

perdurables en el paradigma de indefensión al desarrollo de ciertas respuestas motoras, como consecuencia de la exposición al choque incontrolable, que son incompatibles con el aprendizaje posterior de conductas de escapada en situaciones en que éstas son posibles.

Se hace difícil una exposición rápida y al mismo tiempo exhaustiva de las características de validez de este modelo animal, que con mayor o menor recencia han sido revisadas por diversos autores (Katz, 1981; Maier, 1984; Porsolt, 1984; Willner, 1984b; Jesberger y Richardson, 1985; Henn y McKinney, 1987). En general, diríamos que existe un cierto acuerdo respecto a que el modelo posee una cierta (o razonable) validez predictiva, habida cuenta de que responde al tratamiento con fármacos (y terapias no farmacológicas) antidepresivos (Willner, 1984b; Henn y McKinney, 1987), si bien se han sugerido problemas de especificidad en cuanto a la respuesta farmacológica (Jesberger y Richardson, 1985; ver p.ej. Drugan y col., 1984). Por otra parte, alguna validez aparente, referida a como el síndrome inducido en el análogo animal se asemeja a la condición humana que se modela, parece presentar este modelo. Se fundamenta en la similitud entre los déficits (motivacionales, cognitivos y comportamentales; ver párrafos anteriores) observables en los animales tratados con estrés incontrolable y aquéllos que caracterizan la depresión humana (Willner, 1984b; Henn y McKinney, 1987). No obstante, el modelo de "indefensión aprendida" se desarrolló esencialmente

desde una óptica teórica, y ha mostrado capacidad heurística suficiente para impulsar la formulación, y por tanto investigación, de hipótesis neurobiológicas y psicológicas sobre la etiología y correlatos de los fenómenos que en él se observan, así como sus relaciones con la depresión humana (ver Seligman y Weiss, 1980; Weiss y col., 1981; Petty, 1986; Henn y McKinney, 1987; Haracz y col., 1988). En definitiva, hablamos pues de la validez de constructo del modelo, que descansa y depende de asunciones básicas como: 1) Que la exposición de individuos humanos a eventos aversivos incontrolables inducirá "indefensión" como ocurre en animales. 2) Que la "indefensión" es un síntoma central en la depresión humana. Tales asunciones son objeto de intensa controversia e investigación en la actualidad; no obstante, datos de nuestro grupo (Muntaner y Fernández Teruel, en preparación) indican que la incontrolabilidad produce "indefensión" en humanos; y, si bien parece que la relación entre "indefensión" y depresión humana es ciertamente elusiva, resultados de Peri y col. (1987) tienden a indicar que existe. No obstante, los dos estudios mencionados ponen de relieve la importancia del control de otras variables intervinientes, como son el nivel de "susceptibilidad al castigo" o grado de ansiedad (Torrubia y Tobeña, 1984; véase Gray, 1982) y el sexo, para obtener resultados más clarificadores y, tal vez, más consistentes con la teoría de Abramson y col. (1978).

A modo de evaluación y de conclusión final sobre el modelo de "learned helplessness", es quizá más plausible la postura de Maier (1984), compartida por muchos otros científicos, en cuanto a que difícilmente este análogo es un modelo de la depresión humana y de la colección de síntomas que la caracterizan. Parecería más razonable ver la "indefensión aprendida" como un modelo de "estrés y 'coping'" (estrés y afrontamiento). Ursin y col. (1978), en su discusión sobre el concepto de estrés arguyen que éste no resulta de la mera exposición a la estimulación nociva, sino más bien es la consecuencia de la interacción entre tal evento y diversos factores psicológicos, entre los cuáles es muy relevante el 'coping'. Una forma de éste es el control conductual sobre el estímulo aversivo, y es por tanto la posibilidad o imposibilidad de 'coping' o control del mismo lo que repercutirá en la inducción de menores o mayores déficits (indefensión) en el organismo (ver Ursin y col., 1978). Observando el paradigma de "learned helplessness" bajo este prisma, la indefensión estaría involucrada en la depresión en la medida en que el estrés y el 'coping' lo estén. Por tanto, el modelo puede constituir un instrumento con el que se pueda estudiar esta vía en particular. Al mismo tiempo, ello sugiere que el "learned helplessness" puede no estar específica y únicamente relacionado con la depresión, sino que probablemente se relacione con otras condiciones en que estrés y afrontamiento sean importantes (ver Maier, 1984).

3.2.2. El "behavioral despair".

En este modelo, denominado indistintamente "forced swimming test" (test de 'natación forzada') o "behavioral despair test" (test de 'desesperanza conductual'), se utiliza una forma frecuente de inducción de estrés en animales, tal es el someterlos a una sesión de natación forzada en un recipiente del que no pueden escapar. Cuando ratas o ratones son expuestos a dicha situación, tras un período inicial de actividad vigorosa (aparentemente dirigida a escapar), adoptan una postura característica de inmovilidad en la que predominan los movimientos únicamente necesarios para mantener la cabeza fuera del agua (Porsolt y col., 1977; Porsolt y col., 1978a; Porsolt y col., 1978b). La conducta de inmovilidad fue inicialmente observada durante experimentos de aprendizaje en ratas, en los que se colocaba a los animales en el extremo de un laberinto acuático del que habían de encontrar la salida (en el otro extremo) en un período de 10 minutos (ver Porsolt, 1981). La mayoría de las ratas hallaban la salida con facilidad, pero otras nadaban durante algún tiempo sin encontrarla y en unos minutos cesaban de luchar adoptando una postura de flotación pasiva en el agua (inmovilidad). Según Porsolt (1984), daba la sensación intuitiva de que para estas ratas la situación era inescapable y por ello "desesperaban" y se tornaban inmóviles. Ello, siempre según Porsolt (1984), llevó a pensar en un símil de los déficits que se observaban en los animales sometidos al modelo de "learned helplessness" (ver apartado anterior) tras

administrarles choque eléctrico inescapable e incontrolable o imprevisible. Fue a partir de aquí que se desarrolló el actual procedimiento del modelo de "natación forzada" en ratón y en rata (ver Porsolt, 1984). El primero consta de una única sesión natatoria de 6 minutos en la que se mide el tiempo total que cada ratón permanece inmóvil durante los últimos 4 minutos de la prueba. Una inyección de antidepresivo 1 hora antes de la prueba disminuye significativamente el tiempo de inmovilidad mostrado por los animales (ver Porsolt y col., 1978b; y Porsolt, 1984). No obstante, este test parece ser más variable y menos selectivo para los tratamientos antidepresivos (menor validez predictiva) que el modelo de "natación forzada" en rata (ver Borsini y Meli, 1988). Por otra parte, nos referiremos esencialmente a este último por ser el que nos ha ocupado en la fase experimental del presente trabajo.

