



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS  
RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GLUTAMATO (MGLU)  
EN LA REGULACIÓN DE LA CONDUCTA AGRESIVA EN  
RATONES MACHOS**

**Vanessa De Castro Carratalá**

Departamento de Psicobiología y Metodología de las  
Ciencias del Comportamiento  
Universidad de Málaga

Directores: José Francisco Navarro Humanes y M<sup>a</sup> Mercedes Martín López

Málaga, noviembre de 2015

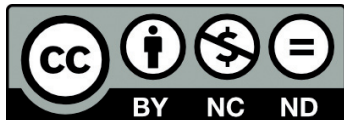


Publicaciones y  
Divulgación Científica

AUTOR: Vanessa De Castro Carratalá

 <http://orcid.org/0000-0003-2932-6330>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Mediante la presente se certifica que:

La tesis doctoral: “Estudio del papel de los receptores metabotrópicos del glutamato (mGlu) en la regulación de la conducta agresiva en ratones machos”, presentada por Vanessa De Castro Carratalá, ha sido supervisada por los profesores José Francisco Navarro Humanes y M<sup>a</sup> Mercedes Martín López, del Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, y cumple los requisitos para el grado de Doctor en Psicología.

Málaga, noviembre de 2015

José Francisco Navarro Humanes

M<sup>a</sup> Mercedes Martín López

“There is a stream, a succession of states, or waves, or fields (or of whatever you please to call them), of knowledge, of feeling, of desire, of deliberation, etc., that constantly pass and repass, and that constitute our inner life. The existence of this stream is the primal fact, the nature and origin of it form the essential problem, of our science” (Williams James, 1899).

*A mis padres,  
a mis hermanos,  
y a mi hijo Julio.*

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y ayudado durante la realización de mi tesis doctoral.

Realmente no tengo palabras para expresar la enorme gratitud que siento hacia mis directores de tesis, los Dres. José Francisco Navarro y Mercedes Martín.

Jamás olvidaré el día que me presenté en el despacho de mi director, el Dr. Navarro: marcó un antes y un después en mi vida. Mis infinitas gracias por darme la maravillosa oportunidad de emprender este proyecto. Gracias por mostrarme el verdadero amor a la ciencia. Por recordarme mi camino. Por nuestras largas conversaciones. Por tu profesionalidad e infinita paciencia. Por ser un inmejorable director de tesis y un auténtico tutor.

Gracias Mercedes por ser una fantástica co-directora. Por estar siempre ahí, animándome y apoyándome. Por tu paciencia y meticulosidad. Y por sacarme siempre una sonrisa.

A la Dra. Carmen Pedraza, por su disponibilidad.

Al grupo de investigación NeuroAD, del departamento de Biología Celular, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, dirigido por la Dra. Antonia Gutiérrez. Muchísimas gracias Antonia por haberme ayudado con personal técnico, así como por el tiempo que me has cedido cuando más lo he necesitado. Además, quiero aprovechar estas líneas para agradecerte la oportunidad de la que me has brindado al formar parte de tu grupo y de haber confiado en mí, durante todo este tiempo, para sacar adelante todo el trabajo que tenías en mente. Ha sido una bonita experiencia y además, he podido materializar parte de lo que he aprendido en la realización de mi tesis. Mis agradecimientos también a Dr. José Carlos, por ser siempre tan afable. Y a todos mis compañeros, Eli, Laura, Mercedes y Raquel, así como a las nuevas generaciones que han ido llegando, Ángela, Cristina, Juan Jo y Rubén, que me han alegrado el día a día y han estado siempre dispuestos a ayudarme. He aprendido muchísimo con todos vosotros y me habéis ayudado a seguir adelante con esta ardua y satisfactoria tarea. Merecen una mención especial Eli, mi princesa y Laura, mi niña bonita. A todos, siempre os estaré muy agradecida y os llevaré en mi corazón. Os quiero.

Toda mi gratitud hacia la Dra. Alicia Rivera, que con sus cálidas palabras y su atención me ha ayudado a continuar por encima de todo. Gracias por preocuparte por mí y por ¡animarme a sentarme en el microscopio!

También quiero dar las gracias a los miembros del grupo de Alicia, compañeros de la sala de becarios, Alejandra, Jose y Ruth. Y a Diana, fiel amiga y compañera. Nunca me olvido de ti.

Julia y Luis, mis amados mosqueperros, compañeros y amigos inseparables que me han apoyado siempre y de manera incondicional.

A todos mis amigos.

A mis Padres, ellos han sido mis grandes maestros, sin lugar a dudas. Y a mis hermanos, con los que siempre puedo contar.

¡Muchísimas Gracias!

---

# ÍNDICE

---

1. INTRODUCCIÓN	I
2. GLUTAMATO	5
2.1. Receptores ionotrópicos	8
2.2. Receptores metabotrópicos	11
3. NEUROBIOLOGÍA DE LA AGRESIÓN	18
3.1. Neuroquímica de la agresión	19
3.1.1. Aminoácidos excitatorios e inhibitorios	19
3.1.1.1. Glutamato	20
3.1.1.2. GABA	20
3.1.2. Monoaminas	23
3.1.2.1. Serotonina (5-HT)	24
3.1.2.2. Dopamina (DA)	28
3.1.2.3. Norepinefrina (NE)	31
3.1.3. Monoamina oxidasa A (MAO-A)	33
3.2. Neuroanatomía de la agresión	33
3.2.1. Hipotálamo	34
3.2.1.1. Conexiones aferentes	35
3.2.1.2. Conexiones eferentes	37
3.2.2. Corteza prefrontal (PFC)	38
3.2.3. Núcleo dorsal del rafe (DRN)	39
3.2.4. Núcleo accumbens (NAc)	39
3.2.5. Sistema olfativo	40
4. GLUTAMATO Y AGRESIÓN	42
5. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	51
6. METODOLOGÍA	57
6.1. Animales	57
6.2. Fármacos	57
6.2.1. JNJ16259685	57
6.2.2. AMN082	58
6.2.3. (S)-3,4-DCPG	58
6.2.4. (RS)-3,4-DCPG	59
6.2.5. LY354740	59
6.3. Procedimiento experimental	60
6.3.1. Estudios conductuales: agresión	60
6.3.2. Estudios inmunohistoquímicos: c-Fos	64
6.3.2.1. Preparación del tejido para microscopía óptica	64
6.3.2.2. Técnica inmunohistoquímica	66
6.3.2.3. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico	67
6.3.2.4. Análisis estadísticos	70



7. RESULTADOS	<b>72</b>
7.1. Experimento 1: Efectos de la administración aguda de JNJI6259685 (antagonista del receptor mGlu1) sobre la conducta agonística en ratones macho	<b>72</b>
7.1.1. Introducción	72
7.1.2. Metodología	72
7.1.3. Resultados	73
7.1.4. Discusión breve	75
7.2. Experimento 2: Efectos de la administración aguda de AMN082 (agonista del receptor mGlu7) sobre la conducta agonística en ratones macho	<b>77</b>
7.2.1. Introducción	77
7.2.2. Metodología	77
7.2.3. Resultados	78
7.2.4. Discusión breve	80
7.3. Experimento 3: Efectos de la administración aguda de (S)-3-4-DCPG (agonista del receptor mGlu8) sobre la conducta agonística en ratones macho	<b>82</b>
7.3.1. Introducción	82
7.3.2. Metodología	82
7.3.3. Resultados	83
7.2.4. Discusión breve	84
7.4. Experimento 4: Efectos de la administración aguda de (RS)-3-4-DCPG (antagonista del receptor AMPA/agonista del receptor mGlu8) sobre la conducta agonística en ratones macho	<b>86</b>
7.4.1. Introducción	86
7.4.2. Metodología	86
7.4.3. Resultados	87
7.4.4. Discusión breve	88
7.5. Experimento 5: Efectos de la administración aguda de LY654740 (agonista del receptor mGlu2/3) sobre la conducta agonística en ratones macho	<b>89</b>
7.5.1. Introducción	89
7.5.2. Metodología	89
7.5.3. Resultados	90
7.5.4. Discusión breve	92
7.6. Experimento 6: Efectos de la administración subcrónica de JNJI6259685 sobre la conducta agonística y la actividad c-Fos cerebral	<b>94</b>
7.6.1. Introducción	94
7.6.2. Metodología	95
7.6.3. Resultados	96
7.6.3.1. Efectos sobre la conducta agonística	96
7.6.3.2. Efectos sobre la inmunorreactividad c-Fos inducida por las distintas condiciones experimentales	98
7.6.4. Discusión breve	106
8. DISCUSIÓN GENERAL	<b>110</b>

9. CONCLUSIONES	125
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
11. APÉNDICE	160
11.1. Lista de abreviaturas	161
11.2. Protocolos para los estudios de inmunohistoquímica	163
11.2.1. Tampones para inmunohistoquímica	163
11.2.2. Solución crioprotectora	163
11.2.3. Portaobjetos gelatinizados	164

