

# Challenging the serotonin system : a mechanistic approach to the method of acute tryptophan depletion in rodents

Citation for published version (APA):

van Donkelaar, E. L. (2009). *Challenging the serotonin system : a mechanistic approach to the method of acute tryptophan depletion in rodents*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20090917ed>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2009

**DOI:**

[10.26481/dis.20090917ed](https://doi.org/10.26481/dis.20090917ed)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Challenging the serotonin system

### A mechanistic approach to the method of acute tryptophan depletion in rodents

#### Summary

The method of acute tryptophan depletion (ATD) currently represents the most extensively applied challenge test to investigate the involvement of the serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) system and 5-HT-related vulnerability factors in the pathogenesis and pathophysiology of depression. ATD consists of manipulating the availability of the essential amino acid tryptophan (TRP), the dietary 5-HT precursor through administration of a TRP-free diet. However, the exact mechanism by which ATD exerts its neurophysiological effects, and to what extent changes in 5-HT neuronal activity contribute to ATD-induced neurochemical and behavioural alterations, is not fully clear. This impedes an adequate interpretation of the results arising from application of the method in both human and animal studies. The present thesis aimed to explore potential alternative mechanisms by which ATD exerts its neurophysiological and behavioural effects by administering rodents a gelatin-based protein-carbohydrate nutritional mixture.

**Chapter 1** introduces the biochemical rationale behind the method of ATD by describing the specific features involved in the biosynthesis of the essential amino acid TRP from food into the modulating 5-HT neurotransmitter in the brain. Functions and characteristics of the 5-HT system are outlined in general and with respect to its implication in major depressive disorder. An overview is given of the utility of the ATD method in depression research with human subjects and preclinical data arisen from applying the method in rats are thoroughly reviewed. The basic mechanism behind the induction of peripheral TRP depletion by administering a TRP-free diet is described and the validity of parameters used for interpreting the biochemical effects of ATD in the brain is critically assessed. Thereafter, the aims of the thesis to explore potential alternative mechanisms underlying the ATD method and its potential to induce affective and cognitive behavioural changes are introduced.

**Chapter 2** provides an overview of multiple studies in which the pharmacokinetic and behavioural effects of different dosing regimes of the TRP-free protein-carbohydrate mixture were explored in the Swiss and particularly C57BL/6 mice. As pre-existing dysfunctional 5-HT systems are nowadays widely modelled in mice, the use of mice in stead of rats for studying behaviour in general and the implication of neurotransmitter systems in psychiatric disorders in particular has significantly increased. It was, therefore, initially aimed to establish the ATD method in the mouse for subsequent potential application as 5-HT challenge tool in genetic mice models of depression. Peripheral amino acids were measured and central TRP and 5-HT concentrations were compared with anxiety and depression-like behaviour in the elevated zero-maze (EZM), forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST). The extent of peripheral TRP depletion highly depended upon the specificity of the dosing volume and the time-frame of the multiple oral administrations. While ATD resulted in a 74% reduction of the plasma ratio TRP to the sum of other large neutral amino acids (TRP/ $\Sigma$ LNAAs) in Swiss mice 1h after administration (2x10 ml/kg, 30 min interval), there was only a 40% reduction in C57BL/6 mice. The latter did not show anxiety in the EZM or increased immobility in the FST or TST. A higher dose (2x20 ml/kg) with a longer interval (60 min) reduced the ratio with 68% in C57BL/6 mice, lowered hippocampal 5-HT turnover, but had no functional effects when tested in the EZM and FST. Extreme differences in ATD effects were observed between strains and none of the profound peripheral TRP depletions paralleled central TRP or 5-HT changes. Yet, interfering ATD application-related stress effects were found to confound the ATD-induced effects upon the ratio TRP/ $\Sigma$ LNAAs in plasma. These findings have important implications for the use of ATD in general and in particular for its application in mice. It has been postulated that

mice with pre-existing 5-HT dysfunction might be more vulnerable to ATD, which remains to be elucidated.