En la rata, el modelo (ver Porsolt y col., 1977) consiste en administrar dos sesiones natatorias, espaciadas 24 horas, cuya duración es de 15 (la 1ª, o 'pretest') y 5 minutos (la 2ª, o 'test'). Se realizan en cilindros transparentes de plexiglás (40 cm. de alto y 18 cm de diámetro) con 15 cm de agua a 25 °C (para ratas de aproximadamente 160-180 gr de peso). La primera sesión se considera como de "inducción" de estrés, y sólo durante los 5 minutos de la segunda se mide el tiempo total en que los animales permanecen inmóviles. El tiempo de inmovilidad es reducido por la mayoría de fármacos clínicamente antidepresivos, como tricíclic-

cos, IMAOs y diversos agentes atípicos como el bupropion, doxepina, iprindol, mianserina y viloxacina (Porsolt y col., 1978a; ver Porsolt, 1981, y Porsolt, 1984). Asimismo, tratamientos antidepresivos no farmacológicos reducen el tiempo de inmovilidad. Tal es el caso del electrochoque, la privación de sueño REM y la exposición a un ambiente enriquecido (Porsolt y col., 1978a). En el tratamiento farmacológico típico de este modelo, se administran 3 inyecciones de fármaco entre las dos sesiones nataatorias (24, 5 y 1 hora antes de la sesión de 5 minutos); pero se realizan asimismo tratamientos crónicos entre las dos pruebas (espaciándolas varios días), o bien administrándose antes de la sesión de 15 minutos (Platt y Stone, 1982; Borsini y col., 1985; Berrettera y col., 1986; Trzeciak y col., 1986; García Márquez y col., 1987; resultados de la presente Tesis). El modelo parece mejorar en su especificidad y discriminación farmacológica (validez predictiva) si se utilizan tratamientos crónicos (Kitada y col., 1981; ver Willner, 1984b; y Borsini y Meli, 1988), que permiten distinguir mejor entre agentes antidepresivos y otras sustancias que manifiestan efectos inespecíficos de reducción del tiempo de inmovilidad (falsos positivos), como es el caso de agentes estimulantes (cafeína y anfetamina) y anticolinérgicos (atropina y escopolamina). Entre los fármacos antidepresivos, se ha comprobado que, tras el tratamiento crónico, aumentan su efecto en este test la desipramina (Kitada y col., 1981; Borsini y col., 1984; Borsini y Meli, 1988), el iprindol y la mianserina (Berrettera y col., 1986; Borsini y col., 1985). Si estos resul-

tados se generalizasen a los demás antidepresivos (no es así en el caso de la imipramina, clorimipramina, amitriptilina, amineptina y nomifensina; ver Borsini y Meli, 1988), el test gozaría de cierta validez aparente adicional a la que se le otorga por la semejanza entre la conducta de inmovilidad y la pasividad observable en ciertas depresiones humanas (ver Willner, 1984b). El modelo, gana asimismo en especificidad y selectividad si se lleva a cabo paralelamente una prueba destinada controlar los efectos de los fármacos sobre la actividad motora (Porsolt y col., 1978a). Así, evaluando el comportamiento de los animales en un test de 'campo abierto' es posible determinar si un eventual efecto de reducción de la inmovilidad en la prueba de "natación forzada" se acompaña de un incremento inespecífico de la actividad motora, y este procedimiento permite la detección de posibles falsos positivos, como puede ser el caso de los mencionados anticolinérgicos y estimulantes, o de fármacos agonistas de la dopamina y algún agente noradrenérgico (Porsolt y col., 1979; Borsini y Meli, 1988). No obstante lo anterior, en este modelo existen falsos positivos y falsos negativos, a pesar de lo cual es generalmente considerado como de una validez predictiva razonable, dado que la mayor parte de antidepresivos son activos en él. Incluso se ha informado recientemente de que también algunas sustancias serotoninérgicas reducen el tiempo de inmovilidad (Sato y col., 1984; García Márquez y col., 1987), si bien no con la eficacia de los agentes noreadrenérgicos. Por otra parte, el

modelo discrimina bien entre antidepresivos, neurolepticos y ansiolíticos (ver Willner, 1984b; Borsini y Meli, 1988).

Duncan y col. (1985), han propuesto explicaciones al hecho de que 2 ó 3 inyecciones de antidepresivo sean ya efectivas en este modelo animal, basándose en la observación de que la primera sesión natatoria facilita la aparición de fenómenos de adaptación neural (p.ej. disminución del número de receptores β -adrenérgicos) cuando tras dicha sesión se administra el fármaco. En su procedimiento experimental, estos autores muestran que la acción sumada de 2 inyecciones de antidepresivo más el pretest induce un decremento de la densidad de β -adrenoceptores y del tiempo de inmovilidad, mientras que ninguno de los dos fenómenos se obtiene si se elimina alguna inyección y/o se prescinde del pretest de 15 minutos. Estos resultados se podrían considerar como positivos para la validez aparente y validez de constructo del modelo. La primera porque tales datos significan que aunque sólo se precisen 2-3 inyecciones de antidepresivo (a diferencia de los tratamientos crónicos necesarios en la depresión humana), parece posible que el pretest (esto es, 15 minutos de estrés inescapable) conlleve ciertos efectos que 'sumados' a los del fármaco dan lugar a los fenómenos de 'adaptación neural' (Duncan y col., 1985) que permiten (o correlacionan con) la aparición del efecto 'terapéutico'. La segunda porque, si esto es así, los datos de Duncan y colaboradores son conciliables con la hipótesis de la 'subsensibilidad de receptores β -adrenérgicos' en relación al mecanismo

de acción de los antidepresivos. El trabajo en cuestión puede ser, por tanto, una aportación a la validez de constructo del test de "desesperanza conductual", si bien aportación de valor relativo porque la misma hipótesis de la 'subsensibilidad β -adrenérgica' no se considera absolutamente corroborada y, como en secciones anteriores hemos visto, se han planteado otras alternativas. Entre ellas, se halla la hipótesis gabérgica de la depresión y del mecanismo de acción de los antidepresivos (ver Bartholini y col., 1985a). Nos parece indicado mencionarla de nuevo aquí, habida cuenta de que en el test de "natación forzada" en ratas (tanto en el procedimiento original como en modificaciones del mismo) se ha demostrado la capacidad de los agonistas gabérgicos (preferentemente del receptor GABA_A) para reducir el tiempo de inmovilidad (Borsini y col., 1986a; Borsini y col., 1986d; Evangelista y col., 1987; Poncelet y col., 1987; Plaznik y col., 1988; resultados de la presente Tesis). Más que simples falsos positivos, tales resultados son teóricamente coherentes con la hipótesis mencionada y con similares efectos obtenidos con muscimol, fengabina y progabida, en otros importantes análogos de depresión como el de la "rata bulbectomizada" o el "learned helplessness" (Lloyd y col., 1983; Sanger y col., 1986; Zivkovic y col., 1986; Poncelet y col., 1987).

