

proteínas fue medida de acuerdo con el método de Lowry y col. (1951) con el reactivo de Folin y albúmina bovina como estándar.

2.2.2.4. Fijación de [³H]Flunitrazepam ([³H]FNT).

2.2.2.4.1. Preparación de las membranas.

Se prepararon las membranas homogeneizando el tejido (hipocampo) con un Polytron PT 10 (colocado a velocidad 5, 20 segundos) en 10 volúmenes (1 gr/10 ml) de agua destilada fría, y centrifugándolo inmediatamente durante 10 minutos, a 48.000 x g y a 4 °C. El precipitado se lavó una vez mediante resuspensión y recentrifugación en igual volumen de tampón Tris-HCl (50 mM; pH 7.5), tras lo cual se congeló a -20 °C hasta el momento del ensayo un día después.

2.2.2.4.2. Ensayo de fijación de [³H]FNT.

Para el ensayo de fijación, realizado un día después, el tejido fue descongelado y centrifugado de nuevo (idénticos parámetros), y resuspendido en 80 volúmenes del mismo tampón. Se llevó a cabo la incubación en un volumen total de 500 µl, en presencia de concentraciones de 0.125-8 nM de [³H]FNT (actividad específica: 79.6 Ci/mmol; Amersham), obteniéndose una concentración final de 80-120 µgr de proteína por tubo. La fijación inespecífica fue determinada en presencia de Diazepam (5 x 10⁻⁶ M) además del radioligando. La fijación total y la inespecífica

se determinaban por duplicado para cada concentración de [3 H]FNT. Tras 60 minutos de incubación a 4 °C, las muestras fueron filtradas a través de filtros Whatman GF/B con bomba de vacío y usando una máquina de filtración para 24 tubos simultáneos (M-24 Cell Harvester; Brandel Instruments, Gaithersburg, MD, USA). Los filtros fueron lavados tres veces con 4 ml de tampón Tris-HCl frío, transferidos a viales de plástico conteniendo 3 ml de líquido de centelleo (Atomlight, New England Nuclear), donde se dejaron reposar durante 24 horas antes de colocarlos en el contador de centelleo para el recuento de la radioactividad. La resta de los valores correspondientes a la fijación total menos los de la fijación inespecífica (determinada en presencia de Diazepam 5×10^{-6} M) nos da la fijación específica de [3 H]FNT en función de la concentración que se ha incubado de este ligando.

La concentración de proteínas se determinó siguiendo el método de Lowry y col. (1951) con el reactivo de Folin y albúmina bovina sérica como estándar.

2.2.2.4.3. Análisis y representación de Scatchard.

La representación gráfica de los datos de los ensayos de fijación, cuando se utilizan varias concentraciones de ligando marcado (como en el caso del ensayo de fijación de [3 H]FNT), se realiza mediante la recta de Scatchard. La ecuación de la recta de Scatchard es

$$B/F = B_{\max} - B/K_d$$

donde **B** (del inglés "bound", fijado o ligado) es la cantidad de [³H]FNT (o radioligando en general) que ha quedado fijada específicamente al tejido, expresada en pmol [³H]FNT/mg de proteína; **F** (del inglés "free", libre) es la concentración total de ligando radioactivo incubada, expresada en nanomolar (nM); **B_{max}** es el número total o densidad máxima de lugares de fijación de [³H]FNT en la cantidad de tejido (proteínas) incubada expresada en las mismas unidades (pmol [³H]FNT/mg de proteína), y la **K_d** es la concentración de [³H]FNT que ocupa la mitad de los lugares de fijación de una determinada cantidad de tejido, expresada en nanomolar (nM). A partir de la recta de Scatchard se puede, por tanto, calcular la densidad de lugares de fijación (**B_{max}**) y la afinidad (**K_d**) del radioligando por los mismos. La **K_d** es el valor inverso de la tangente de la recta cambiado de signo, y la **B_{max}** es el valor del punto de intersección entre la recta de Scatchard y el eje de las abcisas.

2.2.3. Análisis estadístico de datos.

La densidad de receptores (**B_{max}**) y la afinidad (**K_d**), en el ensayo de fijación de [³H]FNT, fueron determinadas mediante el análisis de Scatchard a partir de las curvas de saturación, presentándose los resultados como la media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas

de los datos de estos ensayos se llevaron a cabo mediante la "prueba de aleatoriedad para pares igualados" (Siegel, 1972).

Los datos de los ensayos de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ se hallan expresados en forma de "nmoles de $^{36}\text{Cl}^-$ captado/mg de proteína" (valores basales; media \pm error estándar), o bien en forma de "incremento neto", medida que se obtiene al sustraer los valores basales (en ausencia de GABA exógeno en el medio de incubación) de $^{36}\text{Cl}^-$ captado de aquéllos obtenidos en presencia de las distintas concentraciones de GABA añadido (5 y 10 μM). Se han comparado estadísticamente los resultados del "incremento neto" utilizando la prueba no paramétrica de "Kruskal Wallis" seguida de comparaciones entre pares de grupos con la "U de Mann Whitney". Asimismo, se realizó un análisis adicional de todos los resultados de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ (incremento neto) aplicando al diseño global un análisis de la varianza de dos factores siendo uno de ellos de medidas repetidas [MANOVA, paquete SPSS-X. Factores: FARMACO, con tres niveles o tratamientos distintos (Control, Imipramina y desipramina); y, CONCENTRACION, factor con medidas repetidas y tres niveles (Ausencia de GABA, concentración 5 μM de GABA y concentración 10 μM de GABA)].

