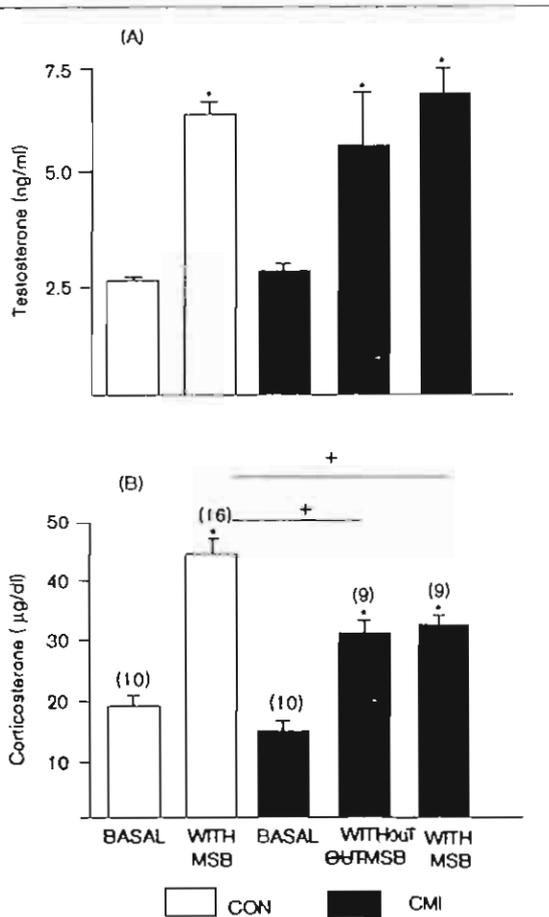
Table 1 Fourth test of copulatory activity in adult male rats treated neonatally with saline or clomipramine

	EF	ML	IL	EL	NM	NI	ICI	III	HR
CON ( $n = 14$ )	2.8 ± 0.32	44 ± 13	53 ± 16	392 ± 67	5.7 ± 1.5	10.4 ± 0.9	24 ± 4.0	38.6 ± 6.4	0.68 ± 0.36
CU ( $n = 9$ )	1.1 ± 0.3**	268 ± 126*	351 ± 151*	659 ± 89*	6.6 ± 0.6	7.5 ± 0.01	51 ± 5.4**	105 ± 22**	0.58 ± 0.05**

\* $P < 0.05$ ;

\*\* $P < 0.01$  compared with control group. Mean ± SEM. Mann-Whitney U test. EF, Ejaculatory frequency; ML, mount latency; IL, intromission latency; EL, ejaculatory latency; NM, number of mounts; NI, number of intromissions; ICI, intercopulatory interval; III, interintromission interval; HR, hit rate.

Fig. 1



Plasma levels of testosterone (A) and corticosterone (B) in rats treated neonatally with saline (CON) or clomipramine (CMI). The numbers on the bars express the number of subjects in each group. WITHOUT MSB, rats treated with CMI that did not display copulatory activity during the sexual behavior test; WITH MSB, animals that displayed sexual behavior. \* =  $P < 0.01$  compared to their respective basal controls. +  $P = 0.01$  comparing both groups showing sexual behavior. ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc*.

was significantly smaller in the CMI groups. There were no significant differences in corticosterone increase between CMI-treated males that copulated compared to noncopulating males.

## Discussion

We observed that the presence of a receptive female causes an increase in plasma testosterone and corticosterone in both CMI-treated and saline-control males. This finding is similar to that reported for several mammalian species (Szachman *et al.*, 1974; Agmo, 1976; Kamel and Frankel, 1978; Bronson and Desjardins, 1982; Rabb *et al.*, 1989; Borg *et al.*, 1991; Retana-Márquez *et al.*,

1998). However, the physiological significance of these increases has not been elucidated. Testosterone levels increased similarly in both copulating and noncopulating CMI-treated males after exposure to females, which suggests that the HPG axis is not altered in males treated neonatally with CMI. The discrepancy between the normal HPG response and the inhibition of sexual behavior is noteworthy.

It has been shown that the activation of the HPA axis by stress exerts an inhibitory effect on the HPG axis (Collu *et al.*, 1984; Calogero *et al.*, 1999). Our results show that exposure to a receptive female causes an increase in plasma corticosterone and testosterone, both in saline- and CMI-treated Ss. However, this increase in the levels of corticosterone is significantly lower in males treated neonatally with CMI, which indicates a low responsiveness of this axis. The notion that the increase of corticosterone inhibits the release of testosterone seems to be unsuitable for sexual behavior conditions, where both steroids increase at the same time. Some studies have suggested that the sudden release of corticosterone after a stressful situation could induce a rewarding effect in intact animals, mainly due to its interaction with dopaminergic neurons located in the rewarding system (Piazza *et al.*, 1991, 1993). Thus, it is conceivable that a depressed subject could have lost this rewarding mechanism because of a diminished secretion of corticosterone after exposure to a stressful situation.