Es interesante notar que, a pesar de que el test de "natación forzada" se creó y ha sido básicamente útil como prueba para evaluar sustancias potencialmente antidepresivas, también está

siendo objeto de estudio desde el punto de vista teórico, y del análisis de los mecanismos (neurobiológicos y psicológicos) que subyacen a su fenomenología. La mencionada investigación de Duncan y col. es un ejemplo de ello. En diferentes áreas cerebrales de la rata se ha observado además que, entre otros efectos neuroquímicos, la natación forzada durante 10-15 minutos incrementa (ver Borsini y Meli, 1988) o disminuye los niveles de NA (Sudo, 1983; estudio en que se utilizó el agua a 35 °C), aumenta también la concentración de 5-HIAA (ver Borsini y Meli, 1988), la fijación de [³H]Flunitrazepam y de [³⁵S]TBPS (Havoundjian y col., 1986; Trullás y col., 1987; Trullás y col., 1988), y reduce, en otros trabajos, la densidad de receptores benzodiazepínicos (Medina y col., 1983; Medina y col., 1987) y los niveles de GABA (Borsini y col., 1988). Por tanto, cuando se administran los fármacos tras la sesión natatoria 'pretest', conviene tener presente que el substrato nervioso sobre el que el fármaco debe actuar es posible que haya sufrido o esté sufriendo modificaciones, y, en consecuencia, la acción de la sustancia administrada puede ser diferente de como sería en ausencia del estrés natatorio (Duncan y col., 1985; ver Borsini y Meli, 1988). La idea esencial es, pues, que dicho estrés induce cambios neurales, y, si bien parece que los mismos no perduran a largo plazo (a diferencia de la perdurabilidad de algunos cambios neuroquímicos observados en el modelo de "helplessness"; ver Weiss y col., 1981), tampoco puede descartarse que las medidas bioquímicas en que los diferentes trabajos se han centrado hasta ahora no sean las más adecuadas o

relevantes, ni para este análogo animal ni para su hipotética relación -etiológica y/o de correlatos neurobiológicos- con el proceso humano que pretende modelar .

De la mano de Antelman y col. (1988) nos llega una demostración de que el simple y breve estrés de un pinchazo con una jeringa induce cambios bioquímicos y endocrinos detectables 28 días después de tal experiencia, traducidos en una disminución significativa de la respuesta al diazepam. No obstante, estos autores no utilizaron medidas bioquímicas de niveles o de receptores, sino que evaluaron el funcionalismo del complejo GABA/Bz/Cl⁻ administrando a cada rata diazepam y pentilinetetrazol (28 días después del estrés) y observando como variaba la interacción entre estos dos fármacos (medida por el cambio que inducían en los niveles de corticosterona plasmática) respecto a la obtenida en ausencia de la experiencia estresante. Este trabajo, invita a plantearse ciertas preguntas sobre las medidas - en particular bioquímicas - que tradicionalmente se utilizan en experimentos que involucran situaciones de estrés.

Teniendo en cuenta que la cuestión de la etiología y la bioquímica de la depresión son objeto de intensa investigación también en humanos, y que las hipótesis formuladas han sido hasta el momento bastante transitorias, la anterior discusión es esencialmente provisional, y tal vez sea más interesante para el propio

análogo animal que por la trascendencia que pueda tener en cuanto a los trastornos depresivos humanos.

La validez de constructo del test de "natación forzada" descansa fundamentalmente en su supuesta relación con el modelo de "indefensión aprendida", y consecuentemente, los problemas que mencionamos para el "learned helplessness" (ver apartado anterior) se aplican de igual modo al modelo natatorio. Porsolt (1981; 1984) señala que estos modelos, además del hecho de que ambos implican sendas situaciones de estrés inescapable, se asemejan en que los cambios conductuales son revertidos en ambos casos por tratamientos que potencian la transmisión catecolami-nérgica pero no (o no tan claramente) por aquéllos que estimulan la transmisión 5-HT. Contrariamente, los 'déficits' conductuales son potenciados por agentes que disminuyen los niveles de cateco-laminas pero no por sustancias que hacen lo propio con la 5-HT.

En general, existe bastante acuerdo en que el modelo de "natación forzada" no aparenta ofrecer posibilidades teóricas para la comprensión de los trastornos afectivos. Los mismos procesos emotivos, motivacionales o de aprendizaje, subyacentes a tal situación experimental son aún poco conocidos, dado que el modelo no ha sido sometido a investigación psicológica exhaustiva. No obstante, de los aspectos psicológicos de esta prueba nos ocuparemos en un apartado de la "Discusión General".

3.2.3. El modelo de "estrés crónico imprevisible".

Este modelo, desarrollado por Katz y col. (1981), es conceptualmente similar al "learned helplessness", diferenciándose de éste en que se administran a los animales diversos tipos de estímulos estresantes (choque eléctrico, baño en agua fría, privación de comida, inmovilización, aislamiento, presión en la cola, cambio de ciclo día-noche, etc.) y durante un período de 3 semanas. Además de la variedad de estimulación estresante, y a fin de maximizar el carácter imprevisible (y por tanto nocivo) del procedimiento, la aplicación de las diferentes situaciones se realiza según un programa temporal aleatorio y a lo largo de toda la fase de luz. Los animales expuestos a tal procedimiento muestran un decremento en la actividad basal en el test de campo abierto, así como en la respuesta de activación (en el mismo campo abierto) inducida por una situación de estrés agudo por "ruido". Este, induce paralelamente un incremento en la defecación, sugiriendo pues emotividad incrementada. Este tipo de estrés crónico resulta también en niveles basales de corticosterona elevados y en una mayor respuesta (en valor absoluto) de aquella hormona cuando el animal se enfrenta a situaciones de estrés agudo (Katz y col., 1981). Por otra parte, el procedimiento de Katz y colaboradores provoca un déficit hedónico en los animales, reflejado en una disminución del consumo de sacarina y sucrosa (Katz, 1982), que es consistente con ciertos déficits apetitivos de la depresión humana. Más recientemente, Armario y col. (1985)

han modificado el procedimiento anterior, eliminando las fases de privación de comida y de agua, de forma que al final del proceso las ratas presentan niveles basales de corticosterona normales, mientras que la respuesta de esta hormona a una nueva situación de estrés agudo es mayor en los animales que sufrieron el procedimiento de estrés crónico que en controles. No obstante, la respuesta del ACTH es igual entre ambos grupos de animales, lo que indica una disociación entre respuesta a la corticosterona y respuesta al ACTH, hecho que parece guardar cierta semejanza con lo que se describe en la depresión humana. Es este modelo, se demuestra también un déficit exploratorio en la "tabla de agujeros" ('hole board') y un aumento del tiempo de inmovilidad en el test de "natación forzada" administrado tras el procedimiento de estrés crónico imprevisible (García Márquez, 1987).