**Chapter 3** describes the effects of ATD upon local cerebral blood flow (CBF) and cerebral metabolic rate of glucose (CMRG) as measured in 43 distinct brain regions of adult male Wistar rats by means of [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine and [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose quantitative autoradiographic imaging, respectively. To gain more insight into the potential mechanisms underlying the ATD-induced neurochemical and behavioural effects in general, explorative experiments were continued in the established rat model of ATD. As the 5-HT neurotransmitter possesses important vasoactive properties, an acute decrease in central 5-HT concentration could alter CMRG and CBF and the normal relationship between them. Such cerebrovascular alterations might contribute to the underlying mechanisms of ATD-induced affective behavioural changes and cognitive impairments. Whereas the ratio TRP/ΣLNAA decreased with 40%, no ATD-induced measurable effects upon TRP and 5-HT levels in the brain could be revealed. Nevertheless, ATD significantly reduced local CBF in 11 of the 43 brain ROIs measured, while local CMRG remained unchanged. Moreover, a downwards resetting of the relationship CBF to CMRG was found after ATD compared to the TRP+ control group, indicating a state of relative cerebrovascular oligoemia. The ATD-induced decrease in peripheral TRP levels, thus, resulted in a decrease of local CBF and an uncoupling of flow from metabolism without affecting central TRP or 5-HT levels. Therefore, a more additive role for a dysfunctional 5-HT system as an underlying mechanism of the ATD method might be implied.

**Chapter 4** reveals the cerebrovascular effects of ATD in an animal model of acquired 5-HT dysfunction induced by repeated 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'ecstasy') administrations. The neurotoxicity of MDMA is known to cause significant 5-HT terminal depletion and an acute decrease in brain 5-HT after ATD is likely to result in disturbed affective behaviour only if there is pre-existing vulnerability of the 5-HT system. By using quantitative autoradiographic imaging the effects of MDMA pretreatment were measured upon local CBF and CMRG under an ATD challenged condition, thereby investigating the relationship between cerebrovascular function and 5-HT changes in general and MDMA-induced 5-HT dysfunction as a vulnerability factor for depression in general and cognitive dysfunction in particular. MDMA induced significant 5-HT neurotoxicity and decreased central TRP and 5-HT levels considerably. ATD resulted in a mean 40% reduction of the ratio TRP/ΣLNAA in plasma without affecting central TRP or 5-HT concentrations. A downwards resetting of the relationship of CBF to CMRG was only observed after ATD treatment in the drug-naïve control animals. This indicates that ATD induced a significant upwards resetting of this relationship after MDMA pretreatment compared to controls, thereby inducing a potentiation of the MDMA-induced cerebral vascular dysfunction. ATD, thus, produces a degree of cerebrovascular hyperperfusion in animals pretreated with MDMA which could indicate a predisposition to cerebrovascular accidents, in particular haemorrhagic stroke.

**Chapter 5** shows the effects of ATD upon peripheral and central concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat while controlling for possible confounding stress effects of the specific experimental procedures. BDNF is strongly linked to the 5-HT system and, besides being extremely stress-responsive, plays an essential role in mood and memory processes and might thus contribute to the underlying mechanisms of ATD-induced behavioural changes. A significant 56% depletion of the ratio TRP/ΣLNAA was found after ATD, however, 5-HT metabolism seemed only moderately affected in the hippocampus without measurable changes in central TRP or 5-HT concentrations. Although no direct effects of ATD upon serum or brain BDNF concentrations were found, a stress-mediated decrease in BDNF levels was observed in the prefrontal cortex. Moreover, brain TRP levels correlated positively with BDNF in both the prefrontal cortex and hippocampus. Thus, BDNF-mediated mechanisms due to ATD and/or its application stress might underlie ATD-induced neurochemical and behavioural alterations.

**Chapter 6** examines the ability of phosphodiesterase (PDE) inhibitors to reverse an ATD-induced impairment in rat object recognition performance. Whereas affective behavioural changes after ATD remain controversial, ATD-induced memory deficits are consistently reported in humans, but also in rats as measured by means of the rat object recognition task. Inhibition of phosphodiesterase (PDE) enzymes appears to be a reliable method to improve memory processes by increasing the levels of the second messenger molecules cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) or both. Exploring the pro-cognitive effects of PDE inhibitors might provide more insight into potential interaction between second messenger molecules and the 5-HT system as underlying mechanism for ATD-induced cognitive dysfunction. ATD significantly decreased the ratio TRP/ $\Sigma$ LNAAs in plasma and impaired object memory performance considerably. Both the PDE5 inhibitor, vardenafil, and the PDE2 inhibitor, BAY 60-7550, that increase cGMP and both cAMP and cGMP, respectively, were able to acutely improve short-term object recognition performance after an ATD-induced deficit.