Los resultados de los experimentos de fijación de [^3H]GABA se expresan también como medias \pm error estándar, que se han comparado mediante la prueba t de Student para datos apareados

(para justificación del uso de esta prueba en este tipo de experimentos ver Siegel, 1972; y, Standford y col., 1986).

2.3. Resultados.

El resultado más destacable de esta serie experimental es, posiblemente, la disminución significativa de la captación de cloro en los sinaptoneurosomas de ratas tratadas crónicamente con imipramina o desipramina. Así lo pone de manifiesto el MANOVA aplicado al diseño global (Factor FARMACO: $F_{(2,11)} = 7.11$, $P=0.01$. Interacción FARMACO-CONCENTRACION: $F_{(2,11)} = 4.15$, $P= 0.045$). La prueba de Kruskal Wallis aplicada al incremento neto en presencia de GABA $5 \mu\text{M}$ ofreció un resultado al borde de la significación estadística ($X^2 = 5.68$, $P=0.058$). La captación de $^{36}\text{Cl}^-$, o incremento neto, inducida por una concentración $5 \mu\text{M}$ de GABA resultó disminuida al 66% del valor del control tras 18 inyecciones (una diaria) de 20 mg/kg de imipramina ($P=0.019$, U de Mann Whitney). La desipramina (18 inyecciones, 15 mg/kg) mostró una tendencia similar (72% del control) pero no significativa. Cuando la captación de $^{36}\text{Cl}^-$ fue estimulada por una concentración $10 \mu\text{M}$ de GABA, la disminución encontrada después del tratamiento con los tricíclicos fue significativa tanto en el caso de la imipramina como de la desipramina (77% y 84% del control respectivamente; $X^2 = 7.18$, $P= 0.0276$. Ver Figura 2.2.). Es interesante notar que tales efectos ocurrieron sin que se modificasen en ningún caso

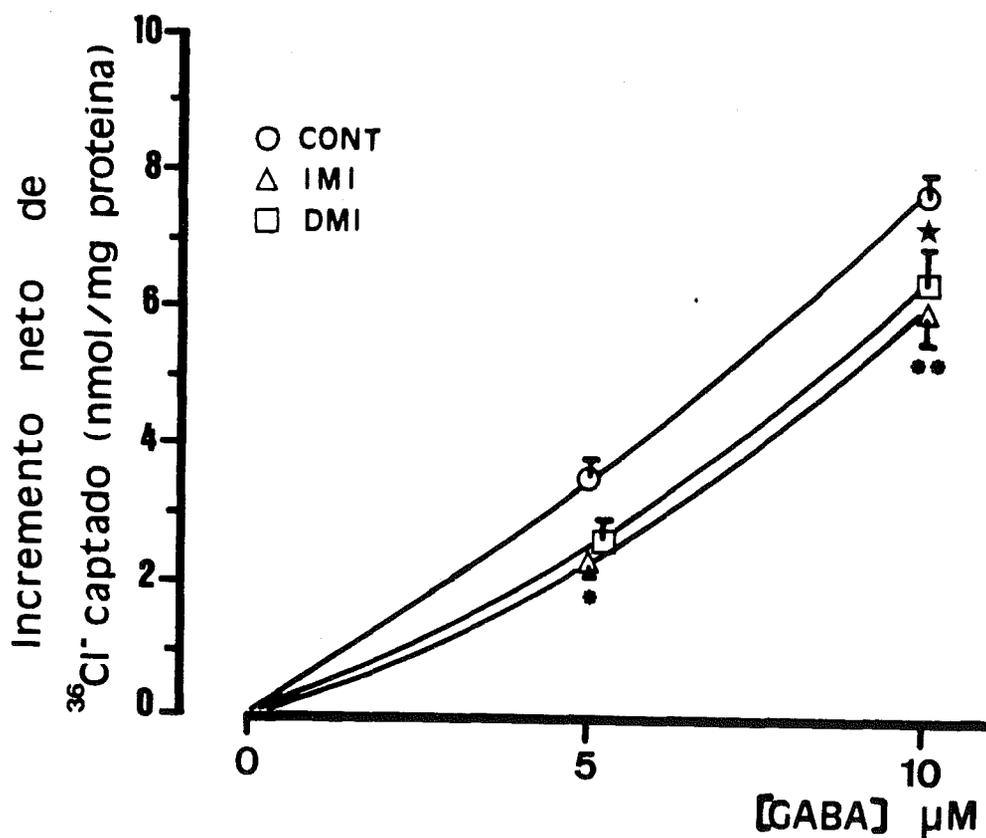


Figura 2.2.- Efecto del tratamiento prolongado con imipramina (IMI; 20 mg/kg/día), desipramina (DMI; 15 mg/kg/día) o vehículo (CONT; 2 ml/kg/día) sobre el 'incremento neto' de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ inducido por la presencia de GABA exógeno (5 ó 10 μM ; añadido al medio de incubación) en sinaptoneurosomas de corteza cerebral de rata. Para cada experimento se utilizaron las cortezas cerebrales de dos ratas de cada grupo. Los puntos representan la media \pm error estándar de 4-8 experimentos independientes.
 * $P < 0.02$; ** $P < 0.015$; + $P < 0.03$ (unilateral). Comparaciones realizadas con la prueba U de Mann Witney.

los valores basales (aquéllos obtenidos en ausencia de GABA exógeno) de captación de cloro (Grupo Control: 9.5 ± 0.8 ; Imipramina: 10.2 ± 1 ; Desipramina: 10.0 ± 0.9 nmoles de $^{36}\text{Cl}^-$ /mg de proteína. Ver Figura 2.3.).

La reducción obtenida en la fijación de [^3H]GABA en hipocampo de ratas tratadas crónicamente con los tricíclicos (Tabla 2.1.), aunque sólo significativa si se aplica la prueba "t" para datos apareados ($P < 0.05$, entre ambos grupos tratados respecto al control), son en principio consistentes con los datos de los ensayos de flujo de cloro.