Se han descrito niveles reducidos de adrenalina y NA en cerebro de animales expuestos estrés crónico imprevisible (ver Porsolt, 1984). La inyección repetida de antidepresivos tricíclicos, IMAOs y algunos atípicos (bupropion, iprindol, mianserina), al igual que el CEC, restauran la actividad en el campo abierto y la respuesta normal ante un estrés agudo. Asimismo, se normalizan también los niveles de corticosterona y el consumo de sacarina (ver Porsolt, 1984; Willner, 1984b; Jesberger y Richardson, 1985; Henn y McKinney, 1987). En contraste, salvo efectos 'positivos' parciales del anticolinérgico escopolamina y del antihistaminérgico tripeleminamina, el tratamiento repetido con ansiolíticos,

neurolépticos o estimulantes es inefectivo. Ello apoya la validez predictiva del modelo. Como ya hemos referido, por la sintomatología que genera, se considera un análogo con buena validez aparente; mientras que se le otorga cierta validez de constructo, pero que, en todo caso, se halla condicionada a la relación, posible pero quizás no suficientemente demostrada, entre el estrés y la depresión en humanos (ver Anisman y Zacharko, 1982; Willner, 1984b; Porsolt, 1984; Jesberger y Richardson, 1985).

3.2.4. Modelos de separación.

Según diversos autores, las reacciones de "desesperanza" descritas en monos son quizá el modelo animal de depresión más convincente (ver Suomi y Harlow, 1977; Porsolt, 1984; Henn y McKinney, 1987). Los monos jóvenes responden a la separación materna con un estadio inicial de "protesta", con agitación, problemas de sueño y vocalizaciones, seguido en pocos días de una fase de "desesperanza", caracterizada por pérdida del apetito, disminución de conductas de juego, de actividad y de interacción social, así como la adopción de una postura encorvada (encogida) y expresión facial "triste". Fenómenos similares se observan cuando los animales son separados de los compañeros con los que han sido criados desde el nacimiento. En este caso, la sintomatología 'depresiva' perdura más tiempo. No obstante, el confinamiento de los monos en "cámaras verticales", donde práctica-

mente no les es posible realizar conducta alguna, parece ser el procedimiento que más dramáticos y duraderos síntomas induce (hasta de un año de duración; ver Suomi y Harlow, 1977).

Este síndrome es aliviado por la administración de imipramina, desipramina o iproniazida, pero no por la clorpromazina. Asimismo el electrochoque, la terapia de "rehabilitación social" (Suomi y Harlow, 1977) y bajas dosis de alcohol producen efectos positivos sobre el síndrome conductual que manifiestan los animales. Se ha informado de que la NA en LCR se comporta como un marcador de "rasgo" que predice mayor riesgo de mostrar síntomas 'depresivos' tras la separación social en los monos con niveles bajos de la amina (ver Porsolt, 1984; y Henn y McKinney, 1987). Contrariamente, parece que los niveles de ácido homovalínico (HVA, metabolito de la dopamina) y de 5-HIAA podrían ser marcadores o índices de estado (ver Henn y McKinney, 1987). La administración de α -metilparatirosina, que disminuye los niveles de NA y DA cerebrales, empeora drásticamente los efectos de la separación social; mientras que la paraclorofenilalanina, inhibidor de la síntesis de 5-HT, carece de efectos.

En síntesis, los modelos de separación presentan suficiente validez aparente, y su validez predictiva se halla limitada de momento por los relativamente escasos estudios farmacológicos, si bien los resultados disponibles - también los bioquímicos- se muestran consistentes con los obtenidos en otros modelos como el

"helplessness". Por otra parte, la rica, preponderante y cualitativamente exclusiva dimensión social de los modelos de separación los hace extremadamente interesantes para el estudio de factores de riesgo y de los orígenes sociales de la psicopatología.

Aunque la separación social en primates sea el más utilizado, y el que mejor satisface los criterios de validez, también se han propuesto otros posibles modelos de depresión basados en procedimientos de separación de pollos, gatos, perros, cobayos (ver Porsolt, 1984; Henn y McKinney, 1987) o hamsters (Crawley, 1983). Se han estudiado, particularmente, las fases de protesta a que siguen a tales procedimientos, caracterizadas por la presencia de vocalizaciones. El síndrome guarda semejanzas con la sintomatología de abstinencia de narcóticos, habiéndose comprobado que diversos tipos de opiáceos (p.ej. la morfina) antagonizan este fenómeno conductual, mientras que los antagonistas opiáceos lo agravan (ver Henn y McKinney, 1987).

3.2.5. Otros modelos.

Entre el resto de procedimientos experimentales utilizados como modelos animales de depresión merecen quizá especial mención el de la "rata bulbectomizada" (ver Cairncross y col., 1975; Garrigou y col., 1981; Jesberger y Richardson, 1985), el "tail

suspension test" ("test de suspensión por la cola"; véase Steru y col., 1987), y los basados en la conducta de "autoestimulación intracraneal" (ver Willner, 1984b). Es particularmente interesante el de la "rata bulbectomizada" (ratas a las que se extirpan totalmente los bulbos olfatorios) por haber sido considerado por algunos autores el mejor modelo animal de depresión endógena (Jesberger y Richardson, 1985). Tales autores razonan su valoración de este análogo en función de que los animales (ya bulbectomizados) presentan alteraciones bioquímicas y conductuales a largo plazo -en lugar de ser animales normales como los usados en el resto de modelos-, que son revertidas por la administración crónica de antidepresivos con razonable especificidad.

En lo que parecen converger todas las opiniones, no obstante, es en que el modelo de la bulbectomía no es un análogo del mismo trastorno del que lo son los modelos que hemos revisado más extensamente ("indefensión aprendida", "natación forzada", "estrés crónico imprevisible", "separación"), ya que éstos estarían posiblemente modelando un tipo de depresión relacionada con el estrés más que la depresión endógena (ver Weiss y col., 1981; Anisman y Zacharko, 1982; y, Tobeña y Trullás, 1985).