**Chapter 7** summarizes the results of the studies described in this thesis and provides a critical discussion concerning potential alternative mechanisms underlying the neurochemical and behavioural effects of the method of ATD. It is generally concluded that the parameters used to calculate reductions in brain TRP availability and 5-HT metabolism may be somewhat inaccurate. Therefore, like depression itself, ATD-induced behavioural alterations are not easily attributed directly to changes in 5-HT neurotransmission. The findings of the present thesis support the contribution of alternative mechanisms such as decreased nitric oxide synthase activity and cerebrovascular abnormalities that might be implicated in the behavioural effects of ATD and could also explain 5-HT-mediated clinical depressive symptoms. Moreover, experimental procedures related to the application of the ATD method seem highly stressful and potentially interfere with TRP metabolism, thereby confounding ATD neurochemical and behavioural results in rodents. As the ATD method seems important in the investigation of 5-HT-related vulnerability factors implicated in the onset of depression, the potential of alternative mechanisms and possible confounding factors should be taken into account for an adequate interpretation of data resulting from application of the method in both clinical and preclinical settings. In general, a degree of caution should be maintained in extrapolating the results of ATD studies to clinical depression.



## Challenging the serotonin system

### A mechanistic approach to the method of acute tryptophan depletion in rodents

#### Samenvatting

De acute tryptofaan depletie (ATD) methode is momenteel de meest toegepaste *challenge test* in het onderzoek naar de betrokkenheid van serotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) en 5-HT gerelateerde kwetsbaarheidsfactoren bij het ontstaan en het verloop van depressieve stoornissen. ATD is gebaseerd op de manipulatie van de beschikbaarheid van het essentiële aminozuur tryptofaan (TRP), de 5-HT *precursor*, door middel van het toedienen van een TRP-vrij dieet. Zowel het exacte onderliggende mechanisme van de neurofysiologische effecten van ATD als ook de mate waarin de veranderingen in de activiteit van 5-HT neuronen verantwoordelijk zijn voor de ATD-geïnduceerde neurochemische en gedragsveranderingen zijn niet volledig bekend. Dit belemmert een adequate interpretatie van de resultaten die verkregen worden na toepassing van de methode in humane en dierexperimentele experimenten. De studies beschreven in dit proefschrift hadden tot doel potentiële alternatieve onderliggende mechanismen van de neurofysiologische en gedragseffecten van ATD in ratten en muizen nader te onderzoeken door middel van het toedienen van een specifiek voedingsmengsel van eiwitten en koolhydraten op basis van gelatine.

**Hoofdstuk 1** introduceert de biochemische principes die de basis vormen van de ATD methode door middel van een uiteenzetting van de specifieke elementen die kenmerkend zijn voor de biosynthese vanaf het essentiële aminozuur TRP in voedsel tot aan de modulerende 5-HT neurotransmitter in het brein. Zowel de algemene functies en eigenschappen van het 5-HT systeem als ook de specifieke veranderingen die een belangrijke rol spelen en nauw betrokken zijn bij de ontwikkeling van depressieve stoornissen worden uiteengezet. Er wordt een overzicht gegeven van de bruikbaarheid van de methode in depressieonderzoek met proefpersonen en preklinische resultaten die tot stand zijn gekomen na toepassing van de methode in ratten worden grondig besproken. Het basismechanisme dat ten grondslag ligt aan de inductie van perifere TRP depletie door middel van het toedienen van een TRP-vrij dieet wordt beschreven en de validiteit van de parameters die gebruikt worden voor de interpretatie van de biochemische effecten van ATD in het brein worden kritisch geëvalueerd. Vervolgens worden de doelstellingen van het proefschrift geïntroduceerd, namelijk het nader onderzoeken van potentiële alternatieve onderliggende mechanismen van de ATD methode en de capaciteit van de methode om affectieve en cognitieve veranderingen teweeg te brengen.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de meervoudige studies waarbij de farmacokinetische en gedragseffecten van diverse doseringsprotocollen van het TRP-vrije eiwit-koolhydraatmengsel onderzocht werden in muizen van het Swiss type en voornamelijk in C57BL/6 muizen. Gezien het feit dat latent aanwezige disfunctionele 5-HT systemen vandaag de dag extensief gemoduleerd worden in muizen, is het gebruik van muizen in plaats van ratten voor het bestuderen van gedrag in het algemeen en in het bijzonder de betrokkenheid van neurotransmittersystemen in psychiatrische stoornissen significant toegenomen. De initiële doelstelling was het opzetten van de ATD methode in de muis voor verdere potentiële toepassing als 5-HT *challenge* model in genetische muismodellen voor depressie. Perifere aminozuren werden gemeten en centrale TRP en 5-HT concentraties werden vergeleken met angst- en depressie-gerelateerde gedrag in de *elevated zero-maze* (EZM), *forced swim test* (FST) en *tail suspension test* (TST). De mate van perifere TRP depletie was uiterst afhankelijk van de specificiteit van het doseringsvolume en het tijdsbestek van de meervoudige orale toedieningen. Terwijl ATD in Swiss muizen resulteerde in een afname van 74% van de ratio van TRP tot de som van andere grote aminozuren (TRP/ $\Sigma$ LNAAs) in plasma 1 uur na toediening (2x10 ml/kg, 30 min interval), was in C57BL/6 muizen slechts een afname van 40%. Deze muizen toonden ook geen