Por lo que se refiere al efecto del tratamiento crónico con valproato sobre la captación de cloro, no se observaron diferencias en cuanto a los valores de "incremento neto" inducido por las dos concentraciones de GABA (Figura 2.4.), mientras que en los "valores brutos" se obtuvo una diferencia relativamente cercana a la significación en presencia de GABA $10 \mu\text{M}$ (Figura 2.5.; $P = 0.057$, U de Mann Whitney, unilateral). Tendencia similar, no significativa, se obtuvo en la fijación de [^3H]Flunitrazepam en hipocampo de los animales tratados con valproato sódico (Figura 2.6. y Tabla 2.2.).

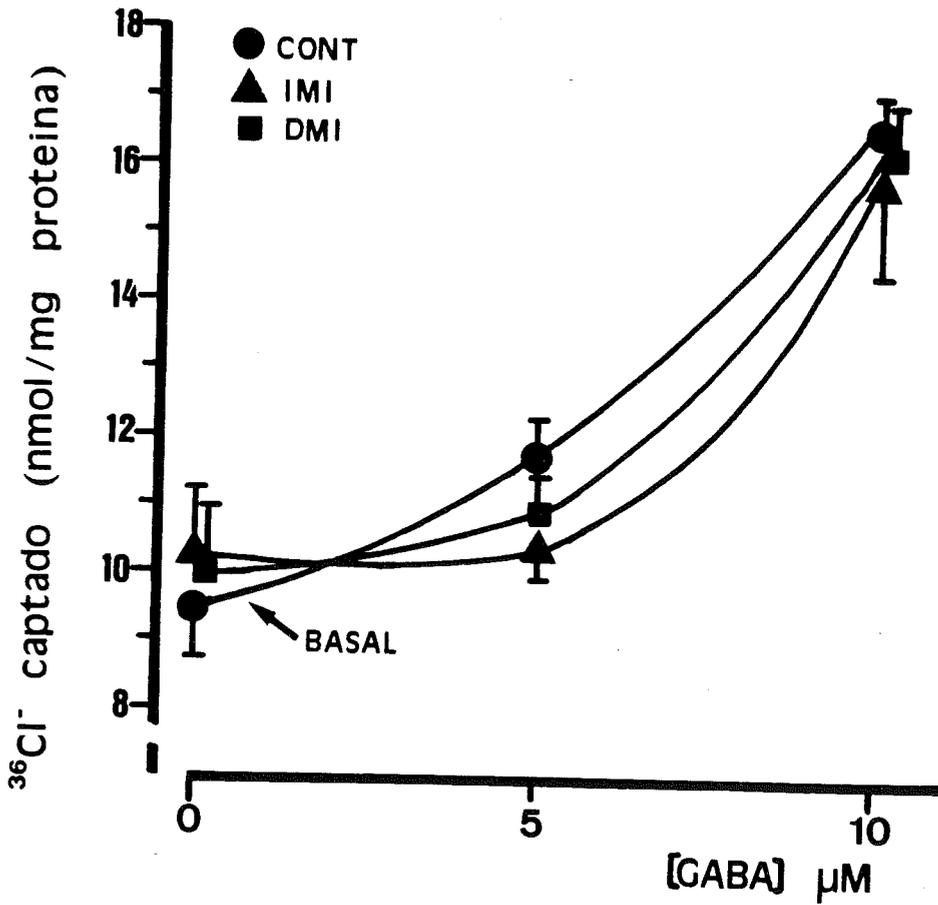


Figura 2.3.- Efecto del tratamiento crónico con imipramina (IMI; 20 mg/kg/día), desipramina (DMI; 15 mg/kg/día) o vehículo (CONT; 2 ml/kg/día) sobre los valores absolutos de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ en sinaptoneurosomas cerebrales de rata, en ausencia (0 μM) o presencia de GABA (5 ó 10 μM) exógeno en el medio de incubación. El resto de características se corresponde con las descritas en la Figura 2.2.

| Tratamiento | [³ H]GABA específicamente ligado | |
|-------------|--|---------------|
| | pmoles/mg proteína | % del control |
| CONT (n=4) | 0.714 ± 0.13 | 100 |
| IMI (n=4) | 0.575 ± 0.09 | 80.3 |
| DMI (n=4) | 0.513 ± 0.06 | 71.8 |

Tabla 2.1.- Fijación específica de [³H]GABA en hipocampo de ratas crónicamente tratadas con IMI, DMI o vehículo (CONT; ver Figuras 2.2 y 2.3.). Se incubó el tejido de dos animales de cada grupo en presencia de una única concentración de 40 nM de [³H]GABA, presentándose la media ± error estándar de 4 experimentos independientes (n=4) para cada tratamiento.