II. PARTE EXPERIMENTAL

0. PERSPECTIVA TEMPORAL DEL PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL: OBJETIVOS.

Como objetivo general del presente trabajo nos propusimos investigar la posible relación entre la neurotransmisión gabérgica y la conducta depresiva en un modelo animal de depresión, así como estudiar la implicación de dicho sistema neurotransmisor en el mecanismo de acción de los antidepresivos. Como ya hemos mencionado anteriormente, algunos autores han centrado su atención en la búsqueda de alternativas a los mecanismos de acción tradicionalmente hipotetizados en relación a los tratamientos antidepresivos (hipótesis aminérgicas principalmente). No obstante, y manteniéndonos fieles a la evolución temporal del trabajo de esta tesis (también del trabajo teórico), fué un único estudio el que sirviera de punto de partida para la elaboración de los objetivos e hipótesis generales que aquí intentábamos verificar. Nos referimos al trabajo de Petty y Sherman (1981), en el que los autores demostraban que la administración de bicuculina, un fármaco convulsivante y antagonista directo de los receptores GABA_A, provocaba conducta de indefensión en ratas sometidas al modelo de "indefensión aprendida" ("Learned Helplessness"). Asimismo, tras someter a los animales a la situación experimental de indefensión, se observaban ciertos cambios en los niveles de GABA cerebral que eran a su vez revertidos por la administración de imipramina (Petty y Sherman, 1981). Era pues la primera vez (según nuestra información) que se establecía una conexión ex-

perimental entre GABA, "indefensión" y acción de un antidepresivo.

Partiendo de estos antecedentes, pensamos que se podían elaborar algunas hipótesis generales respecto a la relación entre la transmisión gabérgica, la depresión y los mecanismos de acción de los antidepresivos.

0.1. Hipótesis generales.

A. Si la neurotransmisión gabérgica se halla implicada en el desarrollo y en la remisión de la depresión, entonces, la administración de fármacos que interactúen con dicho sistema neurotransmisor deberá modificar la conducta depresiva en un modelo animal de aquel trastorno.

B. Si la neurotransmisión gabérgica es relevante en el mecanismo de acción de los antidepresivos, entonces, es esperable que la administración de estos fármacos induzca cambios a nivel del funcionalismo de aquel sistema neurotransmisor que sean compatibles con el desarrollo de su acción terapéutica.

C. Si la neurotransmisión gabérgica es relevante en el mecanismo de acción de los antidepresivos, entonces, es esperable que la intervención sobre dicho sistema neurotransmisor con sustancias (agonistas o antagonistas del GABA) que modifiquen su funcionalidad, provoque alteraciones en los efectos comportamentales de los mencionados fármacos antidepresivos.

0.2. Perspectiva general de la evolución del presente trabajo.

Llegados a este punto, en el año 1985, y con el inicio real de la búsqueda bibliográfica, pudimos comprobar que el trabajo de Petty y Sherman (1981) citado no era el único que se había ocupado de la relación entre GABA y depresión. El problema había sido también abordado por Lloyd y col. (1983; Pilc y Lloyd, 1984), y desde un punto de vista más neuroquímico en posteriores estudios de Suzdak y Gianutsos (1985a, 1985b), Suranyi-Cadotte y col. (1985) y el mismo equipo de Lloyd y col. (1985).

Encontramos pues, bastantes datos en apoyo de las dos hipótesis generales planteadas, puesto que en los anteriores artículos se demostraba tanto un efecto antidepresivo de un fármaco gabérgico como es la progabida (Lloyd y col., 1983) como algunos consistentes efectos de los fármacos antidepresivos sobre distintos parámetros de la neurotransmisión gabérgica. Asimismo, cuando ya los experimentos expuestos en la "Parte Experimental I" de la presente memoria se habían completado, tuvimos ocasión de constatar cuán cercanas estaban nuestras hipótesis de las de otros autores. Borsini y col. (1986a) acababan de comprobar que tres fármacos agonistas del sistema GABA_A, el muscimol, el THIP y el ADAA, tenían efectos muy similares a los antidepresivos en el mismo modelo animal utilizado por nosotros, el test de "natación forzada" ("behavioral despair test" o "forced swimming

test") en ratas. Estos resultados condicionarían de nuevo algunos de nuestros experimentos posteriores.

Paralelamente, durante el mismo año, se publicaron los artículos de Barbaccia y col. (1986) y de Borsini y col. (1986b), así como una revisión de Lloyd y Pichat (1986), trabajos en los que de nuevo se retomaba y se revisaba la cuestión de la posible relevancia del GABA en la depresión y en los efectos de los tratamientos antidepresivos.

Esta tesis ha sido, mientras aún era proceso, un constante cambio y un permanente intento de adaptarse ("Tao Te Ching", Lao Tse) a las cambiantes circunstancias (científicas) que se daban, puesto que en determinados momentos el planteamiento experimental inmediato cambió como consecuencia de hallar algunas de nuestras hipótesis específicas verificadas por otros autores en experimentos análogos a los que proyectábamos. Este fue particularmente el caso cuando encontramos el trabajo de Borsini y col. (1986a) en que, como hemos ya comentado, se demostraba elegantemente que tres fármacos agonistas GABA_A reducían drásticamente el tiempo de inmovilidad de las ratas en el test de "natación forzada", comportándose como antidepresivos en este modelo.

Por tanto, el presente capítulo pretende anticipar que el criterio usado en la exposición de la "PARTE EXPERIMENTAL" será el de respetar en todo momento la ordenación cronológica real que

el trabajo tuvo en sus diferentes fases. Así pues, en las diferentes partes experimentales, y especialmente en la "Introducción" y "Discusión" de las mismas, se expone y se dispone de la información tal y como en realidad dispusimos de ella en el momento de plantear y realizar los diferentes estudios, de tal forma que el trabajo experimental, y su justificación y discusión, pueden mantener así mayor coherencia interna .

Los experimentos descritos en este trabajo se han llevado a cabo entre la Unidad de Psicología Médica (Dep. de Farmacología y Psiquiatría) de la U.A.B., y el "Dipartimento di Biologia Sperimentale 'Bernardo Loddo'" de la "Università di Cagliari" (Italia). Los experimentos de las Series Experimentales I y III se realizaron en la Unidad de Psicología Médica (U.A.B.), mientras que los de la Serie Experimental II se llevaron a término en el "Dipartimento di Biologia Sperimentale" (dirigido por el Prof. Giovanni Biggio) bajo la tutela directa de la Dra. Maria Giuseppa Corda. Ella nos enseñó a ver la bioquímica un poco más de cerca (quizá a eliminar algunas sombras), y con ella y sus compañeros aprendimos las técnicas necesarias para la realización de los experimentos bioquímicos de nuestra tesis.

"En su anhelo por satisfacer la deuda honrosa contraída con sus maestros, el novel observador quisiera encontrar un filón nuevo y a flor de tierra, cuya fácil explotación levantara con empuje su nombre; más, por desgracia, apenas emprendidas las primeras exploraciones bibliográficas, reconoce con dolor que el metal yace a gran profundidad y que el yacimiento superficial ha sido casi agotado por observadores afortunados llegados antes que él, y que ejercitaron el cómodo derecho de primeros ocupantes."

S. Ramón y Cajal.

1. SERIE EXPERIMENTAL I.

Efectos de diversos fármacos pro-GABAérgicos en un modelo animal de depresión.