Our results seem to be in accordance with previous studies showing that different neonatal manipulations induce a decrease in the response of the HPA axis during adulthood. Meaney *et al.* (1989) reported that neonatal handling of rats decreases their response to restraint stress during adulthood, suggesting that the negative feedback of corticosterone is enhanced due to an increase in glucocorticoid-receptor binding capacity. Neonatal treatment with dexamethasone results in the attenuation of ACTH and corticosterone elevation after restraint stress (Felszeghy *et al.*, 2000). The decrease of corticosterone levels after the presence of a receptive female, observed in the present study, is also similar to that reported by Ogawa *et al.* (1994) after immobilization stress for 2 hours in rats neonatally treated with clomipramine. Furthermore, REM sleep deprivation, which is a well-known stressor (Suchecki *et al.*, 1998; Hairston *et al.*, 2001) induces a paradoxical decrease of corticosterone in rats treated neonatally with clomipramine (Prabhila *et al.*, 1998). Thus, it seems that, regardless of the stressful condition, the response of the HPA axis is diminished in animals treated neonatally with clomipramine.

Despite this evidence, it could be possible that the observed effects were the manifestation of the disconti-

uation of the antidepressant treatment. However, recent reports on the effects of antidepressant discontinuation describe a syndrome clearly different from the classical picture of a depressive state (Zajack *et al.*, 1997; Black *et al.*, 2000; Tamam and Ozpoyraz, 2002). Thus, there are no available data to support the notion that the observed effects could be due to the discontinuation of the antidepressant treatment.

The data suggest that the reactivity of the HPG axis is not affected, while reactivity in the HPA axis seems to be altered. The large adrenal response, normally elicited by stressful situations, is significantly diminished in the case of animals treated neonatally with clomipramine. The results concerning the release of testosterone after sexual behavior show that there were no differences between clomipramine-treated animals and controls. Thus, the alterations of sexual behavior observed in this animal model of depression cannot be explained by low levels of testosterone due to an impairment in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

### Acknowledgement

The authors would like to express their gratitude to Edith Monroy for her advice on manuscript language.