## 2. GLUTAMATO Y RECEPTORES

<u>Figura 2.1.</u> Ciclo de glutamina-glutamato	7
<u>Figura 2.1.1.</u> Representación esquemática de los receptores ionotrópicos de glutamato	9
<u>Figura 2.2.1.</u> Representación esquemática de los receptores metabotrópicos de glutamato	12
<u>Figura 2.2.2.</u> Representación esquemática de las vías de trasducción de señales de los mGluR	13
<u>Tabla 2.2.1.</u> Distribución de los mGluR	15

## 3. NEUROBIOLOGÍA DE LA AGRESIÓN

<u>Figura 3.1.</u> Balance glutamato/GABA	19
<u>Figura 3.2.</u> Vías neuroanatómicas de la agresión en roedores	34
<u>Tabla 3.1.</u> Resultados principales de los estudios farmacológicos/genéticos de los principales neurotransmisores implicados en la conducta agresiva	23

## 4. GLUTAMATO Y AGRESIÓN

<u>Tabla 4.1.</u> Estudios farmacológicos de los iGluR y la agresión	46
--	----

## 5. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

<u>Tabla 5.1.</u> Ligandos de los receptores mGlu empleados en los distintos experimentos	55
<u>Tabla 5.2.</u> Diseño del experimento 6	55

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Figura 6.2.1.</u> JNJI6259685	58
<u>Figura 6.2.2.</u> AMN082	58
<u>Figura 6.2.3.</u> (S)-3,4-DCPG	58
<u>Figura 6.2.3.</u> (RS)-3,4-DCPG	59
<u>Figura 6.2.5.</u> LY354740	59
<u>Figura 6.3.1.</u> Repertorio conductual del ratón	61

<u>Figura 6.3.2.1.</u> Seriado de cortes y organización del tejido	65
<u>Figura 6.3.2.2.</u> Representación rostro-caudal de la corteza prelímbica e infralímbica	68
<u>Figura 6.3.2.3.</u> Representación rostro-caudal de la corteza cingulada y del septum lateral dorsal y ventral	68
<u>Figura 6.3.2.4.</u> Representación rostro-caudal de los núcleos hipotalámicos paraventricular y anterior	69
<u>Figura 6.3.2.5.</u> Representación rostro-caudal de la amígdala basolateral y medial, y del núcleo hipotalámico ventromedial	69
<u>Figura 6.3.2.6.</u> Representación rostro-caudal del área tegmental ventral y de la sustancia gris periacueductal	69
<u>Figura 6.3.2.7.</u> Representación rostro-caudal de la sustancia gris periacueductal lateral y dorsolateral	70
<u>Tabla 6.2.1.</u> Fármacos	59

## 7. RESULTADOS

<u>Figura 7.1.1.</u> Diseño experimento 1	73
<u>Figura 7.1.2.</u> Medianas de tiempo en segundos para la categoría de exploración no social con JNJ16259685	74
<u>Figura 7.1.3.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con JNJ16259685	75
<u>Figura 7.2.1.</u> Diseño experimento 2	78
<u>Figura 7.2.2.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con AMN082	79
<u>Figura 7.2.3.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de exploración no social y exploración a distancia con AMN082	80
<u>Figura 7.3.1.</u> Diseño experimento 3	83
<u>Figura 7.3.2.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con (S)-3,4-DCPG	84
<u>Figura 7.4.1.</u> Diseño experimento 4	87
<u>Figura 7.4.2.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con (RS)-3,4-DCPG	88

<u>Figura 7.5.1.</u> Diseño experimento 5	90
<u>Figura 7.5.2.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con LY354740	91
<u>Figura 7.5.3.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de investigación social con LY354740.	92
<u>Figura 7.6.1.</u> Diseño experimental con JNJI6259685 agudo y subcrónico.	95
<u>Figura 7.6.2.</u> Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con JNJI6259685 agudo y subcrónico.	97
<u>Figura 7.6.3.</u> Medianas del número de núcleos inmunorreactivos c-Fos para las distintas estructuras cerebrales comparando los vehículos del grupo aislado con prueba conductual vs los vehículos que permanecieron agrupados.	98
<u>Figura 7.6.4.</u> Microfotografías que representan la activación c-Fos para las distintas estructuras cerebrales comparando los vehículos del grupo aislado con prueba conductual vs los vehículos que permanecieron agrupados.	99
<u>Figura 7.6.5.a.</u> Medianas del número de núcleos inmunorreactivo c-Fos y microfotografías que representan la activación c-Fos comparando el grupo vehículo con las dosis intermedias, aguda y subcrónica, para la corteza cingulada (a.1) y para el núcleo hipotalámico anterior (a.2) en los animales con experiencia agonística.	104
<u>Figura 7.6.5.a.</u> Medianas del número de núcleos inmunorreactivo c-Fos y microfotografías que representan la activación c-Fos comparando el grupo vehículo con las dosis intermedias, aguda y subcrónica, para la sustancia gris periacueductal (a.3) en los animales con experiencia agonística.	105
<u>Figura 7.6.5.b.</u> Medianas del número de núcleos inmunorreactivo c-Fos y microfotografías que representan la activación c-Fos comparando el grupo vehículo con las dosis intermedias, aguda y subcrónica, para el núcleo hipotalámico paraventricular (b.1) en los animales que parmenieron agrupados	105
<u>Tabla 7.1.1.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con JNJI6259685 (0.125-8 mg/kg)	74
<u>Tabla 7.2.1.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con AMN082 (0.5-4 mg/kg)	79
<u>Tabla 7.3.1.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con (S)-3,4-DCPG (2.5-10 mg/kg)	83

<u>Tabla 7.4.1.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con (RS)-3,4-DCPG (5-20 mg/kg)	87
<u>Tabla 7.5.1.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con LY354740 (4-16 mg/kg)	91
<u>Tabla 7.6.1.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo y subcrónico con JNJI6259685 (0.25- 1 mg/kg)	97
<u>Tabla 7.6.2.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes estructuras cerebrales en animales con prueba conductual que reciben tratamiento agudo y subcrónico con JNJI6259685 (0.25-1 mg/kg)	102
<u>Tabla 7.6.3.</u> Cálculo de medianas del tiempo distribuidos en las diferentes estructuras cerebrales en animales que permanecieron agrupados con tratamiento agudo y subcrónico con JNJI6259685 (0.25-1 mg/kg)	103

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

<u>Tabla 8.1.</u> Resultados principales de conducta obtenidos en nuestra investigación	III
---	-----

---

# I. INTRODUCCIÓN

---

La agresión humana y la violencia son, desafortunadamente, un fenómeno ubicuo con un coste sustancial para nuestra sociedad. Sus efectos devastadores están documentados a diario en los medios de comunicación. Estas conductas no está restringida a la sociedad humana, sino que también se observa en numerosas especies animales, resultando por tanto muy útiles los modelos animales para su investigación (Nataranjan y Caramaschi, 2010).

El concepto de agresión procede del latín “agredi”, una de cuyas acepciones, similar a la empleada en la actualidad, connota “ir contra alguien con la intención de producirle daño”. Su significado y las categorías conductuales que engloba dependen en gran medida de la disciplina que la estudia. En el campo de la psicofarmacología podemos citar la definición elaborada por Brain en 1977: “una conducta puede ser inequívocamente llamada agresión cuando un estímulo potencialmente dañino (físico o psicológico) es dirigido hacia un individuo u objeto con evidencia de intención, activación emocional y reacción aversiva del sujeto u objeto de ataque” (Brain, 1981).

La conducta agresiva en los roedores puede ser clasificada como “ofensiva” o “defensiva” basada en los antecedentes distales y proximales que la precipitan, la topografía de la conducta y sus consecuencias. La conducta ofensiva se observa fundamentalmente en las interacciones entre machos, y la mayoría de la investigación genética y neurobiología de la agresión estudia esta conducta ofensiva (Takahashi y Miczek, 2014). En estos animales, la agresión ofensiva entre congéneres está organizada en forma de rituales, compuesta por amenazas laterales, persecuciones, golpeteo de la cola (sobre todo en los ratones), posturas verticales defensivas y ataques con mordiscos (Miczek y O’Donnell, 1978). El ataque se dirige normalmente hacia zonas poco vulnerables del oponente, como puede ser la espalda o el costado (Blanchard y Blanchard, 1977; Blanchard, O’Donnell y Blanchard, 1979). En este sentido, los modelos clásicos de laboratorio son excelentes para entender los mecanismos neurobiológicos y moleculares que median esta conducta agonística (Haller y Kruk, 2006; Meer y Raber, 2005). El término agonístico engloba todo el repertorio de las conductas ofensivas y defensivas que exhibe el animal en el desarrollo del encuentro agresivo (Olivier y Young, 2002).

Una de las principales tareas de la psicofarmacología consiste en comprender los procesos que permiten que las complejas interacciones moleculares se traduzcan en conductas. Asimismo, resulta muy interesante el estudio de los factores que pueden influir en tales efectos, sin olvidar la relevancia de investigar en nuevos compuestos que puedan mostrar efectos antiagresivos



específicos. En este sentido, el enfoque neuroquímico y psicofarmacológico permite profundizar en los mecanismos biológicos que participan en el control de los distintos tipos de conducta agresiva, y en el tratamiento de sus posibles alteraciones patológicas.