angstgerelateerde gedrag in de EZM of een toename van immobiliteit in de FST of TST. Een hogere dosering (2x20 ml/kg) met een langer interval (60 min) deed de ratio afnemen met 68% in C57BL/6 muizen en verlaagde de 5-HT turnover in de hippocampus, maar had geen functionele effecten indien getest in de EZM en FST. Extreme verschillen in ATD effecten werden geobserveerd tussen de verschillende muizenstammen en geen enkele van de diepgaande perifere TRP depleties kwam overeen met centrale TRP of 5-HT veranderingen. Echter, interfererende stresseffecten gerelateerd aan de toepassing van de ATD methode leken de ATD-geïnduceerde effecten op de ratio TRP/ $\Sigma$ LNAA in plasma te beïnvloeden. Deze bevindingen hebben belangrijke gevolgen voor het gebruik van ATD in het algemeen en in het bijzonder voor de toepasbaarheid in muizen. Het wordt verondersteld dat muizen met latent aanwezige 5-HT disfunctie mogelijk in hogere mate kwetsbaar zijn voor de effecten van ATD, hetgeen nader onderzocht zal moeten worden.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de effecten van ATD op de lokale cerebrale doorbloeding (*cerebral blood flow*; CBF) en de mate van cerebraal glucose metabolisme (*cerebral metabolic rate of glucose*; CMRG). Deze werden gemeten in 43 verschillende hersenstructuren van volwassen mannelijke Wistar ratten aan de hand van [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine en [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose kwantitatieve autoradiografische imaging. Ter vergroting van het inzicht in de potentiële onderliggende mechanismen van ATD-geïnduceerde neurochemische en gedragseffecten in het algemeen werden oriënterende experimenten voortgezet in het ratmodel van ATD. Gezien het feit dat de 5-HT neurotransmitter belangrijke vasoactieve eigenschappen bezit zou een acute afname in centrale 5-HT concentraties veranderingen teweeg kunnen brengen in de CMRG en CBF en hun gewoonlijke onderlinge relatie. Dergelijke cerebrovasculaire veranderingen zouden een bijdrage kunnen leveren aan de onderliggende mechanismen van ATD-geïnduceerde veranderingen in affectief gedrag en cognitieve beperkingen. Hoewel de ratio TRP/ $\Sigma$ LNAA afnam met 40% werden er geen meetbare effecten gevonden van ATD op TRP en 5-HT concentraties in het brein. Desondanks reduceerde ATD de lokale CBF aanzienlijk in 11 van de 43 onderzochte hersenstructuren, terwijl de lokale CMRG onveranderd bleef. Bovendien werd een neerwaartse *resetting* van het verband tussen CBF en CMRG geobserveerd na ATD vergeleken met de TRP+ controlegroep, wijzend op een mate van cerebrovasculaire oligemie. De ATD-geïnduceerde afname in perifere TRP concentraties resulteerde dus in een verlaagde lokale CBF en in een afwijking in het normale verband tussen de mate van doorbloeding al naar gelang de mate van metabolisme zonder veranderingen in centrale TRP en 5-HT concentraties. Derhalve wordt verondersteld dat een disfunctioneel 5-HT systeem eerder slechts een bijrol speelt in de onderliggende mechanismen van ATD.

**Hoofdstuk 4** onthult de cerebrovasculaire effecten van ATD in een diermodel van verworven 5-HT disfunctie geïnduceerd door middel van herhaalde toedieningen met 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ‘ecstasy’). Het is bekend dat de neurotoxiciteit van MDMA significante schade toebrengt aan 5-HT neuronen en een acute afname van 5-HT in het brein na ATD veroorzaakt mogelijk slechts affectieve gedragsveranderingen als er sprake is van een latent aanwezige kwetsbaarheid van het 5-HT systeem. Door middel van kwantitatieve autoradiografie imaging werd het effect gemeten van de herhaalde voorbehandeling met MDMA samen met een ATD challenge op de lokale CBF en CMRG. Hierbij werd niet alleen de relatie tussen cerebrovasculaire functie en 5-HT veranderingen onderzocht, maar ook de MDMA-geïnduceerde 5-HT disfunctie als kwetsbaarheidfactor voor depressie in het algemeen en voor cognitive disfunctie in het bijzonder. MDMA induceerde significante 5-HT neurotoxiciteit en verlaagde centrale TRP en 5-HT concentraties aanzienlijk. ATD resulteerde gemiddeld in een afname van 40% van de ratio TRP/ $\Sigma$ LNAA in plasma zonder de centrale TRP en 5-HT concentraties te veranderen. Een neerwaartse *resetting* van het verband tussen de mate van doorbloeding al naar gelang de mate van metabolisme werd alleen geobserveerd in de controlegroep die niet aan de drug blootgesteld was. Dit geeft aan dat ATD een significante opwaartse *resetting* van de relatie tussen CBF en CMRG veroorzaakt na voorbehandeling met MDMA vergeleken met de controlegroep waarbij het de