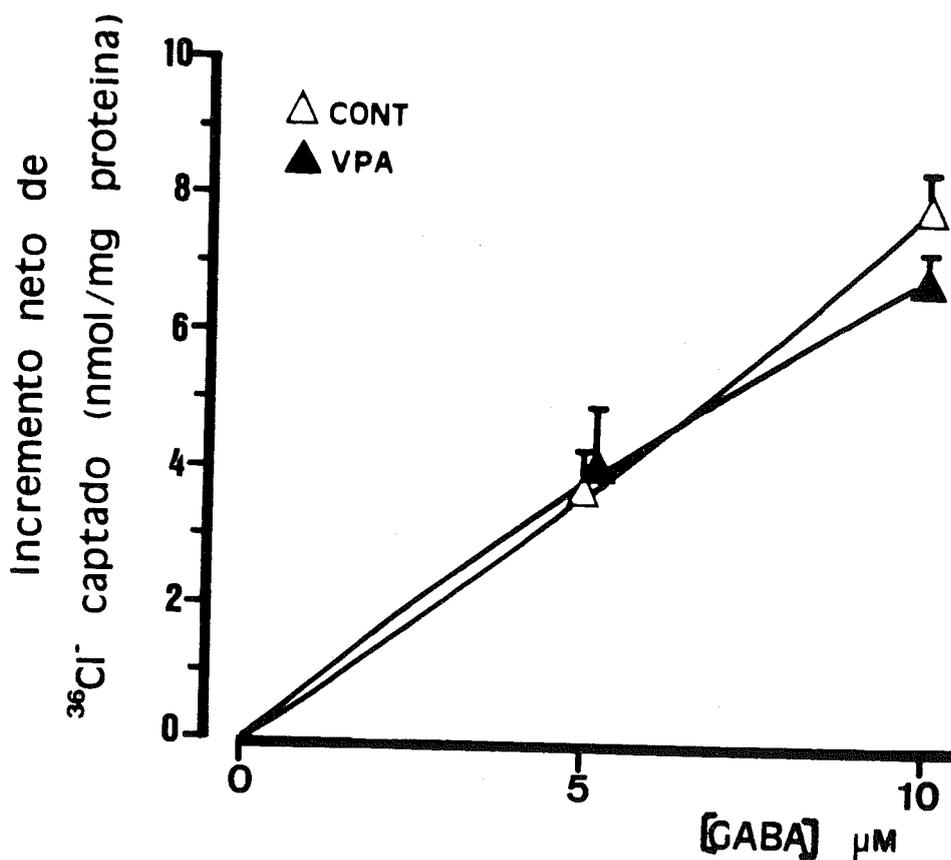


Figura 2.4.- Efecto del tratamiento crónico con valproato sódico (VPA; 200 mg/kg/día) o vehículo (CONT; 2 ml/kg/día) sobre el 'incremento neto' de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ inducido por la presencia de GABA exógeno (5 ó 10 μM ; añadido al medio de incubación) en sinaptoneurosomas de corteza cerebral de rata. Para cada experimento se utilizaron las cortezas cerebrales de dos ratas CONT y dos VPA. Se representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes ($n=3$).

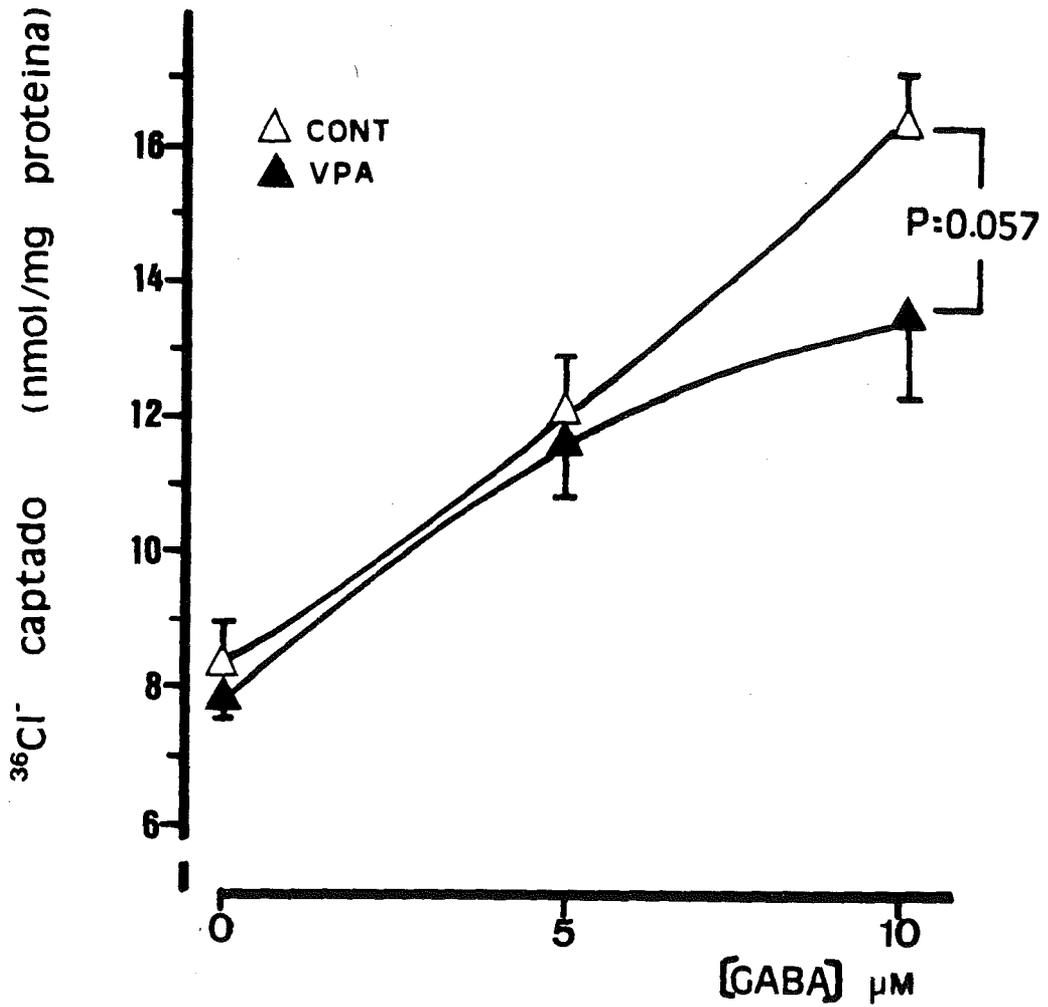


Figura 2.5.- Efecto del tratamiento crónico con valproato sódico (VPA; 200 mg/kg/día) o vehículo (CONT; 2 ml/kg/día) sobre la captación $^{36}\text{Cl}^-$ (en valores absolutos) en sinaptoneurosomas cerebrales de rata, en ausencia (0 μM) o presencia de GABA exógeno (5 ó 10 μM) en el medio de incubación. El resto de características se corresponde con lo descrito en la Figura 2.4. Comparación estadística con la prueba U de Mann Witney (unilateral).