Las investigaciones sobre la neuroquímica de la conducta agresiva se han centrado en el papel que juegan distintas sustancias bioquímicas neuroreguladoras: las hormonas (Haller, 2014; Ramirez, 2006) y los neurotransmisores. Así, numerosos sistemas de neurotransmisión, que incluye serotonina (5-HT), dopamina (DA), ácido gamma-aminobutírico (GABA) y norepinefrina (NE), así como el óxido nítrico (ON) están implicados en la modulación de la agresión (de Almeida et al, 2005; Bedrosian y Nelson, 2014; Chiavegatto y Nelson, 2003; Comai et al., 2012; Ferrari et al, 2005; Miczek y Hanney, 1994; Miczek, Faccidomo, Fish y DeBold., 2007; Olivier y van Oorschot, 2005; Seo et al., 2008; Takahashi y Miczek, 2014; Swann, 2003). Igualmente, la monoaminooxidasa A (MAO-A) está implicada en la regulación de la conducta agresiva (Dorfman, Meyer-Linderberg y Buckholtz, 2014; Martín-López et al., 2008). Por el contrario, es poco lo que se conoce sobre la relación entre el sistema glutamatérgico y la agresión, centrándose los escasos estudios existentes en el estudio del papel de sus receptores ionotrópicos en la modulación de estas conductas.

Por otra parte, es especialmente interesante conocer cuáles son los circuitos neuronales que están involucrados en la conducta agresiva. En este sentido, distintas investigaciones se han centrado en medir la actividad c-Fos de neuronas localizadas en áreas relacionadas con la agresión, demostrándose la implicación de diversas áreas cerebrales en la conducta agresiva: corteza prefrontal (PFC); septum lateral (LS); lecho de la estría terminal (BNST); área preóptica medial (MPOA); algunos núcleos hipotalámicos incluyendo el núcleo hipotalámico anterior (AH), hipotálamo ventromedial (VMH), e hipotálamo lateral (LH); núcleo paraventricular (PVH); amígdala central y medial (CeA y MeA, respectivamente); sustancia gris periacueductal (PAG); núcleo dorsal de rafe (DRN); y locus coeruleus (LC). Aunque existe cierto solapamiento entre las áreas cerebrales que están involucradas en los diferentes tipos de agresión, las regiones activadas tras la agresión entre machos son: PFC, LS, BNST, MPOA, PVN, áreas hipotalámicas de ataque (HAA), amígdala, PAG, DRN y LC (Takahashi y Mizcek, 2014).

La presente Tesis Doctoral se plantea como objetivo general analizar el rol de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) en la regulación de la conducta agresiva en ratones machos, empleando para ello el modelo de agresión inducida por aislamiento.

Este trabajo se divide en dos partes. En la primera se realiza una revisión teórica del neurotransmisor glutamato, describiendo las distintas familias de receptores sobre los que actúa; a continuación se hace un breve repaso a la neurobiología de la agresión, y terminamos este bloque teórico centrándonos en los estudios que han investigado la relación entre el glutamato y la agresión.

En la segunda parte se expone el trabajo experimental, que comienza con el planteamiento experimental, para pasar a describir el procedimiento y materiales empleados; a continuación se exponen los seis experimentos realizados (los cinco primeros con la administración aguda de un ligando de los receptores mGlu, y el sexto y último evaluando el efecto de la administración subcrónica del compuesto JNJ16259685, tanto sobre la conducta agresiva como sobre la actividad c-Fos cerebral). Finalmente, se presenta una discusión general de los resultados, seguida de las principales conclusiones extraídas en la presente Tesis Doctoral.

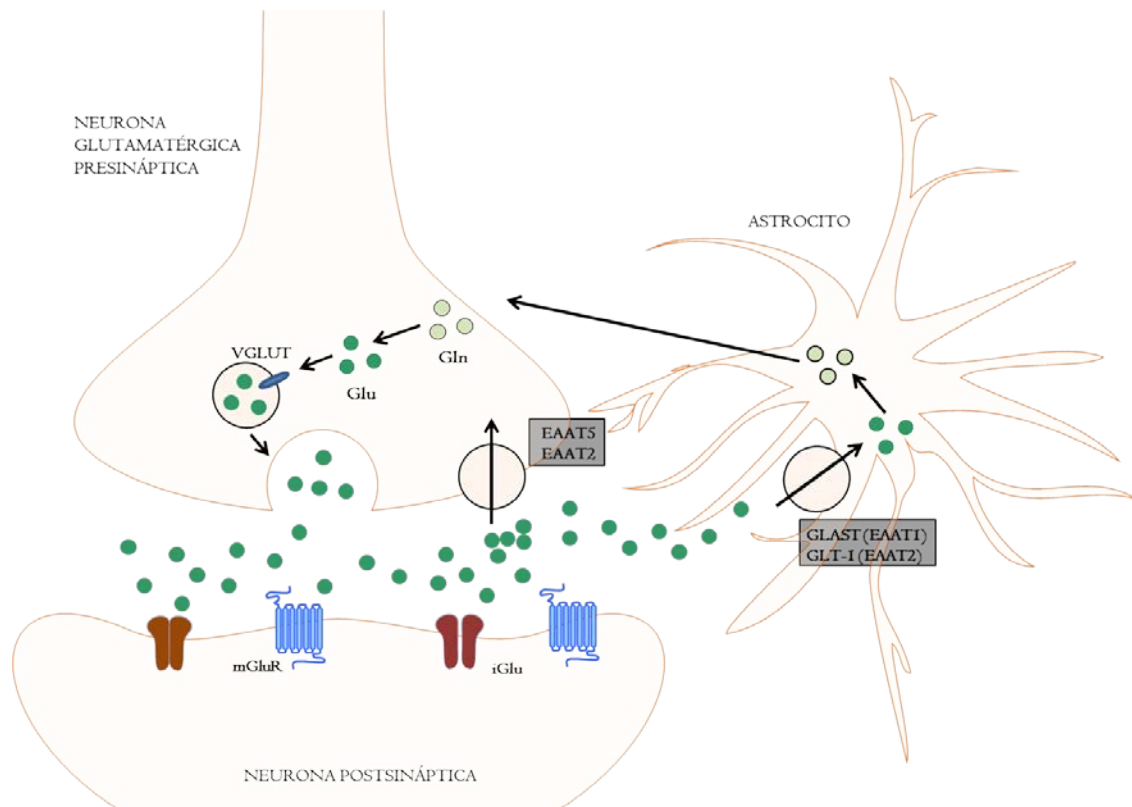
---

## 2. GLUTAMATO Y RECEPTORES

---

Los efectos del glutamato sobre el sistema nervioso central son conocidos hace más de 75 años. No obstante, debido a que se encuentra presente en altas concentraciones y está distribuido relativamente de manera uniforme entre las diferentes áreas del cerebro, pasó mucho tiempo hasta que fue aceptado como neurotransmisor (Fonnum, 1984). Por tanto, el glutamato no es solo un neurotransmisor, sino que está involucrado en numerosas funciones metabólicas en el cerebro. Su metabolismo es complicado e implica tanto a neuronas como a células gliales (Broman et al., 2000; Niciu et al., 2012).

Se puede decir que el glutamato es un metabolito crucial (Nedergaard et al., 2002). Entre otros, el glutamato transportado por los EAATs -transportadores de aminoácidos excitatorios- que se encuentran en neuronas postsinápticas GABAérgicas sirve posteriormente como precursor para la síntesis de GABA (Mathews y Daymond, 2003; Niciu et al., 2012). Media su acción a través de la activación de numerosos receptores ionotrópicos y metabotrópicos, y teniendo en cuenta su amplio abanico de funciones, parece que el glutamato debe ser cuidadosamente regulado, ya que niveles bajos puede llevar a una interrupción de la señalización, mientras que una cantidad excesiva puede iniciar un proceso de excitotoxicidad. Es dentro de este marco donde la atención se ha focalizado en la recaptación del glutamato mediado por transportadores (Bridges y Esslinger, 2005; Divito y Underhill, 2014; Vandenberg y Ryan, 2013). Así, los transportadores de glutamato dependientes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) están localizados en la membrana plasmática de las neuronas y células gliales y finalizan la acción del glutamato manteniendo su concentración extracelular por debajo de niveles excitotóxicos. Como mínimo se han identificado cinco subtipos (EAAT1-5), cada uno de los cuales muestran una distribución y farmacología distintas (Jensen, Fahlke, Bjørn-Yoshimoto y Bunch, 2015; O'Shea, 2002). Igualmente se han identificado tres transportadores vesiculares (VGLUT1-3) que son los encargados del almacenamiento de Glu en las vesículas mediante un sistema de captación que depende del gradiente electroquímico de protones (Takamori, 2006). La liberación sináptica regulada por exocitosis requiere la acumulación del neurotransmisor dentro de las vesículas secretoras aunque los mecanismos por los que los transportadores vesiculares facilitan la liberación no están claros (El Mestikawy et al., 2011; Fremeau, Voglmaier, Seal y Edwards, 2004; Reimer et al., 2001; Shigeri et al., 2004). La mayor parte de glutamato es liberado sinápticamente y viaja a través del ciclo glutamato-glutamina antes de ser recaptado en las vesículas sinápticas (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Ciclo glutamina-glutamato. La glutamina (Gln) es convertida en glutamato (Glu) por la enzima glutaminasa. Glu es almacenado dentro de las vesículas presinápticas mediante los transportadores vesiculares glutamatérgicos (VGLUT) y es liberado sinápticamente de una manera dependiente de voltaje a través de las proteínas SNARE. Así, el glutamato liberado es reciclado desde el espacio extracelular por los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs) expresados fundamentalmente en la astroglia. En los astrocitos el Glu es convertido en Gln por la glutamina sintetasa y es exportado extracelularmente para ser recaptado de nuevo por las neuronas (Adaptado de Niciu et al., 2012).