1.1. Introducción.

En la investigación de las bases neuroquímicas de la depresión y de los procesos subyacentes al efecto terapéutico de las terapias antidepresivas es tradicional el énfasis en la búsqueda de mecanismos aminérgicos, y de ahí han surgido las hipótesis más clásicas, la noradrenérgica y la serotoninérgica (Tassin, 1986; ver secciones 2.2. y 2.3. de esta Tesis); mientras que mucha menor atención ha sido dedicada a investigar el posible papel de otros sistemas de neurotransmisión, como por ejemplo el GABAérgico. Entre los trabajos pioneros en este sentido destaca el estudio de Petty y Sherman (1981). Los autores mostraron que en el modelo de "indefensión aprendida", la bicuculina, antagonista del receptor GABA_A, inducía un estado de indefensión en la rata que era indiferenciable del inducido por la administración de choques eléctricos inescapables. Complementando esta observación, los cambios en los niveles de GABA cerebral que se hallaban en las ratas sometidas al citado modelo eran antagonizados por la previa administración de imipramina a los animales.

Con anterioridad al trabajo citado, Morselli y col. (1980) ya habían publicado resultados preliminares sobre la actividad terapéutica del SL 76-002, un agonista mixto de los receptores GABA_A y GABA_B, en pacientes con depresión endógena. La hipótesis de trabajo de Petty y Sherman obtendrá aún un soporte adicional a partir de las investigaciones de Lloyd y col. (1983) con el mismo

compuesto, ahora llamado progabida, que tanto en los modelos animales de "indefensión aprendida" y de "bulbectomía" como en ensayos clínicos (doble ciego) con pacientes deprimidos muestra un perfil antidepressivo similar al de la imipramina (Lloyd y col., 1983). Paralelamente se informaba, a partir de estudios clínicos preliminares, que el valproato sódico manifestaba cierta actividad terapéutica en trastornos afectivos (Emrich y col., 1983). El valproato es un fármaco anticonvulsivante de propiedades bioquímicas y clínicas particulares (Chapman y col., 1982; Gent y col., 1986) que lo hacen diferente del resto de anticonvulsivantes. Sin embargo, al igual que aquéllos, se considera generalmente que la estimulación de la transmisión GABA es el mecanismo que explica sus efectos anti-epilépticos (Hammond y col., 1981; Chapman y col., 1982). Incluso se ha sugerido que incrementa la función GABAérgica actuando a nivel del receptor picrotoxínico (que se halla asociado al canal del cloro, en el complejo $GABA_A/Bz/Cl^-$; Ticku y Davis, 1981).

Poco más tarde, Drugan y col. (1984) obtuvieron, en un trabajo conceptualmente muy próximo a los de Petty y Sherman (1981) y Lloyd y col. (1983), que la administración de clordiazepóxido (una benzodiazepina ansiolítica que asimismo potencia la transmisión GABA) poseía efectos tanto preventivos como terapéuticos en la situación experimental de "indefensión aprendida" en ratas, previniendo asimismo la analgesia inducida por el estrés. En el mismo estudio, se demostraba que la benzodiazepina tenía mayor

actividad cuando era administrada antes de la sesión de estrés (choque eléctrico inescapable o inmovilización) y antes del test de "indefensión" propiamente dicho que cuando se daba únicamente en una de dichas fases. Por otra parte, los resultados no eran atribuibles a la acción sedativa del fármaco, a un efecto estado-dependiente, a que el clordiazepóxido tuviese actividad directa sobre la ejecución en el test de "indefensión" (Caja de lanzadera o "shuttle-box"; bajo un programa FR-2 o Razón Fija 2), ni a una posible acción analgésica de la sustancia (Drugan y col., 1984). En total consonancia con lo anterior y especialmente con el trabajo de Petty y Sherman (1981; ver también Petty, 1986), Drugan y col. (1985) informaron asimismo de la inducción de "indefensión aprendida" en ratas mediante el pre-tratamiento (en lugar de la sesión de choque inescapable) de las mismas con la β -carbolina ansiogénica y proconvulsivante FG 7142 (Corda y col., 1986b; Corda y Biggio, 1986), agonista parcial inverso del receptor benzodiazepínico que posee eficacia negativa sobre la transmisión GABAérgica (reduce la función del complejo $GABA_A/Bz/Cl^-$; Biggio y col., 1984; para revisión ver Corda y col., 1988a; Corda y col., 1988b). Así pues, los datos sugieren que la funcionalidad del complejo receptor $GABA_A/Bz/Cl^-$ puede tener un papel relevante en la inducción y alivio de la depresión.

De ahí que en los experimentos que a continuación se expondrán hayamos intentado comprobar, por una parte, la generalización de los resultados comentados a otro modelo animal con-

siderado un análogo de la depresión humana y especialmente un test de selección de fármacos antidepresivos, nos referimos al test de "natación forzada" (Porsolt y col., 1978a; Porsolt y col., 1979). Otro objetivo ha sido comprobar si el posible efecto en este test es extensible a diferentes sustancias agonistas de los receptores GABA_A o GABA_B.

1.2. Material y método.

1.2.1. Animales y estabulación.

En los experimentos correspondientes a esta primera serie se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley, derivadas de OFA.SD (IFA-CREDO, Francia), y suministradas por la Unidad de Producción Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona. Al llegar a nuestro estabulario los animales eran distribuidos compensadamente en función del peso entre los diversos grupos experimentales de cada experiencia concreta. Se les permitía un mínimo de una semana de adaptación al nuevo entorno antes del inicio de los experimentos. Las ratas fueron alojadas, en grupos de 2-4, en jaulas de plástico estándares (26 x 50 x 14 cm.), respetando las recomendaciones de densidad del National Institute of Health (1985). Los animales tenían libre acceso a comida y agua, hallándose en condiciones ambientales de 22 ± 2 °C de temperatura y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz: 8:00-20:00 h.). Asimismo, se les cambiaba la viruta y se les lavaba la jaula dos veces por semana durante su estancia en nuestro estabulario.

El peso y la edad de los animales se mencionará al describir la metodología de los diferentes experimentos de esta serie.