MDMA-geïnduceerde cerebrovasculaire disfunctie lijkt te versterken. ATD produceert dus een zekere mate van cerebrovasculaire hyperperfusie in dieren die voorbehandeld zijn met MDMA. Dit zou mogelijk een kwetsbaarheidsfactor kunnen vormen voor een cerebrovasculair accident met in het bijzonder de kans op een hersenbloeding.

**Hoofdstuk 5** toont de effecten van ATD op perifere en centrale concentraties van *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) in de rat rekening houdend met mogelijke stresseffecten van de specifieke experimentele procedures die de resultaten zouden kunnen beïnvloeden. De productie van BDNF hangt sterk samen met het 5-HT systeem en is niet alleen in extreme mate gevoelig voor stress, maar speelt ook een belangrijke rol in affectieve en geheugenprocessen en zou dus betrokken kunnen zijn bij het onderliggende mechanisme van ATD-geïnduceerde gedragsveranderingen. Een significante afname van 56% van de ratio TRP/ $\Sigma$ LNAA in plasma werd geobserveerd, echter, 5-HT metabolisme leek slechts minimaal aangetast te zijn in de hippocampus zonder meetbare veranderingen in centrale TRP of 5-HT concentraties. Hoewel geen directe effecten van ATD werden gevonden op de BDNF concentraties in serum of het brein werd een door stress veroorzaakte afname gevonden in BDNF concentraties in de prefrontale cortex. Bovendien correleerden centrale TRP concentraties positief met BDNF zowel in de prefrontale cortex als in de hippocampus. Veranderingen in BDNF concentraties als gevolg van ATD en/of de stress die gerelateerd is aan de toepassing ervan zou derhalve betrokken kunnen zijn bij het onderliggende mechanisme van ATD-geïnduceerde neurochemische en gedragsveranderingen.

**Hoofdstuk 6** onderzoekt in hoeverre phosphodiesterase (PDE) remmers in staat zijn om een ATD-geïnduceerde verslechtering van de rat object herkenningstest op te heffen. Hoewel affectieve gedragsveranderingen na ATD controversieel blijken worden ATD-geïnduceerde geheugendeficiënties consistent gerapporteerd in mensen, maar ook in ratten zoals gemeten met de rat object herkenningstest. Het remmen van PDE enzymen blijkt een betrouwbare methode voor het verbeteren van geheugenprocessen door middel van het verhogen van de concentraties van de *second messenger* moleculen *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) en *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP) of beiden. Het nader onderzoeken van de pro-cognitieve effecten van PDE remmers kan meer inzicht geven in de potentiële interactie tussen *second messenger* moleculen en het 5-HT systeem als onderliggend mechanisme voor ATD-geïnduceerde cognitieve disfunctie. ATD verlaagde de ratio TRP/ $\Sigma$ LNAA in plasma en veroorzaakte een aanzienlijke verslechtering van de object herkenningstest. Zowel de PDE5 remmer, vardenafil, als ook de PDE2 remmer, BAY 60-7550, die respectievelijk cGMP en zowel cAMP als cGMP verhogen, waren in staat om de object herkenningstest na een ATD-geïnduceerde verslechtering acuut te verbeteren.