Así pues, casi todo el ácido L-glutámico libre del cerebro proviene de la síntesis de L-glutamina y está intermediado por el ciclo de Krebs. Prácticamente todo el glutamato del cerebro es sintetizado por la transaminación de  $\alpha$ -ketoglutarato tanto en la neurona como en la glía. En las células gliales el glutamato es convertido en glutamina a partir de la enzima glutamina sintetasa, antes de ser liberado al espacio extracelular. La glutamina es recaptada por las neuronas y convertida en glutamato a través de la acción de la enzima glutaminasa activada por fosfato antes de ser almacenado en las vesículas sinápticas mediante los VGLUTs. Después el glutamato es reciclado tras la recaptación y conversión en glutamina por los astrocitos (Márquez et al., 2013; Nedergaard et al., 2002; Tapiero et al., 2002). Por otro lado, tiene lugar la denominada sinápsis tripartita (Wieronska y Pilc, 2009). Esta sinápsis está compuesta por tres elementos que interactúan recíprocamente: el terminal presináptico, la membrana postsináptica y el astrocito, (que envuelve la hendidura sináptica), los cuales regulan la eficacia sináptica y plasticidad. De este modo, el nivel basal de glutamato, que es liberado tanto por el elemento presináptico como por el

astrocito, está presente en la hendidura sináptica. La liberación de glutamato lleva a la activación de los receptores postsinápticos. Al mismo tiempo, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) de la glía son activados causando una elevación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y en consecuencia exocitosis de glutamato vesicular. El exceso de glutamato liberado por los astrocitos activa tanto la región postsináptica como la presináptica. La activación presináptica de los mGluR da lugar a la inhibición de la liberación de glutamato. Además, los niveles basales de glutamato de la hendidura sináptica son mantenidos a través de la recaptación mediadas por la glia y/o los EATTs.

En resumen, el L-Glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios del sistema nervioso central (SNC). Actúa a través de dos tipos de receptores, que están localizados en la mayoría de las neuronas del cerebro, y también la glia. Estos dos grupos de receptores son: 1- los receptores iónotrópicos de glutamato (iGluR), que son canales iónicos y su activación incrementa el influjo de iones dando lugar a la neurotransmisión sináptica rápida, y 2- los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), que están acoplados a proteínas G y ejercen un papel modulador en el sistema nervioso central (Kew y Kemp, 2005). Así, el glutamato actúa como mediador de las transmisiones sinápticas y de los cambios duraderos en la eficacia sináptica, clave para los procesos de aprendizaje y memoria, además de intervenir en numerosos procesos fisiológicos durante la formación del SNC (Luján-Miras, 2005). Por otro lado, también puede formar parte de procesos excitotóxicos (Meldrum, 2000). De modo que juega un papel importante en patologías de diferentes trastornos psiquiátricos y neurológicos, especialmente cuando existe un desequilibrio de transmisión glutamatérgica (Bleich et al., 2003). Además, se ha demostrado que sus receptores se encuentran ampliamente expresados en otros tejidos que tradicionalmente no se habían asociado con la señalización mediada por glutamato, por ejemplo en huesos, páncreas y glándulas pituitarias, adrenales y pineales (Hinoi et al., 2004).

## 2.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Se conocen tres tipos de receptores ionotrópicos. (iGluR). Fueron caracterizados después de que identificaran los agonistas que los activaban selectivamente (Kew y Kemp, 2005; Oswald, Ahmed, Fenwick y Loh, 2007). Así, tenemos los receptores NMDA (ácido N-metil D-aspartato), los receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y los receptores kainato (ácido 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina). Los receptores iGlu forman un canal catiónico que permite el paso selectivo de iones  $\text{Na}^+$ , potasio ( $\text{K}^+$ ) o  $\text{Ca}^{2+}$ ,

produciendo una despolarización de la neurona (Dingledine et al., 1999). A pesar de las diferencias que existen entre los grupos, como por ejemplo que sólo comparten un 20-30% de idénticas subunidades de aminoácidos, tienen características estructurales comunes (Figura 2.1.1). De esta forma, son complejos macromoleculares que constan de un dominio extracelular amino terminal y cuatro dominios membranales (MI, M2, M3 y M4) que dan paso a un dominio intracelular carboxilo terminal. Los segmentos 1, 3 y 4 son transmembranales (TMI, TMIII, TMIV) mientras que el 2 (MII) no llega a traspasar la membrana sino que forma una especie de horquilla, una reentrada desde y hasta el citoplasma. El sitio de unión del agonista está localizado entre la región extracelular amino terminal y el bucle extracelular que forman los segmentos TMIII y TMIV (Ozawa et al., 1998).

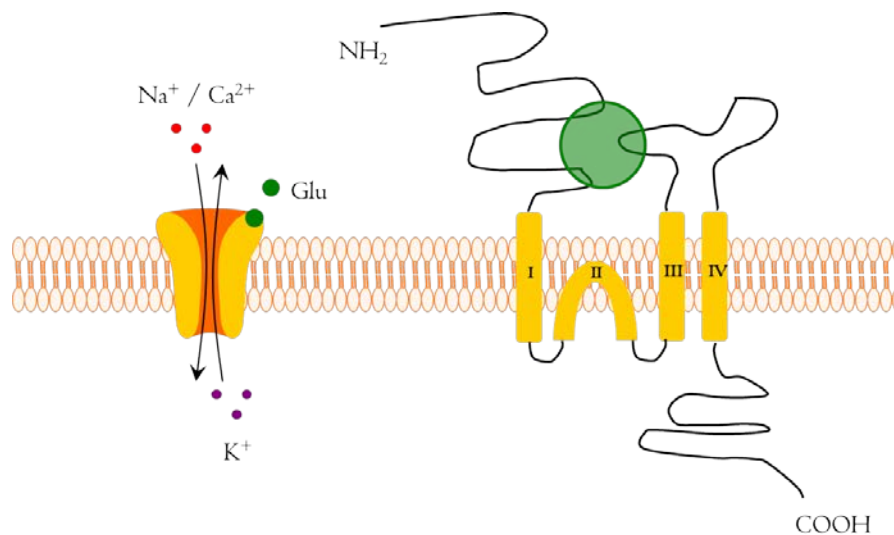


Figura 2.1.1. Representación esquemática de los receptores ionotrópicos de glutamato.

Los receptores NMDA están constituidos por siete subunidades: GluN1, GluN2A-D y GluN3A-B (referidos anteriormente como NR1, NR2A-D y NR3A-B). Son heterotetrámeros y su funcionalidad parece que depende de la combinación GluN1/GluN2 o bien GluN1/GluN2/GluN3 (Vyklícky et al., 2014). De este modo, las subunidades GluN3 no tienen ninguna función cuando se expresa sólo con el GluN1 o sólo con el GluN2. En cambio, cuando se expresa con ambos a la vez, suprimen la conductancia del canal de NMDA y la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ . Puesto que los receptores son exclusivamente canales iónicos controlados por ligando, se necesitan dos co-agonistas en los sitios de unión de la glicina y el glutamato (Henneberger et al., 2013). Estudios electrofisiológicos han evidenciado que la activación del receptor NMDA requiere como mínimo la ocupación de dos sitios de unión independientes de glicina y dos independientes de glutamato, localizados en el GluN1 y GluN2, respectivamente. En los

receptores que contengan las tres subunidades, probablemente el GluN3 sustituirá a uno de GluN2. Existen numerosos compuestos que pueden inhibir, activar o aumentar la función de este receptor (Santangelo et al., 2012). En cuanto a los agonistas, a modo de ejemplo podemos citar, con respecto a los que ejercen su acción sobre los sitios de unión del glutamato, el NMDA mismo, el L-Aspartato o el quinolinato. Para los sitios de unión de la glicina tenemos la D-Serina; pero cualquier derivado de la glicina sería igualmente válido. Con respecto a los antagonistas, se han sintetizado un gran número de ellos. Los que reconocen el sitio del glutamato constan conformacionalmente de ácidos alfa-amino carboxílicos y un grupo ácido omega-fosfórico como el D-AP5 y el CGS 19755. Para el sitio de reconocimiento de la glicina, la mayoría son derivados del ácido kinurénico (MDL-105) o de la pirrodilona (HA-966) aunque éstos últimos tienen unos niveles más moderados de selectividad. Finalmente, también existen moduladores alostéricos positivos. Los primeros que se describieron fueron las poliaminas, espermita y espermidina. Parece que actúan a través de dos mecanismos: uno dependiente de glicina, aumentando la afinidad del receptor para la glicina, y otro independiente de glicina que se mantiene en concentraciones saturadas de glicina y solo está presente en los receptores que contienen la subunidades NR2B. El magnesio ( $Mg^{2+}$ ) mimetiza todos los efectos potenciadores de la poliaminas y debe ser un ligando endógeno. Otro potenciador de los receptores NMDA, que actúan a través de diferentes mecanismos, es el neuroesteroide endógeno sulfato de pregnenolona (Vyklícky et al., 2014). Por último, indicar que los receptores NMDA han sido implicados en numerosas enfermedades del SNC, como isquemia cerebral, trastornos neurodegenerativos, dolor, depresión y esquizofrenia, así como psicosis inducida por sustancias, entre otros (Lakhan et al., 2013; Zhou y Sheng, 2013).