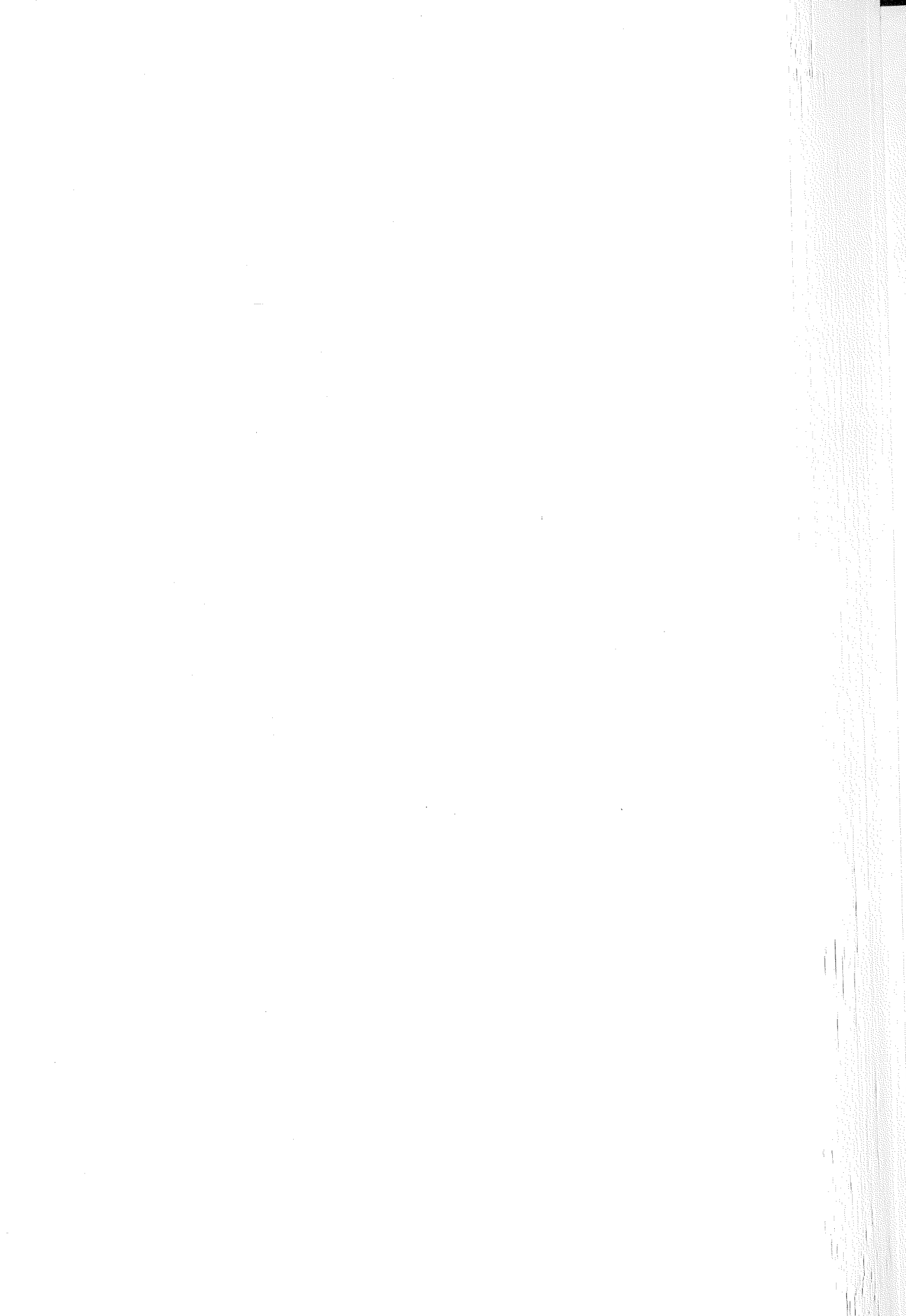
1.2.2. Procedimiento.

1.2.2.1. Test de "natación forzada".

El test de "natación forzada" se realizó esencialmente según lo describieron Porsolt y col. (1977, 1978a). Así, los animales fueron individualmente introducidos en un cilindro vertical de plexiglás (altura: 40 cm.; diámetro: 18 cm.) contenedor de 15-18 cm. de agua (dependiendo del experimento específico) mantenida a 25 °C de temperatura. Transcurridos 15 minutos dentro del agua (sesión de "estrés" o "pretest"), se extraía la rata del cilindro y se le permitía secarse durante 15 minutos en un entorno cálido (una jaula próxima a un calefactor). En función de cada experimento concreto, 24 horas después, o bien 7 ó 21 días más tarde, los animales eran introducidos de nuevo en el cilindro (sesión "test") por un período de 5 minutos durante los que se cronometraba el tiempo total de inmovilidad por una persona que desconocía el tratamiento al que el animal había sido sometido. La inmovilidad se definía como el tiempo en que la rata permanecía flotando pasivamente en el agua, o bien realizando sólo los movimientos necesarios para mantener su cabeza fuera de la misma (ver Figura E).

Las ratas sometidas a este procedimiento permanecen inmóviles durante un 75% o más del tiempo total del test de 5 minu-

Figura E.- Test de "natación forzada". A. Animal en la típica postura de inmovilidad. B. Animal realizando intentos activos de escapada.



tos, proporcionando por tanto una buena línea base para la observación de los efectos de manipulaciones que disminuyan o incluso que incrementen el tiempo de inmovilidad. Usualmente el peso de los animales que se utilizan para los estudios con el test de "natación forzada" oscila entre 160 y 200 gramos. Por nuestra parte, si bien en los primeros experimentos de esta serie respetamos aproximadamente esas directrices, a partir del experimento 3B puede observarse un notable incremento en el peso medio de los animales usados. Ello se ha debido a la impresión (a partir de experimentos piloto) de que con ratas de mayor tamaño se obtenían resultados más homogéneos, y en segundo lugar al hecho de que cuando se realizaban tratamientos farmacológicos crónicos (9-21 días) preferimos iniciarlos con animales algo mayores.

Todos los estudios con el test de "desesperanza conductual" se llevaron a cabo por la tarde, entre las 15 y las 19:30 h.

1.2.2.2. Test de "Campo Abierto".

Con objeto de comprobar si los cambios observados en la inmovilidad durante el test de "natación forzada" pueden estar relacionados con cambios inespecíficos en la actividad motora de las ratas, se llevaron a cabo experimentos independientes en los que se midió la actividad locomotora en el Campo Abierto en grupos de animales tratados con dosis, programas de ad-

ministración y fármacos que en el test de "desesperanza conductual" se habían manifestado efectivos.

El Campo Abierto utilizado consiste en una caja circular (o cilindro) de madera, tal como lo describió Broadhurst (1960), de 82 cm. de diámetro y 33.5 cm. de altura. El interior del cilindro es blanco, y la base una pieza de madera de color beige, independiente e impermeable, que se halla dividida (por finas líneas) en 19 sectores de área similar. A diferencia de la estandarización realizada por Broadhurst (1960), para nuestros fines no se ha utilizado ningún sonido ni luz especial en el test de Campo Abierto, sino que se ha llevado a cabo en las mismas condiciones de luz que las pruebas de "natación forzada" (luz normal, fluorescente, del laboratorio) (Porsolt y col., 1978a). El test de Campo Abierto se administró siempre 1 hora después de la última inyección de fármaco (excepto en los casos que se especifique de otro modo) y tuvo una duración de 5 minutos. La medida que nos interesó fue la "deambulación" (Porsolt y col., 1978a), o número de veces que el animal atravesaba cualquiera de los citados sectores con las cuatro patas, aunque también se controló la conducta de "incorporación" (sobre las dos patas traseras) como medida de exploración.