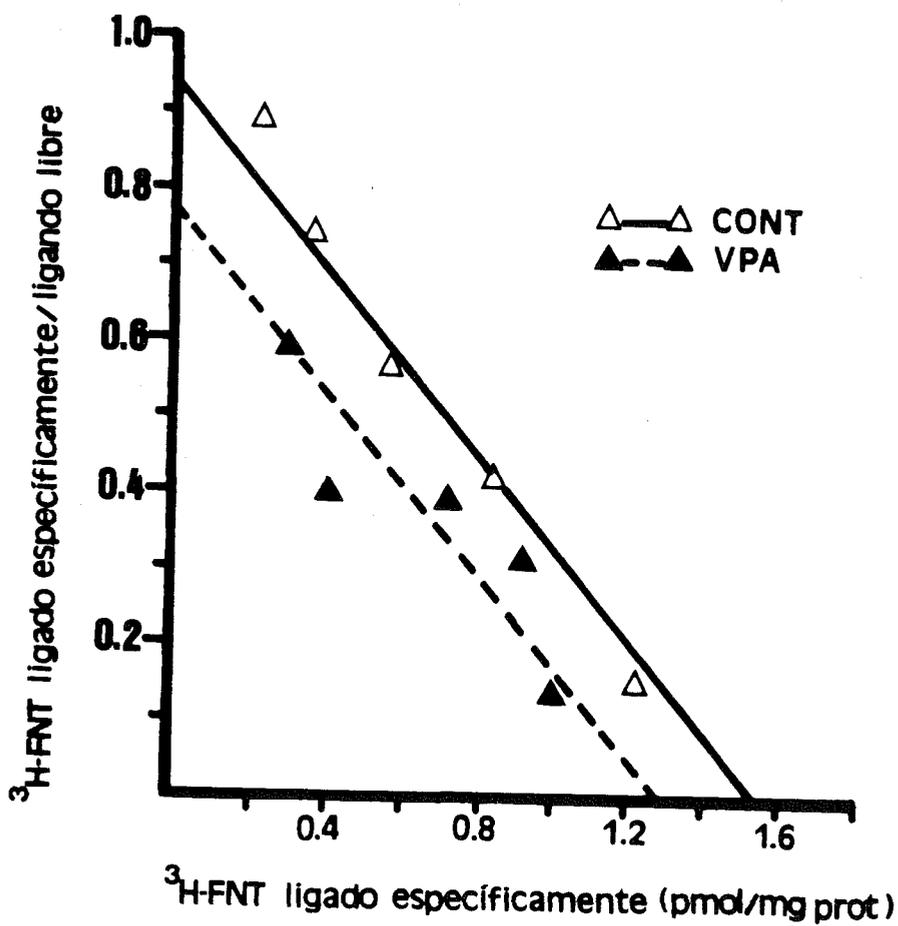


Figura 2.6.- Representación de Scatchard del enlace específico de [^3H]Flunitrazepam ([^3H]-FNT) en hipocampo de ratas tratadas crónicamente con VPA o vehículo (ver Figuras 2.4 y 2.5.). El tejido de dos ratas CONT y de dos ratas VPA se incubó en concentraciones de 0.125-8 nM de [^3H]-FNT, y el enlace específico se definió por la presencia de una concentración de 5×10^{-6} M de diazepam en el medio de incubación.

| | FIJACION DE ³ H-FNT | | P |
|-------------------------|--------------------------------|-------------|-------|
| | CONT (n=4) | VPA (n=4) | |
| Bmax (pmol/mg prot.) | 1.54 ± 0.15 | 1.29 ± 0.21 | 0.062 |
| Kd (nM) | 1.69 ± 0.24 | 1.74 ± 0.18 | N.S. |

Tabla 2.2.- Valores de Bmax (densidad de receptores) y Kd (afinidad), calculados a partir del análisis de Scatchard (ver Figura 2.6), en hipocampos de ratas tratadas crónicamente con valproato (VPA) o con vehículo (CONT). Los valores se expresan en media ± error estándar de cuatro experimentos independientes, en cada uno de los cuáles se utilizó el tejido de dos animales por grupo experimental.

2.4. Discusión.

Los resultados obtenidos en esta serie experimental indican que la función del complejo macromolecular $GABA_A/Bz/Cl^-$ se halla disminuida en los animales que han sido crónicamente tratados con imipramina o desipramina. Específicamente, hemos observado una clara disminución de la captación de $^{36}Cl^-$ estimulada por la adición de GABA ("incremento neto") en sinaptoneurosomas corticales de las ratas tratadas con dichos fármacos, mientras que se encuentra inalterado el flujo basal de $^{36}Cl^-$. Aunque con menor claridad, también se constata un decremento aparente en la fijación de $[^3H]GABA$ en el hipocampo de los mismos animales, que probablemente no alcanza niveles de significación importantes debido al reducido tamaño de muestra. En lo que respecta al efecto de la administración crónica de valproato sódico sobre el flujo de $^{36}Cl^-$ y sobre la densidad de receptores para el $[^3H]FNT$, es posible que por este mismo problema no ofrezca resultados más concluyentes, si bien son bastante indicativos, en nuestra opinión, de un decremento en ambos parámetros.