Por su parte, los receptores AMPA están compuestos por una familia de cuatro subunidades, GluA1-4 (nombrados anteriormente como GluRI-4). Al igual que los receptores NMDA, probablemente tengan una composición heteromérica. La subunidad GluA2 juega un papel importante en la determinación de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  de modo que los receptores que no contengan esta subunidad son permeables al  $Ca^{2+}$ . La arginina es la responsable de conferir la impermeabilidad al calcio (Bowie, 2012). Además, existen dos diferentes conformaciones espaciales llamadas Flip y Flop, lo que aumenta su complejidad (Kew y Kemp, 2005). Los receptores AMPA han sido fundamentalmente involucrados en la regulación del tráfico intracelular que media la plasticidad sináptica (Anggono y Huganir, 2012).



Y, por último, los receptores Kainato (KARs), compuestos por las subunidades: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 y GluK5 (anteriormente conocidos como GluR5-7 y KAI-2, respectivamente). Una vez más, es posible que los receptores nativos sean probablemente combinaciones tetraméricas, probablemente tanto heteroméricas como homoméricas (Lerma y Marques, 2013). No obstante, los estudios obtenidos a través del uso de agonistas y antagonistas no terminan de aclarar la composición de estos receptores, así como tampoco los estudios con ratones “knockout” han resuelto completamente esta cuestión (Kew y Kemp, 2005; Lerma y Marques, 2013; Oswald et al., 2007).

Los iGluR son los más abundantes de todo el sistema nervioso central de los mamíferos (Ozawa, Kayima y Tsuzuki, 1998). En concreto, los receptores NMDA se localizan predominantemente en el prosencéfalo, como la corteza y el hipocampo. Los niveles más altos se aprecian en la región CA1 del hipocampo. También se encuentran en el mesencéfalo, cerebelo y médula espinal. Los receptores AMPA se encuentran principalmente en las células piramidales del hipocampo y giro dentado, corteza cerebral y cerebelo. Y, por último, los receptores Kainato, aparecen más intensamente en la región CA3 del hipocampo y estrato granular del cerebelo y también en la médula espinal.

## 2.2. RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Los mGluR pertenecen a la súper-familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Son proteínas integrales de membrana formadas por una única cadena polipeptídica. Su topología incluye un dominio amino terminal extracelular bilobulado (VFD, del inglés *Venus Flytrap Domain*), tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares y una porción carboxilo terminal citoplasmática, separados por siete regiones altamente hidrofóbicas, que se piensan que sirven para cruzar la barrera lipídica (véase figura 2.2.1). La porción amino terminal contiene el sitio de unión del glutamato mientras que el dominio intracelular interactúa físicamente con las proteínas G para iniciar los mecanismos de transducción. Los cambios conformacionales inducidos por los ligandos son propagados desde el VFD hacia el carboxilo terminal a través de dominios ricos en cisteína, activándose de este modo las subunidades de la proteína G las cuales modulan diferentes moléculas efectoras tales como enzimas, canales iónicos y factores de transcripción (Nicoletti et al., 2011; Niswender y Conn, 2010).

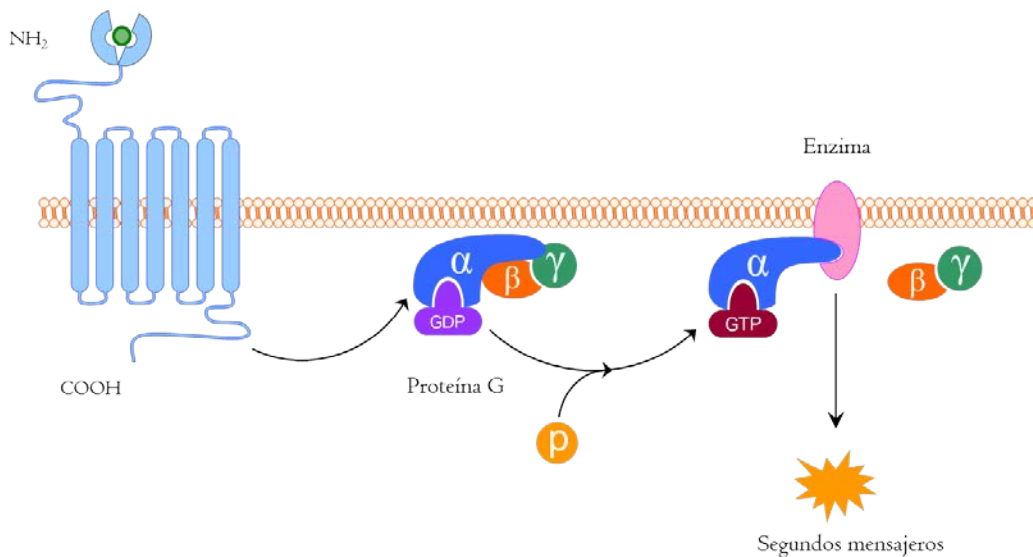


Figura 2.2.I. Representación esquemática de los receptores metabotrópicos de glutamato.

Se han descrito ocho subtipos de receptores metabotrópicos del glutamato (mGluI-8), divididos en tres grupos diferenciados en base a su homología en la secuencia de aminoácidos, los mecanismos de transducción de señales, al sistema de segundos mensajeros al que se acoplan y a su farmacología (Byrnes, Loane y Faden, 2009; Ferraguti y Shigemoto, 2006; Ferraguti, Cripaldi y Nicoletti, 2008; Kew y Kemp, 2003; Luján-Miras, 2005; Niciu et al., 2012; Nicoletti et al., 2011; Niswender y Conn, 2010). Así, tenemos los receptores metabotrópicos del grupo I, que incluiría a los receptores mGluI y mGlu5, los cuales se acoplan a proteínas Gq y estimulan la fosfolipasa C (PLC), enzima que da lugar a la formación de segundos mensajeros intracelulares como el inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  libera calcio ( $Ca^{2+}$ ) de las reservas intracelulares, mientras que el DAG (junto con el  $Ca^{2+}$  liberado) activa la proteína kinasa C (PKC). En segundo lugar, tenemos los receptores del grupo II que está formado por los receptores mGlu2 y mGlu3; y, por último, los receptores del grupo III, en el que estarían incluidos los receptores mGlu4, 6, 7 y 8. Estos dos últimos grupos se acoplan a proteínas Gi/Go e inhiben la adenilil ciclasa (AC)/proteína kinasa A (PKA), dando lugar a una disminución de la formación de AMP cíclico (Figura 2.2.2). Los receptores del grupo I se localizan fundamentalmente a nivel postsináptico, y su activación lleva a la despolarización de la célula e incrementa la excitabilidad neuronal, mientras que los receptores de los grupos II/III son generalmente presinápticos, y su activación reduce la liberación de glutamato. Esto ocurre en sinapsis excitatorias (glutamatérgicas), inhibitorias (GABAérgicas) y neuromoduladoras (p. ej. monoaminas, acetilcolina, péptidos) (Gregory, Dong, Meiler y Conn, 2011).

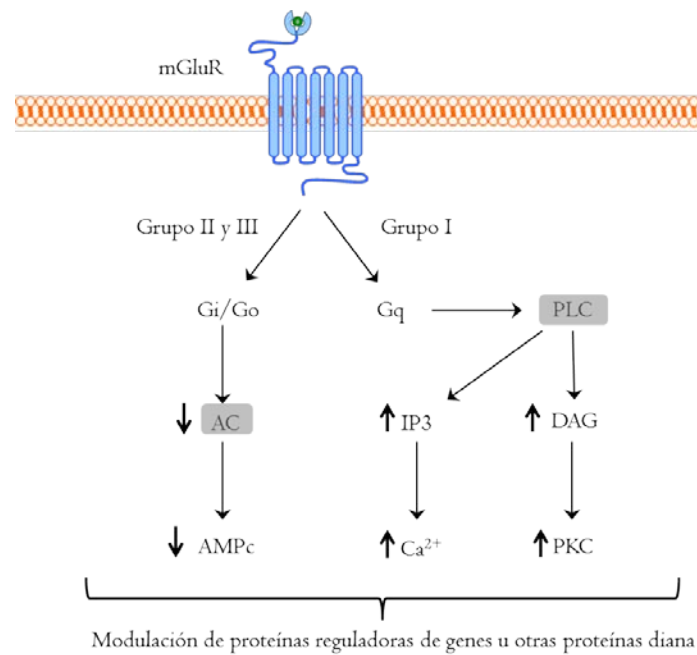


Figura 2.2.2. Representación esquemática de las vías de transducción de señales de los mGluR.