Los experimentos de Campo Abierto se llevaron a cabo por la tarde como los correspondientes de "natación forzada".

1.2.2.3. Tratamiento farmacológico y diferentes diseños experimentales.

Experimento 1. Efectos de la imipramina, baclofén y muscimol sobre la desesperanza conductual en el test de "natación forzada". Se utilizaron 117 ratas de 170 ± 20 gr. de peso (de 5.5 a 6.5 semanas de edad). Los fármacos empleados fueron: clorhidrato de imipramina y baclofén (IMI, antidepresivo tricíclico y BAC, antagonista de los receptores GABA-B; CIBA-GEIGY), y muscimol (MU, potente agonista de los receptores GABA-A; SIGMA CHEMICAL) que fueron disueltos en solución salina (NaCl) al 0.9%. El baclofén precisó de ser calentado ligeramente para su completa disolución. Todos los fármacos se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) a un volumen constante de 1 ml/kg de peso del animal. A cada animal se le administraron tres inyecciones en las 24 horas mediante entre la sesión de "estrés" (sesión de 15 minutos) y el "test" (sesión de 5 minutos) de la prueba de "natación forzada". La primera administración de fármaco la recibieron inmediatamente después del período de secado (es decir, 15 minutos después de sacarlos del cilindro con agua). La segunda inyección fue administrada 5 horas antes del test de 5 minutos, y la tercera 1 hora antes del mismo. Se constituyeron los siguientes grupos experimentales: CONT (n=19), que recibió sólo tres inyecciones de vehículo (NaCl 0.9%). BC05 (n=20), BC1 (n=12), BC5 (n=6) y BC10 (n=6), que recibieron tres inyecciones de baclofén de 0.5, 1, 5 o 10 mg/kg respectivamente. MU (n=11), cuyos animales fueron

tratados con tres inyecciones de muscimol a 0.00125 mg/kg. IMI (n=13), tratado con imipramina a 15 mg/kg. BC05+IMI (n=10), que recibió simultáneamente baclofén a 0.5 mg/kg e imipramina a 15 mg/kg. MU+IMI (n=8), tratado con muscimol a 0.00125 mg/kg e imipramina a 15 mg/kg. En este experimento la altura de agua en los cilindros fue de 15 cm.

Experimentos 2A-B. Acción del ácido δ -aminovalérico y de la progabida sobre la inmovilidad en el test de "natación forzada" Se utilizaron 41 ratas de 172 ± 13 gr. de peso (de 5.5 a 6.5 semanas de edad) y 29 animales de 219 ± 19 gr. (de 6 a 7 semanas de edad) para los experimentos 2A y 2B respectivamente. Los fármacos usados fueron: Acido δ -aminovalérico (AVAL, antagonista del receptor GABA_B y débil agonista del GABA_A; SIGMA CHEMICAL), que se disolvió en NaCl 0.9% y fue inyectado i.p. a un volumen de 5 ml/kg. Progabida (PRO, agonista mixto de los receptores GABA_{A/B}; L.E.R.S., Paris), que fue suspendido en una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (peso/volumen) en agua destilada, y administrado i.p. a un volumen de 3 ml/kg de peso del animal. Todo el procedimiento fue idéntico al descrito para el experimento 1, con la salvedad de que en el experimento 2B se pusieron 16 cm de agua en los cilindros para la realización del test de "natación forzada".

El Experimento 2A constó de los grupos: CONT (n=11), cuyos animales recibieron tres inyecciones de vehículo (NaCl 0.9%).

AVAL100 (n=12), AVAL200 (n=6), AVAL300 (n=6) y AVAL400 (n=6), que recibieron inyecciones de ácido δ -aminovalérico en dosis de 100-400 mg/kg respectivamente.

El Experimento 2B lo constituyeron los grupos: CONT (n=11), tratado con CMC al 1%. PRO50 (n=6), PRO100 (n=6) y PRO150 (n=6), que recibieron inyecciones de progabida a 50, 100 y 150 mg/kg respectivamente.

Experimentos 3A-E. Efecto del valproato sódico sobre el comportamiento en el test de "natación forzada". Para estos experimentos se utilizaron los siguientes fármacos: clorhidrato de imipramina (IMI), valproato sódico (VPA, agonista de la transmisión a través del complejo GABA_A por mecanismo poco conocido; LABAZ, CLIN-MIDY) y picrotoxina (PIC, potente antagonista del canal del cloro, en el complejo GABA_A/Bz/Cl⁻; SIGMA CHEMICAL) que se disolvieron en NaCl al 0.9%. También bicuculina (BIC, potente antagonista del receptor GABA_A; SIGMA CHEMICAL), que fue disuelta en CMC al 1%. Todos los tratamientos se administraron i.p. a un volumen de 2 ml/kg.

Experimento 3A. Realizado con 32 ratas de 184 ± 16 gr. de peso (sobre 6 semanas de edad), con una altura de agua en los cilindros de 15 cm., y con 24 horas de separación entre la sesión de "estrés" y el "test", siguiendo el programa de administración farmacológica de tres inyecciones descrito para el experimento 1. Los grupos experimentales y tratamientos farmacológicos fueron

los siguientes: CONT (n=10), que recibió tres inyecciones de NaCl al 0.9%. VPA50 (n=6), VPA100 (n=6) y VPA200 (n=10), recibieron tres inyecciones de valproato sódico de 50, 100 ó 200 mg/kg respectivamente.

Experimento 3B. Para el que se usaron 37 ratas de 350 ± 22 gr. de peso (entre 9.5 y 10.5 semanas de edad). La altura de agua en el test de "natación forzada" fue de 18 cm., hallándose las dos sesiones natatorias ("estrés" y "test") separadas por 24 horas. A diferencia de los anteriores experimentos, en este sólo se administró una inyección del correspondiente fármaco 1 hora antes del "test" de inmovilidad de 5 minutos. Constó de tres grupos experimentales: CONT (n=11), que recibió una inyección de vehículo. VPA300 (n=14) y VPA400 (n=12), a los que se administró una inyección de valproato sódico de 300 ó 400 mg/kg respectivamente.

Experimento 3C. Se llevó a cabo con 23 animales de 292 ± 18 gr. (8.5 semanas de edad aproximadamente). El test de "natación forzada" se realizó en 18 cm. de agua, y 21 días separaron la primera sesión de inmersión de la segunda. Tras el período de 15 minutos de secado, después de la sesión de "estrés", se realizó la primera administración de fármaco. Durante los 20 días siguientes cada animal fue pesado y recibió una inyección diaria de la sustancia correspondiente (siempre a última hora de la mañana), administrándosele la 21ª y última inyección 1 hora antes de efectuar el "test" de inmovilidad de 5 minutos. El experimento constó de los siguientes grupos experimentales: CONT (n=8), que