### References

- Agmo A (1978). Serum luteinizing hormone and testosterone after sexual stimulation in male rabbits. *Acta Physiol Scand* 96:140-142.
- Black K, Shea C, Dursun S, Kutcher S (2000). Selective serotonin reuptake inhibitor discontinuation syndrome: proposed diagnostic criteria. *J Psychiat Neurosci* 25:265-281.
- Bonilla-Jaime H, Relana-Marquez S, Velázquez-Moctezuma J (1998). Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 60:39-45.
- Borg KE, Esbenshade KL, Johnson BH (1991). Cortisol, growth hormone and testosterone concentrations during mating behavior in bull and boar. *J Anim Sci* 69:3230-3240.
- Bronson FH, Desjardins C (1982). Endocrine responses to sexual arousal in male mice. *Endocrinology* 11:1288-1291.
- Calogero AE, Burrello N, Bosboom AM, Garofalo MR, Weber RF, D'Agata R (1999). Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level. *J Endocrinol Invest* 22:668-670.
- Checkley S (1996). The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull* 52:597-617.
- Coffu R, Gibb W, Ducharme GR (1984). Effects of stress on the gonadal function. *J Endocrinol Invest* 7:529-537.
- Djurić VJ, Dunn E, Overstreet DH, Dragomir A, Steiner M (1999). Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of Ffinders resistant and sensitive lines. *Physiol Behav* 67:533-537.
- Dwyer SM, Rosenwasser AA (1998). Neonatal clomipramine treatment, alcohol intake and circadian rhythms in rats. *Psychopharmacology* 138:176-183.
- Felzagy K, Bagdy G, Nyakas C (2000). Blunted pituitary-adrenocortical stress response in adult rats following neonatal dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol* 12:1014-1021.
- Frank MG, Heller HC (1997). Neonatal treatments with the serotonin uptake inhibitors clomipramine and zimeldine, but not the noradrenaline uptake inhibitor desipramine, disrupt sleep patterns in adult rats. *Brain Res* 768:287-293.
- Hairston IS, Ruby NF, Brooks S, Phyrn C, Denning DP, Heller HC, Sapolsky RM (2001). Sleep deprivation elevates plasma corticosterone levels in neonatal rats. *Neurosci Lett* 315:29-32.
- Hansen HH, Sanchez C, Meier E (1997). Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor LU 10-134-C increased forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression? *J Pharmacol Exp Ther* 283:1333-1341.
- Hartley P, Neill D, Hagler M, Kors D, Vogel G (1990). Procedure- and age-dependent hyperactivity in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 14:69-72.
- Hilakivi LA, Sinclair JD (1988). Effect of neonatal clomipramine treatment on adult alcohol drinking in the AA and ANA rat lines. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1451-1455.
- Hilakivi LA, Hilakivi (1987). Increased adult behavioral 'despair' in rats neonatally exposed to desipramine or zimeldine: an animal model of depression? *Pharmacol Biochem Behav* 28:387-389.
- Hilakivi LA, Stenberg D, Sinclair JD, Kitanmaa K (1987). Neonatal desipramine or zimeldine treatment causes long-lasting changes in brain monoaminergic systems and alcohol related behavior in rats. *Psychopharmacology* 91:403-409.
- Kamel F, Frankel AJ (1978). Hormone release during mating in the male rat: time course, relation to sex behavior, and interaction with handling procedures. *Endocrinology* 103:2172.
- Martinez-Gonzalez D, Prospero-Garcia O, Mihalescu S, Drucker-Colin R (2002). Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 72:355-364.
- Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarnieu A (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 50:597-604.
- Mirmiran M, Van de Poll NE, Corner MA, Van Oyen HG, Bour HL (1981). Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat. *Brain Res* 204:129-146.
- Neill D, Vogel GW, Hagler M, Kors D, Hennessey A (1990). Diminished sexual activity in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev* 14:73-76.
- Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KJ, Takahashi K (1994). Effect of the altered serotonergic signaling by neonatal treatment with 5,7-dihydroxytryptamine, ritanserin or clomipramine on the adrenocortical stress response and the glucocorticoid receptor binding in the hippocampus in adult rats. *J Neural Transm* 96:113-123.
- Piazza PV, Maccari S, Deminiere JM, LeMoal M, Mormade P, Simon H (1991). Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Neurobiology* 88:2088-2092.
- Piazza PV, Deroche V, Deminiere JM, Maccari S, LeMoal M, Simon H (1993). Corticosterone in the range of stress-induced levels possesses reinforcing properties: implications for sensation-seeking behaviors. *Neurobiology* 90:11738-11742.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jafre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Prathiba J, Kumar KB, Karanth KS (1998). Hyperactivity of hypothalamic pituitary axis in neonatal clomipramine model of depression. *J Neural Transm* 105:1335-1339.
- Rabb MH, Thompson DL Jr, Barry BE, Colborn DR, Garza F, Henke ?? (1989). Effects of sexual stimulation, with and without ejaculation, on serum concentrations of LH, FSH, testosterone, cortisol and prolactin in stallions. *J Anim Sci* 67:2724-2729.
- Relana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J (1998). Lack of effect of corticosterone administration on sexual behavior of rats. *Physiol Behav* 63:367-370.
- Sachar EJ, Hellman L, Roffwarg HP, Hnlpren FS, Fukushima DK, Gallagher TF (1973). Disrupted 24 hours cortisol secretion in psychotic depression. *Arch Gen Psychiat* 28:19-24.
- Sachs B, Mniel R (1988). The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neil J (editors): *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; pp. 1393-1482.
- Salin-Pascual R, Drucker-Colin R (1998). A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 9:67-80.
- Surhecki D, Lobo LL, Hipolide DC, Tuik S (1998). Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 7:278-281.
- Szechtman H, Lamhrou PJ, Caggula AR, Redgate ES (1974). Plasma corticosterone levels during sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 5:191-200.
- Tamam L, Ozpoyraz N (2002). Selective serotonin reuptake inhibitor discontinuation syndrome: a review. *Adv Ther* 19:17-28.
- Tazabi Y, Overstreet DH, Rezvani AH, Lnuis VA, Clark E, Janowsky DS, King MA (1999). Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology* 142:193-199.
- Velázquez-Moctezuma J, Díaz-Ruiz O (1992). Neonatal treatment with clomipramine increased immobility in forced swim test: An attribute of animal models of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 42:737-739.

Hehnke  
K. E.

- Velázquez-Moctezuma J, Aguilar-García A, Diaz-Ruiz O (1993). Behavioral effects of neonatal with clomipramine, scopolamine, and idazoxan in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46:215-217.
- Vogel GW, Vogel F (1982) A new animal model of human endogenous depression. *Sleep Res* 11:222a.
- Vogel GW, Hartley P, Neill D, Hagler M, Kots D (1990) A new animal model of endogenous depression: A summary of present findings. *Neurosci Biobehav Rev* 14:86-91.
- Vogel G, Hagler M, Hennessey A, Richard C (1998). Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clomipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 54:805-809.
- Woodward JH, Emery JW (1987). Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 419:280-284
- Zajacka J, Tracy KA, Mitchell S (1997). Discontinuation symptoms after treatment with serotonin reuptake inhibitors: a literature review. *J Clin Psychiat* 58:291-297