Numerosos estudios utilizando técnicas histoquímicas de hibridación “in situ”, así como técnicas inmunohistoquímicas han evidenciado distintos patrones de distribución del ARN, y de inmunoreactividad para los ocho subtipos de receptores mGlu en el sistema nervioso central de mamíferos, especialmente en ratas y ratones (Shigemoto y Mizuno, 2000; Schoepp, 2001; Lavreysen, Nóbrega, Leysen, Langlois y Lesage, 2004a; Gu et al., 2008; Nicoletti et al., 2011). Cada subtipo de receptor exhibe un patrón de expresión definido en diversas regiones cerebrales (Tabla 2.2.1). En las neuronas, los receptores del grupo I se localizan mayoritariamente en cuerpos celulares, troncos y espinas dendríticas. Su rasgo más característico es que se encuentran fuera de la densidad postsináptica, concretamente en los bordes de las sinapsis glutamatérgicas, la denominada localización perisináptica. Los receptores del grupo II están muy difundidos por todo el SNC. En concreto, los receptores mGlu2 se localizan en la región preterminal de los axones, alejados de la zona activa de la liberación de los neurotransmisores. Mientras que los receptores mGlu3 aparecen en lugares presinápticos y postsinápticos. Por último, los receptores del grupo III se encuentran fundamentalmente a nivel presináptico. Asimismo, se han localizado receptores mGlu en células gliales (fundamentalmente los receptores mGlu3 y mGlu5), donde su activación ejerce una variedad de efectos que pueden ser cruciales para la interacción neurona-glia bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Bradley y Challis, 2012; D’Antoni et al., 2008; Nicoletti et al., 2011). Por otro lado, la función de los receptores mGlu no se circunscribe a la regulación de la transmisión sináptica. De hecho, estos receptores se expresan en una amplia

diversidad de células periféricas, incluyendo hepatocitos, células pancreáticas, osteoblastos y células del sistema inmunitario (Nicoletti et al., 2007).

Estudios utilizando técnicas histoquímicas y de autorradiografía han evidenciado una extensa distribución a lo largo del SNC del ARNm e inmunorreactividad para los receptores mGlu1, mGlu5, mGlu3 y mGlu7, mientras que para los receptores mGlu2, mGlu4 y mGlu8 se encuentra más restringida a regiones cerebrales específicas (Ferraguti y Shigemoto, 2006; Gu et al., 2008; Lavreysen et al., 2004a; Mercier y Lodge, 2014; Nicoletti et al., 2011; Schoepp, 2001; Shigemoto y Mizuno, 2000; Wright et al., 2013). En concreto, los receptores mGlu1 se expresan más intensamente en las células de Purkinje de la corteza cerebelosa, células mitrales del bulbo olfativo, células granulares del giro dentado, neuronas piramidales de CA3, neocorteza, así como en neuronas del septum lateral, globo pálido, núcleo entopeduncular, pálido ventral, núcleo preóptico magnocelular, sustancia negra, núcleo coclear dorsal, sustancia gris periacueductal, amígdala, tálamo (exceptuando el núcleo reticular) y algunos núcleos hipotalámicos (área lateral, supraóptico y paraventricular). Por su parte, los receptores mGlu5 exhiben también una extensa distribución cerebral, con una mayor expresión en regiones telencefálicas, incluyendo la corteza cerebral, hipocampo, subículo, bulbo olfatorio, estriado, accumbens, núcleo septal lateral y amígdala. El ARNm para los receptores mGlu2 se distribuye en regiones más limitadas del SNC, en comparación con los receptores mGlu1, mGlu5 y mGlu3, con una elevada expresión en los cuerpos celulares de la mayoría de las estructuras del sistema límbico del prosencéfalo (incluyendo algunos núcleos talámicos, giro dentado del hipocampo, núcleo mamilar medial y amígdala), así como en las células Golgi de la corteza cerebelosa y el bulbo olfatorio. Aunque existe cierto solapamiento, como en el hipocampo y en la amígdala, la expresión del ARNm para los receptores mGlu3 parece estar más dispersa. Por otro lado, la expresión de los receptores mGlu4 es más intensa en las células granulares de la corteza cerebelosa, estructuras olfatorias, corteza entorrinal, septum lateral, núcleos talámicos, núcleo mamilar lateral y motoneuronas espinales. El ARNm de los receptores mGlu6 se restringe a la retina, sin aparente expresión en otras regiones cerebrales. Los receptores mGlu7 tienen su expresión más prominente en bulbos olfativos, neocorteza, hipocampo, estriado, accumbens, claustró, amígdala, región preóptica, hipotálamo, células Purkinje de la corteza cerebelosa, numerosas estructuras de la parte inferior del troncoencéfalo y asta dorsal de la médula espinal. Por último, los receptores mGlu8 se expresan de manera más restringida, en comparación con los receptores mGlu4 o mGlu7, especialmente en bulbos olfativos, corteza piriforme y entorrinal, núcleos pontinos y núcleo reticular lateral del bulbo raquídeo (Tabla 2.2.I).

Tabla 2.2.I. Distribución de los mGluR.

		Grupo I		Grupo II		Grupo III		
		mGlu1	mGlu5	mGlu2	mGlu3	mGlu4	mGlu7	mGlu8
Localización neuronal	Presináptica			x	x	x	x	x
	Postsináptica	x	x	x	x			
Localización en el SNC	Bulbo olfatorio	x	x	x			x	x
	Neocorteza	x	x		x		x	
	Corteza límbica		x		x	x		x
	Hipocampo	x	x	x	x		x	
	Núcleos septales	x	x			x		
	Área preóptica medial						x	
	Amígdala	x	x	x	x		x	
	Ganglios basales	x	x				x	
	Tálamo	x			x			x
	Hipotálamo	x		x	x	x	x	
	Telencéfalo	x					x	x
	Corteza cerebelosa	x		x	x	x	x	
Espina dorsal		x			x	x		

La activación de los receptores mGlu induce una amplia variedad de cambios en la fisiología neuronal (Luján y Miras, 2005). En primer lugar, existen evidencias que sugieren la participación de los mGluR del grupo I en el incremento de la excitabilidad neuronal en varias áreas del SNC. Esto se debe a la modulación de la actividad de varios canales iónicos dependientes e independientes de voltaje (canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$ ) ejercida por los mGluR, dando como resultado una despolarización de la membrana, un incremento de la resistencia o una reducción en la frecuencia de disparo. Además de estos efectos excitadores sobre las membranas neuronales, existen estudios que indican efectos inhibitorios. Estos efectos hiperpolarizantes se han observado en las células de Purkinje del cerebelo y son producidos por la modulación de los canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes  $\text{Ca}^{2+}$ . Aunque se desconoce el papel fisiológico, cabría pensar que dicho efecto podría prevenir un exceso de excitación por parte de las células de Purkinje, lo que las protegería frente a un proceso de excitotoxicidad. En segundo lugar, uno de los efectos fisiológicos mejor caracterizados de los agonistas de los mGluR es la reducción de la neurotransmisión de las sinapsis glutamatérgicas. Este efecto está mediado por los mGluR presinápticos que actúan como autorreceptores reduciendo la liberación de glutamato. Los receptores que participan en este proceso son los del grupo II y III, mientras que la participación del grupo I sólo se ha podido observar en el hipocampo. Aunque aún no se conoce con detalle el mecanismo por el cual la activación de los receptores de los mGluR reduce la liberación de glutamato de los terminales presinápticos, es probable que ello se deba a una inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Bajo ciertas condiciones, la activación de los mGluR

también puede incrementar la liberación de glutamato. Por otro lado, los mGluR presinápticos también reducen la liberación de GABA y la transmisión sináptica inhibitora en varias regiones del SNC. Los subtipos de los tres grupos pueden actuar como heterorreceptores en terminales gabérgicos. Así, los del grupo I inhiben la liberación de GABA en el hipocampo, mientras que los del grupo II y III lo hacen en todo el SNC. Además de regular la liberación de glutamato y GABA, los mGluR pueden regular la transmisión excitadora e inhibitora modulando las corrientes producidas por receptores ionotrópicos de glutamato y GABA. A diferencia de la regulación en la liberación de neurotransmisor, la modulación de receptores ionotrópicos mediada por mGluR permite un control selectivo de componentes específicos de los potenciales sinápticos. En tercer lugar, la activación de los mGluR regula la eficacia sináptica. Así, la potenciación a largo plazo (LTP) se ha estudiado extensamente en el hipocampo donde su inducción requiere la coactivación de los receptores NMDA y mGlu del grupo I. En este caso, la activación de los mGluR modula las respuestas mediadas por los receptores NMDA, potencia la respuesta de los receptores AMPA y reorganiza su localización en las sinapsis. Por su parte, la depresión a largo (LTD) plazo se ha estudiado ampliamente en el cerebelo. En cuarto y último lugar, se sabe que los mGluR participan activamente en los procesos de liberación de calcio y en la excitabilidad neuronal que tienen lugar durante el desarrollo.