**Hoofdstuk 7** geeft een samenvatting van de resultaten van de studies die beschreven worden in dit proefschrift en voorziet in een kritische discussie betreffende de potentiële alternatieve onderliggende mechanismen van de neurochemische en gedragseffecten van de ATD-methode. Over het algemeen wordt geconcludeerd dat de parameters die gebruikt worden om de afname van de beschikbaarheid van TRP in het brein en 5-HT metabolisme te berekenen niet uiterst nauwkeurig zijn. ATD-geïnduceerde gedragsveranderingen, als ook depressie zelf, zijn daarom niet gemakkelijk direct toe te schrijven aan veranderingen in 5-HT neurotransmissie. De bevindingen van dit proefschrift wijzen op de bijdrage van alternatieve mechanismen zoals een afname in de activiteit van *nitric oxide synthase* of cerebrovasculaire afwijkingen die betrokken zouden kunnen zijn bij de gedragseffecten van ATD en tevens 5-HT-gemedieerde klinische depressieve symptomen zouden kunnen verklaren. Bovendien lijken de experimentele procedures die gerelateerd zijn aan de toepassing van de ATD-methode aanzienlijk stressvol en interfereren mogelijk met TRP metabolisme, hetgeen de pure neurochemische en gedragseffecten van ATD in knaagdieren mogelijk in de war stuurt. Gezien het feit dat de ATD-methode belangrijk is voor onderzoek naar 5-HT-gerelateerde kwetsbaarheidsfactoren die betrokken zijn bij het ontstaan van depressie zou er rekening gehouden moeten worden met de potentie van alternatieve mechanismen en mogelijke interfererende factoren



voor een zorgvuldige interpretatie van data die voortkomt uit de toepassing van de methode in zowel humane als dierexperimentele studies. In het algemeen lijkt het raadzaam om voorzichtig om te gaan met het direct extrapoleren van de resultaten van ATD studies naar de klinische symptomen van depressieve stoornissen.

## Challenging the serotonin system

### A mechanistic approach to the method of acute tryptophan depletion in rodents

#### Resumen

La técnica de la depleción aguda de triptófano (ATD por sus siglas en inglés) representa hoy en día la prueba de desafío más utilizada para investigar la implicación de la serotonina (5-HT), el sistema serotoninérgico así como factores de vulnerabilidad relacionados en la patogénesis y la fisiopatología de la depresión. La ATD consiste en la manipulación del triptófano (TRP), un amino ácido esencial que es precursor de la 5-HT, a través de una dieta especial carente del mismo. El mecanismo exacto detrás de los efectos neurofisiológicos, y el nivel en el que alteraciones en la actividad neuronal de 5-HT contribuyen a modificaciones neuroquímicas y cambios en el comportamiento inducido por ATD no se conocen del todo. Los estudios descritos en la presente tesis tuvieron como objetivo explorar mecanismos alternativos mediante los cuales ATD ejerce sus efectos neurofisiológicos y de comportamiento.

El **capítulo 1** introduce la idea general del uso de la técnica de ATD. Describe las características específicas de la biosíntesis del TRP, desde la adquisición del mismo a través de la dieta hasta la síntesis de 5-HT, un neurotransmisor modulador en el cerebro. Explica las funciones y características generales del sistema serotoninérgico, así como su implicación en la depresión mayor. Presenta un panorama general de la utilidad de la técnica de ATD en la investigación de la depresión en humanos y se revisan de manera profunda los datos derivados de la aplicación de la técnica. Muestra el mecanismo básico de la depleción del TRP periférico mediante la administración de una dieta carente del mismo y se evalúa críticamente la validez de los parámetros que se suelen utilizar para la interpretación de los efectos bioquímicos de la depleción de TRP en el cerebro. A continuación se introducen los objetivos de la tesis que consisten en la exploración de posibles mecanismos alternativos subyacentes a la técnica de ATD y su potencial para inducir cambios de comportamiento tanto afectivos como cognitivos.

El **capítulo 2** presenta un resumen de los múltiples estudios, en los cuales se investigaron los efectos farmacocinéticos y conductuales de diferentes dosis del compuesto proteico y de hidratos de carbono sin TRP, en ratones tipo Swiss y particularmente en ratones tipo C57BL/6. Hoy en día el sistema serotoninérgico disfuncional es modulado de manera extensa en ratones, por lo que el uso de ratones en vez de ratas para estudiar el comportamiento en general y específicamente la implicación de sistemas de neurotransmisores en trastornos psiquiátricos, ha incrementado significativamente. El objetivo inicial se basaba en el ajuste de la técnica de ATD en el ratón con la posible aplicación de la técnica como prueba de desafío de la 5-HT en ratones transgénicos, modelos animales de depresión. Los amino ácidos fueron medidos periféricamente y los niveles centrales de TRP y de 5-HT fueron comparados con el grado de conducta de ansiedad y depresiva en el laberinto elevado en cero (EZM), la prueba de nado forzado (FST) y el test de suspensión en la cola (TST). El grado de depleción de TRP periférico dependía en gran medida de la especificidad del volumen de la dosis y del tiempo entre las múltiples administraciones. Mientras que en los ratones del tipo Swiss ATD provocó una reducción del 74% de la proporción de TRP comparado con la suma de los otros amino ácidos largos (TRP/ $\Sigma$ LNAA) una hora después a la administración (2x10 ml/kg; 30 minutos de intervalo), en los ratones del tipo C57BL/6 se efectuó una reducción de sólo un 40%. Estos últimos no mostraron ansiedad en el EZM o un incremento en la inmovilidad en el FST o TST. Una dosis más alta (2x20 ml/kg) con un intervalo más largo (60 minutos) redujo la proporción un 68% en los ratones del tipo C57BL/6 y disminuyó el recambio de 5-HT en el hipocampo, pero no causó efectos conductuales en el EZM o FST. Se observaron grandes diferencias entre los distintos tipos de ratones y las profundas depleciones de TRP, las cuales en ningún momento correspondían con