Según la información de que disponemos, es la primera vez que se evalúa la influencia del tratamiento con imipramina, desipramina y valproato sobre la función del canal del cloro (asociado al complejo $GABA_A$). No obstante, los resultados de los dos tricíclicos sobre la captación de cloro son perfectamente conciliables con aquéllos que describían reducciones en la densidad

de receptores Bz y GABA tras administrar antidepresivos crónicamente (Suzdak y Gianutsos, 1985b; Suranyi-Cadotte y col., 1985; Barbaccia y col., 1986). Asimismo, no creemos que sea desdeñable (aún a pesar de que estadísticamente lo sea) la reducción obtenida en la fijación de [³H]GABA después del tratamiento prolongado con desipramina o imipramina, que de hecho coincide con los trabajos antes citados. La aparente reducción en la funcionalidad del complejo GABA_A es consistente también con trabajos recientes, realizados por Borsini y col. (1986b; 1988), que muestran una disminución de las respuestas funcionales inducidas por THIP (agonista GABA_A con efectos hipotérmicos) en la rata cuando previamente se ha sometido al animal a la administración prolongada de desipramina. Por otra parte, estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio (Escorihuela y col., 1988) indican que los ratones que han recibido inyecciones repetidas de imipramina o desipramina son más sensibles a las convulsiones inducidas por pentetrazol, una sustancia que reduce específicamente la transmisión GABAérgica por un antagonismo directo en el canal del cloro, en el mismo receptor (receptor picrotoxínico) al que se ligan otros convulsivantes como la picrotoxina y el t-butilbiciclofosforotionato (TBPT; Ticku y Ramanjaneyulu, 1984). Estos resultados corroboran y coinciden asimismo con el incremento de las convulsiones inducidas por picrotoxina obtenido por Pilc y Lloyd (1986) tras administrar crónicamente en ratas diversos antidepresivos o electrochoque.

Retomando los resultados obtenidos con la administración crónica de valproato sódico, cabe destacar el carácter preliminar del estudio, dado el reducido número de sujetos con que se realizó. Por otra parte, no existen, que sepamos, otros trabajos que valoren la influencia de este fármaco sobre la función del canal del cloro. En principio, nuestros datos son coherentes con la hipótesis, avalada por un cierto número de experimentos comportamentales (Rasmussen y col., 1981; Vellucci y Webster, 1984; Myslobdosky y col., 1983; Gent y col., 1986) y electrofisiológicos (McDonald y Bergey, 1979; Baldino y Geller, 1981; Gent y Phillips, 1980; Morag y Myslobdosky, 1982;), de que el valproato actuaría a través del complejo $GABA_A/Bz/Cl^-$ (Ticku y Davis, 1981), puesto que una disminución en la funcionalidad de dicho complejo es lo esperable tras administrar repetidamente un fármaco con actividad agonista sobre el mismo. No obstante, tal hipótesis contrasta con la mayoría de los datos bioquímicos existentes. Tanto es así que, exceptuando el trabajo de Ticku y Davis (1981; demostraban una interacción del valproato con el receptor picrotoxínico *in vitro*), una amplia serie de estudios, tanto *in vitro* como tras administración crónica, no han conseguido poner de relieve interacción significativa alguna del valproato con el complejo $GABA_A$ (Loscher, 1979; Squires y col., 1983; para revisión ver Cutler y Horton, 1988). De modo similar, en experimentos no publicados que aún se hallan en curso (Fernández Teruel, Longoni y Corda, en preparación), no hemos podido comprobar que el valproato sódico modifique la función del complejo $GABA_A$ /canal

Cl^- cuando es añadido *in vitro* en los ensayos de captación de $^{36}\text{Cl}^-$ o en ensayos de fijación de [^3H]muscimol. Por otra parte, la hipótesis más tradicional, a saber, que el mecanismo responsable de la acción del valproato sería una elevación en la concentración cerebral de neurotransmisor GABA no se ha visto sustentada por la experimentación, puesto que si bien tal elevación en los niveles de GABA se produce en ocasiones, no se ha podido relacionar con la actividad del fármaco (McDonald y Bergey, 1979; Rasmussen y col., 1981; Chapman y col., 1982). Recientemente se ha comprobado, por vez primera, un incremento de las convulsiones espontáneas del jerbil tras la administración continuada de 82-111 mg/kg/día de valproato durante un año a este animal (Cutler y Horton, 1988). No obstante, no es la primera vez que se observa un efecto de este tipo (posiblemente debido a tolerancia) con esta sustancia, puesto que anteriormente se constató una disminución de su poder anticonvulsivante en animales después de ser administrada crónicamente (ver Cutler y Horton, 1988, para revisión). Estos resultados podrían conciliarse con los obtenidos en el presente trabajo, pero, dadas las grandes diferencias metodológicas (fundamentalmente en el programa de administración del fármaco) y el carácter preliminar de nuestros datos, es quizá más prudente no establecer analogías ni conclusiones prematuras, y esperar nuevas replicaciones, tanto de los estudios sobre convulsiones como de los bioquímicos (función del complejo GABA_A/Bz -ionóforo cloro).