Finalmente, la diversidad molecular de receptores mGlu se traduce en una variada implicación funcional (Yin y Niswender, 2014). Así, por ejemplo, estudios preclínicos indican que los agonistas de los receptores mGlu2/3 y los antagonistas mGlu5 podrían ser de utilidad para el tratamiento de trastornos de ansiedad y por abuso de drogas, mientras que los agonistas mGlu2/3, además, parecen ser eficaces en modelos de psicosis. Igualmente, es interesante señalar que diversos ligandos de los receptores mGlu5 podrían mejorar la cognición y ser de utilidad en el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia, mientras que los antagonistas de los receptores mGlu2/3 parecen tener actividad en modelos animales de depresión. Además, estudios recientes indican la implicación de los receptores mGlu5 y mGlu7, en la regulación del sueño, concretamente en el sueño REM (Cavas, Scesa y Navarro, 2013a, b). En contraste, es mucho menos conocido el posible papel de los receptores mGlu1, 4, 7, y 8, en los trastornos psiquiátricos (Conn, Lindsley y Jones, 2009; Dravolina et al., 2007; Palucha y Pilc, 2007; Spooren y Gasparini, 2004; Steckler et al., 2005a; Wolley, Pemberton, Bate, Corti y Jones, 2008). No obstante, se ha constatado la participación de los receptores mGlu1 en la esquizofrenia, así como la implicación de los receptores del grupo III en la ansiedad (Nicoletti et al., 2011). Asimismo, la modulación alostérica de los mGluR (fundamentalmente los receptores

mGlu2, mGlu4 y mGlu5), representa un potencial terapéutico para la intervención en numerosos trastornos psiquiátricos y neurológicos tales como la ansiedad, depresión, síndrome del X-frágil, Parkinson y esquizofrenia, entre otros (Gregory et al., 2011; Hovelsø et al., 2012).

---

## 3. NEUROBIOLOGÍA DE LA AGRESIÓN

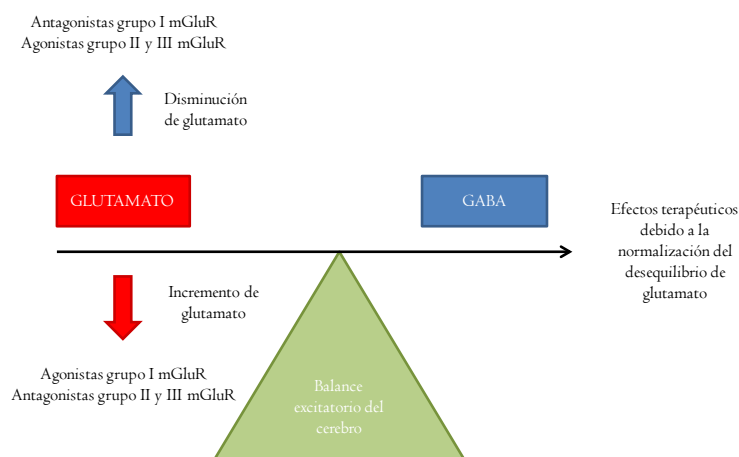
---



### 3.1. NEUROQUÍMICA DE LA AGRESIÓN

#### 3.1.1. Aminoácidos excitatorios e inhibitorios

La transmisión sináptica en el SNC está mediada en gran medida por los aminoácidos excitatorios e inhibitorios, y su implicación en los mecanismos que regulan la conducta agresiva ha comenzado a ser establecida en los últimos años. Una de las primeras hipótesis sobre la conducta agresiva simplemente extrapolaba los efectos excitatorios del glutamato y los efectos inhibitorios de GABA hacia niveles de la conducta agresiva (Mandel et al., 1979). Esta aproximación fue elaborada a partir de la hipótesis del “descontrol límbico”, donde se representa la expresión de los episodios agresivos como el resultado de un desequilibrio entre la excitación del glutamato y la inhibición de GABA (Monroe, 1978). La hipótesis del desequilibrio glutamato-GABA deriva de medidas iniciales realizadas en animales agresivos en comparación con animales no agresivos, en las que se observaron niveles elevados de glutamato frente a bajos niveles de GABA en el cerebro: hipotálamo, amígdala, corteza frontal, y bulbos olfatorios. Además, los fármacos que disminuyen los niveles de glutamato o que incrementan los de GABA, inhiben diferentes tipos de conducta agresiva. Efectos antiagresivos similares se aprecian en ratas y ratones que son tratados directamente con agonistas de los receptores de GABA-A. De hecho en clínica, la medicación antiepiléptica utilizada para restaurar el equilibrio glutamato/GABA, también resulta eficaz para el tratamiento de la agresividad (Miczek, Faccidomo, Fish y DeBold., 2007).



**Figura 3.1.** La excitabilidad del cerebro es controlado por el equilibrio de los inputs excitatorios del glutamato y los inputs inhibitorios GABAérgicos. Los fármacos que incrementan o disminuyen esta función glutamatérgica en las sinapsis y estructuras claves son nuevas aproximaciones potenciales para tratar estas condiciones de desequilibrio glutamato/GABA. Los mGluR, como moduladores indirectos de la excitabilidad glutamatérgica y con una distribución selectiva en el SNC, son considerados nuevas y prometedoras dianas terapéuticas, a este respecto (Adaptado de Linden y Schoepp, 2006).

No obstante, existen algunas excepciones para esta hipótesis del desequilibrio. Así, la delección del gen que codifica la isoforma GAD65 de la enzima que sintetiza GABA, reduce los niveles de GABA en el cerebro y da lugar a una disminución de la agresión (Stork et al., 2000). Igualmente, ratones KO de la isoforma GAD67 presentan una inhibición de la conducta agresiva en ratones machos (Sandhu et al., 2014). Por otro lado, se han encontrado niveles altos de GAD65 en hámsters a los que se les ha inducido una fuerte agresividad tras ser expuestos a cocaína (Ricci, Grimes, Knyshevski y Melloni, 2005). Por tanto, estos resultados demuestran que existen casos donde GABA puede facilitar la conducta agresiva.

### 3.1.1.1. *Glutamato*

La emergencia de compuestos nuevos y más selectivos de estos subtipos de receptores los convierte en prometedores drogas para dilucidar los efectos específicos que modulan la agresión. Puesto que este será el tema central de la tesis, no nos detendremos aquí a detallar su relación con la conducta agresiva. Lo veremos en los capítulos posteriores.

### 3.1.1.2. *GABA*

La estimulación directa y la modulación positiva de los receptores GABA-A produce una variedad de efectos en la conducta agresiva, desde inhibición hasta intensificación de la agresividad (Tabla 3.1). Diferentes sustancias como benzodiazepinas, barbitúricos, alcohol y algunos neuroesteroides modulan de manera alostérica el receptor GABA-A, potenciando las acciones del GABA e incrementando el flujo de aniones de  $\text{Cl}^-$ . Así, en la práctica clínica, las benzodiazepinas (bzds), que son moduladores alostéricos de los receptores GABA-A, aunque se usan en clínica para calmar a las personas con comportamientos impulsivos y violentos, pueden en ocasiones producir efectos proagresivos (Comai, Tau y Gobbi, 2012). En animales de laboratorio, el neuroesteroide allopregnanolona (modulador alostérico positivo GABA-A), puede provocar también un aumento de la agresión (Fish et al., 2001). Estas reacciones se pueden considerar paradójicas porque son “opuestas” a los efectos calmantes esperados (Miczek et al., 2007). Una explicación para estos resultados contradictorios de los efectos de GABA sobre la agresión podría estar relacionada con el hecho de que sus acciones dependan del área involucrada, del subtipo de receptor, o incluso del contexto específico de la situación donde la conducta agresiva es generada (Takahashi y Miczek, 2014).

En la determinación de cómo afectan las benzodiazepinas a la conducta agresiva intervienen numerosos factores. Estos incluyen la droga en sí misma, el contexto en donde es

administrado y la historia del individuo (Bond, Curran, Bruce, O'Sullivan y Shine, 1995; Hall y Zisook, 1981; Dietch y Jennings, 1988; Miczek et al., 2007; Takahashi y Miczek, 2014). En humanos, se ha constatado un aumento de la agresión tras el tratamiento con bzd, particularmente en aquellos individuos que tienen una historia previa de comportamiento violento. Igualmente, diferentes tipos de bzd han mostrado un aumento de dominancia, agresión territorial y maternal en ratones, rata y monos. Este efecto proagresivo es revertido con antagonistas que se unen al sitio de unión de las bzds en el complejo receptor GABA-A, lo que indica que este sitio es crítico para la intensificación de la agresión (Gourley, De Bold, Yin, Cook y Miczek, 2005; Olivier, Mos y Miczek, 1991). No obstante, al margen del pasado violento que pueda tener un individuo, otras bzds reducen la conducta agresiva, o bien no ejercen efecto ninguno (de Almeida, Rowlett, Cook, Yin y Miczek, 2004; Martín-López y Navarro, 2002). Una hipótesis que puede explicar estos efectos diferenciales sugiere que los compuestos con una alta actividad intrínseca sobre los receptores GABA-A son los que probablemente reducen la conducta agresiva (Ducic, Puia, Vicini y Costa, 1993; Gourley et al., 2005). Otro importante determinante de los efectos proagresivos tiene que ver con la dosis administrada. Así, se observan efectos bifásicos, de modo que dosis bajas-moderadas son las que aumentan la agresión mientras que dosis más altas tienen efectos sedativos, lo que influye, al menos parcialmente, en sus efectos antiagresivos (Comai et al., 2012; Miczek et al., 2007; Takahashi y Miczek, 2014).