cambios en el TRP o 5-HT cerebral. Sin embargo, se encontró que el estrés relacionado a la aplicación del ATD interfiere con los efectos inducidos por ATD respecto a la proporción TRP/ $\Sigma$ LNAA en el plasma. Estos resultados tienen una implicación importante para el uso de ATD en general y particularmente para su aplicación en ratones. Probablemente, ratones con una disfunción de 5-HT pre-existente podrían ser más vulnerables al ATD.

El **capítulo 3** describe los efectos de la ATD sobre el flujo sanguíneo cerebral (CBF) y la tasa metabólica de glucosa cerebral (CMRG). Ambos parámetros fueron medidos en 43 áreas distintas del cerebro de ratas adultas del tipo Wistar. Para esto fue utilizada la técnica de imagenología autoradiográfica cuantitativa de [14C]-iodoantipirina y [14C]-2-desoxiglucosa, respectivamente. Para ampliar la comprensión de los posibles mecanismos responsables de los efectos neuroquímicos y conductuales de la ATD se continuó con los experimentos de exploración en el modelo establecido de ATD en la rata. El neurotransmisor 5-HT posee importantes características vasoactivas, un decremento agudo de los niveles de 5-HT podría alterar el CMRG y el CBF y la relación que existe entre ambos bajo condiciones fisiológicas normales. Este tipo de alteraciones cerebrovasculares podrían contribuir con los mecanismos responsables de los cambios conductuales de tipo afectivo y con el déficit cognitivo. Mientras que la proporción TRP/ $\Sigma$ LNAA disminuyó un 40%, no se pudo observar un efecto perceptible inducido por la ATD sobre los niveles de TRP y el de 5-HT en el cerebro. A pesar de ello, la ATD redujo el CBF local significativamente en 11 de las 43 áreas de interés, mientras que la CMRG se mantuvo similar. Además, se pudo observar que el ATD produjo que la relación entre el CBF y la CMRG fue decreciente en comparación con el grupo control, TRP+, indicativo de un estado aparente de oligoemia cerebrovascular. Así, el decremento de los niveles periféricos de TRP inducido por la ATD resultó en una disminución del CBF local y un desacoplamiento del flujo y metabolismo sin afectar los niveles cerebrales de TRP o 5-HT. Por eso se sugiere que un sistema disfuncional de la 5-HT podría ser un mecanismo complementario a la ATD.

El **capítulo 4** revela los efectos cerebrovasculares de la ATD en un modelo animal de disfunción serotoninérgica adquirida, inducida por la administración repetitiva de 3, 4-metilenedioximetanfetamina (MDMA; 'extasis'). Se sabe que la neurotoxicidad de la MDMA causa una disminución significativa de las terminales neuronales serotoninérgicas y un decremento agudo de los niveles de 5-HT. Después de la ATD probablemente exista un trastorno en el comportamiento afectivo solamente si se presenta de antemano una vulnerabilidad del sistema de 5-HT. Con el propósito de investigar la relación entre la función cerebrovascular, los cambios en el sistema serotoninérgico y la disfunción del sistema 5-HT inducido por el MDMA como factor de vulnerabilidad para la depresión en general así como para la disfunción cognitiva en particular, se midió el efecto del pre-tratamiento con MDMA juntos con la ATD sobre el CBF y el CMRG local. La MDMA provocó una neurotoxicidad significativa del sistema 5-HT y disminuyó los niveles cerebrales de TRP y de 5-HT considerablemente. ATD resultó en una reducción de un 40% de la proporción TRP/ $\Sigma$ LNAA plasmática sin afectar los niveles cerebrales de TRP o 5-HT. Se observó que solamente el tratamiento con ATD en los animales del grupo control (sin el tratamiento farmacológico) hizo que decreciera la relación entre CBF y CMRG. Esto indica que, en comparación con el grupo control, la ATD *per se* provocó que esta relación aumentara después del pre-tratamiento con MDMA potenciando así la disfunción cerebrovascular inducida por el MDMA. Así pues, la ATD produce un grado de hiperperfusión cerebrovascular en animales pre-tratados con MDMA lo cual podría indicar una predisposición a los accidentes cerebrovasculares, particularmente al derrame cerebral.