2.5. Conclusiones.

1. Los antidepresivos tricíclicos desipramina (15 mg/kg/día) e imipramina (20 mg/kg/día) inducen, tras ser administrados crónicamente, un decremento en la función del complejo $GABA_A/Bz/Cl^-$ que se refleja en un menor incremento neto de la captación de $^{36}Cl^-$ estimulada por GABA (5 y 10 μM) en sinaptoneurosomas cerebrales de rata y en la disminución aparente de la fijación de [3H]GABA en el hipocampo de los animales a los que se trató con tales fármacos.
2. El tratamiento crónico con el anticonvulsivante valproato sódico (200 mg/kg/día) tiende asimismo a disminuir la captación de $^{36}Cl^-$ (valores brutos, pero no en el incremento neto) en sinaptoneurosomas cerebrales de rata, y muestra una tendencia a reducir la densidad (B_{max}) de receptores para el [3H]flunitrazepam en el hipocampo de los animales tratados. El resultado, ciertamente preliminar, si más no sugiere el interés de ser replicado dada su posible trascendencia para la explicación de la pérdida de potencia anticonvulsivante observada cuando el valproato es administrado crónicamente en animales.
3. Los resultados, particularmente con los dos antidepresivos, dan soporte a la hipótesis de la existencia de una interacción de los mismos con el complejo $GABA_A/Bz/Cl^-$, aportando

la novedad específica de su efecto sobre la función del canal del cloro, si bien no aportan información respecto al determinismo de tal interacción sobre los efectos terapéuticos de los fármacos. En qué medida la relación apuntada es importante para que se manifieste la actividad antidepresiva y/o anticonvulsivante (respectivamente) de estas sustancias, o es simplemente un epifenómeno o consecuencia más o menos constante, es una cuestión cuya respuesta precisa de otros diseños experimentales.

3. SERIE EXPERIMENTAL III.

Influencia de un antagonista de la transmisión gabérgica sobre la actividad de la imipramina y la desipramina en el test de natación forzada.

3.1. Introducción.

Como hemos discutido ya en las dos series experimentales anteriores, y hecha la salvedad de la carencia de efectos de la progabida en el test de natación forzada, los resultados vistos hasta aquí no parecen discrepar de los hallados en la literatura, antes bien, aportan alguna información adicional conciliable con aquélla. Resta por dilucidar, no obstante, si la acción de sustancias gabérgicas en modelos animales de depresión o los efectos de los antidepresivos sobre la transmisión GABA significan realmente que este sistema neurotransmisor se halle involucrado en los trastornos depresivos o en su tratamiento. Una estrategia habitualmente vinculada a este tipo de objetivos es la de comprobar las interacciones que se establecen entre sustancias activas en un determinado test (p. ej. un modelo de depresión) y otras que afectan al sistema neuroquímico (en nuestro caso el GABA) del que se desea probar su intervención en el proceso que presumiblemente modela dicho test. Se ha establecido, desde esta óptica, que la administración combinada de imipramina y baclofén induce una reducción de la densidad de receptores β -adrenérgicos (en corteza cerebral de rata) y del funcionamiento del sistema de segundo mensajero (AMPC), aún cuando ninguno de los dos fármacos fuera efectivo por sí sólo por haberse utilizado dosis muy bajas de ambos (Enna y col., 1986). Esto, unido al descubrimiento previo de que los agonistas de los receptores GABA_B facilitaban la respuesta del sistema de AMPC a la noradrenalina (Karbon y col.,

1984; Karbon y Enna, 1985), indujo a estos autores a hipotetizar que el GABA a través de su acción sobre los receptores GABA_B podía ser importante en la génesis y tratamiento de la depresión. Asimismo, la progabida (agonista mixto GABA_A/GABA_B) en dosis inactivas per se y administrada conjuntamente con desipramina (también a dosis subefectivas) produce la citada desensibilización del sistema receptor β -adrenérgico/adenilciclasa (ver Scatton y col., 1986, y, Bartholini y col., 1986). Por otra parte, como soporte parcial a una posible mediación del receptor GABA_A en la acción de los antidepresivos, Bartholini y col. (1986) han observado que la bicuculina (antagonista del receptor GABA_A) puede revertir el efecto de la imipramina en el modelo de indefensión aprendida en ratas, mientras que este antagonista gabérgico no modificó la acción de la fluoxetina en el mismo test (Zivkovic y col., 1986). En congruencia con este último resultado, Poncelet y col. (1987) no hallaron efecto alguno de la picrotoxina (antagonista del complejo GABA_A a nivel del canal del cloro) sobre las consecuencias de administrar imipramina, desipramina o clorimipramina a animales sometidos al test de natación forzada (modificado a una única sesión natatoria; ver Poncelet y col., 1987) o al modelo de "learned helplessness", a pesar de que otros autores han descrito un antagonismo del efecto de algunos antidepresivos en el test natatorio tras el tratamiento con una inyección de picrotoxina (Borsini y col., 1986d; ver Borsini y col., 1988).

La impresión es que, al menos a nivel de estudios comportamentales, el panorama es aún poco homogéneo como para extraer conclusiones. Con los experimentos que a continuación expondremos nos propusimos abordar de nuevo este problema, pero desde un planteamiento teórico ligeramente distinto. Algunos de los trabajos comentados utilizan sólo una inyección del antagonista gabérgico de que se trate (bicuculina o picrotoxina) para intentar antagonizar la acción de los antidepresivos. No obstante parece lógico pensar que, si estos fármacos producen algún efecto en la transmisión gabérgica posiblemente todas y cada una de las administraciones tendrán su importancia en la aparición del cambio que se registra al final del tratamiento. Siguiendo con este razonamiento, si tales cambios en la transmisión GABA son relevantes para la aparición de los efectos comportamentales del tratamiento antidepresivo, también parece más razonable plantearse la búsqueda de interacciones farmacológicas en cada una de las administraciones y no únicamente al final del tratamiento (en este caso, tratamiento antidepresivo). Consecuentemente formulamos la siguiente hipótesis:

"Si la reducción de la funcionalidad del canal del cloro (asociado al receptor GABA_A) es un fenómeno importante para que se produzca el efecto antidepresivo, entonces, la administración simultánea de una sustancia antidepresiva y de picrotoxina (que disminuye la función del canal del cloro) a

dosis bajas podría esperarse que facilitase la aparición de dicho efecto en el test de natación forzada".