El **capítulo 5** muestra los efectos de la ATD sobre el factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), controlando las posibles situaciones que en la rata provocan estrés y que posteriormente influyen en el análisis de los resultados obtenidos. El BDNF está fuertemente relacionado con el sistema de 5-HT y no sólo es muy sensible al estrés, si no que también tiene un papel esencial en la regulación del ánimo y el procesamiento de la memoria, por lo cual podría

contribuir con el mecanismo que provoca las alteraciones conductuales inducidas por la ATD. Se encontró una disminución significativa de un 56% de la proporción TRP/ $\Sigma$ LNAA plasmática, no obstante, el metabolismo de 5-HT aparentemente sólo se afectó de manera moderada en el hipocampo. Aunque no se encontraron efectos directos sobre los niveles de BDNF en el suero o en el cerebro, se detectó un decremento en los niveles de BDNF en la corteza frontal producido por el estrés. Además, se pudo observar una correlación positiva entre los niveles cerebrales de TRP y los de BDNF tanto en la corteza frontal como en el hipocampo. Las alteraciones en los niveles de BDNF causado por la ATD o el estrés relacionado con su aplicación podrían entonces ser los responsables de las alteraciones neuroquímicas y conductuales inducidas por la ATD.

El **capítulo 6** evalúa la capacidad de los inhibidores de la fosfodiesterasa (*phosphodiesterase*; PDE) para revertir el déficit en la ejecución de la tarea de reconocimiento de objetos inducido por la ATD. Aunque las alteraciones del comportamiento afectivo inducidas por la ATD permanecen controvertibles, el déficit de la memoria inducida por la ATD se observa consistentemente tanto en humanos como en ratas cuando se mide mediante el test de reconocimiento de objetos. La inhibición de las fosfodiesterasas es un método confiable para mejorar los procesos de memoria mediante un incremento de los niveles de los segundos mensajeros: adenosínmonofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (CMPc) o ambos. El análisis de los efectos pro-cognitivos de inhibidores de PDE podría mejorar la comprensión de la posible interacción entre moléculas del tipo segundo mensajero y el sistema 5-HT como mecanismo de la disfunción cognitiva inducida por la ATD. La ATD resultó en un decremento significativo de la proporción plasmática de TRP/ $\Sigma$ LNAA y afectó la tarea de reconocimiento de objetos considerablemente. Tanto el inhibidor de PDE5, vardenafil, y el inhibidor de PDE2, BAY 60-7550, que incrementan GMPc y CMPc-AMPc respectivamente tuvieron la capacidad de mejorar la ejecución de la memoria a corto plazo después de un déficit inducido por la ATD.

El **capítulo 7** resume los resultados de los estudios descritos en esta tesis y ofrece una discusión crítica con respecto a posibles mecanismos alternativos de los efectos neuroquímicos y conductuales de la técnica de la ATD. En general se puede concluir que los parámetros utilizados para calcular la disminución de la disponibilidad de TRP y el decremento en el metabolismo de 5-HT son poco precisos. Por todo esto resulta difícil asociar la depresión, así como las alteraciones conductuales inducidas por la ATD directamente con cambios en la neurotransmisión de 5-HT. Los resultados de esta tesis apoyan la contribución de mecanismos alternativos tales como el decremento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa y las anomalías cerebrovasculares con los efectos conductuales observados después de la ATD y podrían explicar también la sintomatología clínica de depresión mediada por 5-HT. Los procedimientos relacionados con la aplicación de la técnica de ATD resultan muy estresantes *per se* y podrían interferir con el metabolismo de TRP confundiendo así los resultados neuroquímicos y comportamentales de la ATD en roedores. La técnica de ATD parece ser importante para la investigación de los factores de vulnerabilidad relacionados al sistema de la 5-HT implicados con el establecimiento de la depresión. Se debe tener en cuenta la importancia de los mecanismos alternativos y los posibles factores de confusión para una interpretación adecuada de los datos obtenidos con la aplicación de la técnica en un marco tanto clínico como preclínico. En general, debe tener cierto cuidado con la extrapolación de resultados obtenidos utilizando la técnica de ATD a la depresión clínica.