3.2. Material y método.

3.2.1. Animales y estabulación.

El tipo de animales y las condiciones de estabulación fueron idénticos a los especificados para la SERIE EXPERIMENTAL I (ver apartado 1.2.1).

3.2.2. Procedimiento.

3.2.2.1. Test de natación forzada.

El procedimiento experimental fue esencialmente idéntico al de la SERIE EXPERIMENTAL I, con la salvedad de que en los experimentos que expondremos las sesiones natatorias se realizaron invariablemente en 18 cm de agua. La segunda diferencia estribó en el programa de administración de los fármacos, como se especificará a continuación.

3.2.2.2. Tratamiento farmacológico y diferentes experimentos.

Experimentos 1A-B. Interacción entre imipramina y picrotoxina en el test de natación forzada.

Experimento 1A. Se llevó a cabo con 37 ratas macho de 374 ± 20 gr de peso (sobre las 10-11 semanas de edad). Fueron tratadas con clorhidrato de imipramina (IMI; 15 mg/kg), picrotoxina (PIC; 0.8-1.2 mg/kg), vehículo (NaCl 0.9%), o bien con combinaciones de estos tratamientos. La administración de los fármacos se realizó entre las dos sesiones natatorias (pretest y test), siempre por vía i.p. y a un volumen de 2 ml/kg. Los animales, compensados en función del peso, se distribuyeron en los siguientes 4 grupos experimentales: Imipramina+picrotoxina (IMI15+PIC1.2), cuyos animales fueron tratados con tres inyecciones de imipramina (15 mg/kg; 24, 5 y 1 hora antes del test) y tres de picrotoxina, ésta a dosis de 1.2 mg/kg en las dos primeras (24 y 5 horas antes del test) y 0.8 mg/kg en la tercera inyección (20 minutos antes del test). Imipramina (IMI15+PICO), con programa de administración de imipramina idéntico al grupo anterior, pero sustituyendo las tres inyecciones picrotoxina por tres de vehículo (24 horas, 5 horas y 20 minutos antes del test natatorio). Picrotoxina (IMI0+PIC1.2), tratado con picrotoxina 24 horas, 5 horas y 20 minutos antes del test (1.2, 1.2 y 0.8 mg/kg respectivamente); y sustituyendo la imipramina por tres inyecciones del vehículo correspondiente (24, 5 y 1 hora antes del test). Control (IMI0+PICO), que recibió tres dobles administraciones de NaCl (0.9%); la primera, dos inyec-

ciones de NaCl, inmediatamente después del período de secado (24 horas antes del test); la segunda, de nuevo dos inyecciones de NaCl, 5 horas antes del test; y la tercera, una inyección de NaCl 1 hora antes de dicho test (correspondiente al vehículo de la IMI) y otra inyección 20 minutos antes del mismo (correspondiente al vehículo de la PIC). Se conformó así un diseño factorial 2×2 (factores: 'Imipramina', con 2 niveles; y 'picrotoxina', con 2 niveles).

Experimento 1B. En este caso se utilizaron 68 ratas macho de 408 ± 23 gr de peso (sobre unas 11.5-13 semanas de edad). El procedimiento experimental y de tratamientos farmacológicos fué idéntico al experimento anterior, salvo que aquí se administraron tres dosis de imipramina diferentes (10, 20 y 30 mg/kg) y dos tratamientos diferentes de picrotoxina (0.5 mg/kg x 3 inyecciones, o bien, 1.0 mg/kg x 2 inyecciones + una última inyección de 0.6 mg/kg). Se llevó a cabo pues un diseño factorial 4×3 (factores: 'Imipramina', con 4 niveles; y 'picrotoxina', con 3 niveles).

Experimentos 2A-B. Interacción de la desipramina y la picrotoxina en el test de natación forzada.

Experimento 2A. Realizado con 45 ratas macho de 375 ± 26 gr de peso (sobre 10.5-11.5 semanas de edad). Se usaron dos dosis de desipramina, 7.5 y 15 mg/kg, mientras que las de picrotoxina fueron las mismas que en el experimento anterior, así como el

resto del procedimiento. Se constituyó por tanto un diseño factorial 3 x 3 (factores: 'desipramina', con 3 niveles; y 'picrotoxina', con 3 niveles).

Experimento 2B. Se realizó con el objetivo de comprobar la reducción del tiempo de inmovilidad que sería esperable de utilizar dosis mayores de desipramina que las empleadas en el experimento anterior. Para ello usamos 15 ratas de 293 ± 19 gr de peso (sobre 8.5 semanas de edad), que realizaron el test de natación forzada según el procedimiento típico (ver Experimento 1 de la SERIE EXPERIMENTAL I; o Porsolt y col., 1978a) y administrándoseles sólo tres inyecciones de antidepresivo entre las dos sesiones natatorias (para las que se usaron 18 cm de agua en los cilindros).

3.2.3. Análisis estadístico de los datos.

Puesto que la aplicación de la prueba F de Snedecor indicó que en diversos casos las varianzas eran diferentes entre grupos experimentales, utilizamos la prueba de análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para un análisis global de los datos de cada experimento, seguida de comparaciones de pares de grupos realizadas con la prueba U de Mann-Whitney. No obstante, en algún experimento (caso del exp. 1A) se aplicó la prueba de análisis de varianza para planes factoriales (seguida de comparaciones con la t de Student) con objeto de estudiar las inter-