El contexto y la experiencia previa con la conducta agresiva son dos determinantes adicionales para los efectos que resultan de la estimulación de los receptores GABA-A. Cuando las bzds son administradas a individuos sin ninguna patología identificada o son utilizados en un centro clínico, generalmente se disminuye la agresividad y la conducta hostil. No obstante, los mismos compuestos pueden incrementar la agresión cuando se administran (o son utilizados) por individuos predispuestos a la violencia. Estos efectos se han observado igualmente en los ratones. Asimismo, la exposición previa a drogas también afecta a las respuestas de los moduladores positivos del receptor GABA-A (Miczek et al., 2007; Takahashi y Miczek, 2014).

Esta divergencia de efectos de los moduladores positivos de GABA-A podría ser el resultado de alteraciones en la composición del complejo de subunidades de dicho receptor. Su composición de subunidades es crucial para el sitio de unión de las diferentes sustancias, así como para los efectos propios de cada una (Rudolph et al, 1999). Por ejemplo, los efectos sedativos de las bzds parece que son el resultado de las acciones sobre la subunidad  $\alpha 1$ , más que de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , siendo estas últimas las responsables de los efectos ansiolíticos (Rowlett,

Platt, Lelas, Atack y Dawson, 2005; Rudolph, Crestani y Mohler, 2001). La importancia funcional de la subunidad  $\alpha 1$  ha empezado a ser investigada por su papel en la conducta agresiva, fundamentalmente debido a la disponibilidad de agonistas y antagonistas selectivos. Los efectos de los antagonistas indican que la subunidad  $\alpha 1$  podría estar involucrada en efectos del midazolam y el alcohol sobre la agresión (de Almeida et al., 2004; Gourley et al., 2005). Además, estos datos sugieren la existencia de una disociación estructural de los efectos de los moduladores positivos de los receptores GABA-A entre la atenuación de la ansiedad y el aumento de agresión (Comai et al., 2012; Miczek et al., 2007).

Recientemente, el receptor GABA-B está recibiendo una atención creciente por su implicación en numerosos problemas psiquiátricos como ansiedad, depresión o consumo de sustancias, aunque su posible participación en la regulación de la conducta agresiva no ha sido todavía bien examinada (Takahashi y Miczek, 2014). En un estudio clínico se encontró que la administración oral del agonista baclofen inhibía las respuestas agresivas en jóvenes que tenían un historial de trastorno de conducta en la infancia, mientras que el mismo tratamiento aumentaba las respuestas agresivas en los sujetos controles (Cherek, Lane, Pietras, Sharon y Steinber, 2002). En ratas, baclofen reduce las formas intensificadas de conductas agresivas-defensivas inducidas por choques eléctricos, síndrome de abstinencia al alcohol y tratamiento con apomorfina (File, Zharkovsky y Gulati, 1991; Rodgers y Depaulis, 1982; Rudissaar, Pruus, Skrebuhhova-Malmros, Allikmets y Matto, 2000). Por el contrario, se ha observado que la administración sistémica de baclofen se asocia a una curva de dosis respuesta de U-invertida en la conducta agresiva territorial en los ratones machos: dosis bajas-moderadas incrementan la conducta agresiva, mientras que dosis altas la reducen, aunque acompañadas por falta de coordinación motora (Takahashi et al., 2012). El núcleo dorsal de rafe (DRN) parece ser uno de los sitios de acción de baclofen, lo que puede explicar los efectos de agresión intensificada. La administración intra-DRN aumenta la agresión entre ratones macho en numerosas cepas de ratones. Los antagonistas del receptor GABA-B bloquean este efecto proagresivo del baclofen. En estudios de microdiálisis *in vivo* se ha constatado que la activación de GABA-B en el DRN incrementa los niveles extracelulares de 5-HT en la corteza prefrontal medial (PFCm). Así, la activación fásica de las neuronas 5-HT por modulación indirecta de los receptores GABA-B debe promover cierto tipos de conducta agresiva intensificada en los ratones (Takahashi y Miczek, 2014). Además, Takahashi et al. (2015) han demostrado recientemente que el ligando baclofen actúa también sobre neuronas no serotoninérgicas para intensificar la agresión. Asimismo, la administración intra-DRN de

baclofen aumenta la liberación de glutamato, pero no altera la liberación de GABA, dentro del DRN.

**Tabla 3.I.** Cuadro-resumen con los resultados principales de los estudios farmacológicos/genéticos de los principales neurotransmisores implicados en la conducta agresiva.

NEUROTRANSMISOR	PERFIL ANTIAGRESIVO	PERFIL PROAGRESIVO	EFFECTOS ADVERSOS
<b>GABA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Dosis altas de moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA A.</li> <li>* Agonistas GABA B.</li> <li>* Antagonistas de los receptores GABA A y GABA B revierten los efectos proagresivos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Dosis bajas/moderadas de moduladores alostéricos positivos (GABA A y GABA B).</li> <li>* PAM + experiencia previa a drogas.</li> <li>* PAM + experiencia conducta agresiva.</li> <li>* KO GAD65 y GAD67.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sedación o ansiolisis con dosis altas de PAM de GABA A.</li> <li>* Falta de coordinación motora con dosis altas de agonistas de GABA B.</li> </ul>
<b>SEROTONINA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Agonistas receptor 5-HT1A y 5-HT1B.</li> <li>* KO receptor 5-HT1A.</li> <li>* Antagonistas receptor 5-HT2A.</li> <li>* Inhibidores de la recaptación de 5-HT.</li> <li>* KO SERT.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Inhibidores de la recaptación de 5-HT.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sedación y estereotipia con los agonistas 5-HT1A.</li> <li>* Antagonistas 5-HT2A disminuye la conducta locomotora.</li> <li>* Conducta ansiolítica KO SERT.</li> </ul>
<b>DOPAMINA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Agonistas receptor DA D1.</li> <li>* Antagonista receptor DA D2.</li> <li>* Agonistas y antagonistas receptor DA D3.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Dosis bajas agonistas DA no selectivos.</li> <li>* KO DAT1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sedación antagonistas DA D2.</li> <li>* Interrupción secuencia conductual con agonistas DA D2.</li> </ul>
<b>NOREPINEFRINA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Antagonistas receptor <math>\beta</math>.</li> <li>* Agonistas receptores <math>\alpha 2</math>.</li> <li>* Dosis altas de antagonistas <math>\alpha 2</math>.</li> <li>* KO <math>\beta</math>-hidroxilasa.</li> <li>* Sobreexpresión receptores <math>\alpha 2</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Agonistas receptores <math>\beta</math>.</li> <li>* Dosis bajas de antagonistas <math>\alpha 2</math>.</li> <li>* KO NET.</li> <li>* KO receptores <math>\alpha 2</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Sedación con <math>\beta</math>-bloqueantes.</li> <li>* Efectos ansiogénicos antagonistas <math>\alpha 2</math> y <math>\beta</math>.</li> </ul>

### 3.I.2. Monoaminas

Las dianas tradicionales para las intervenciones farmacoterapéuticas de la agresión durante las décadas pasadas han sido las aminas serotonina (5-HT), dopamina (DA) y norepinefrina (NE) (Tabla 3.I). Junto con los andrógenos, las aminas han sido estudiadas extensamente por su papel en la neurobiología de diferentes tipos de conducta agresiva. El principal foco de atención se ha dirigido a la 5-HT; las técnicas neurobiológicas moleculares han contribuido a avanzar enormemente en el estudio del sistema serotoninérgico y su relación con la agresión (Miczek et al., 2007). Aunque se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios una implicación de la serotonina en la regulación de la conducta agresiva, el mecanismo preciso a

través del cual controla o modula la agresión no ha sido aclarado (de Boer, Olivier, Veening y Koolhaas, 2015). Un hecho que complica la interpretación de los resultados es la existencia de una amplia distribución de 5-HT a lo largo de todo el cerebro y la diversidad de subtipos de receptores caracterizados (Miczek et al., 2007).

### 3.1.2.1. Serotonina

La investigación animal farmacológica, neurobiológica y genética indica que el aumento de la conducta agresiva podría relacionarse con una disfunción del sistema serotoninérgico. En general, son los niveles bajos de 5-HT los que se asocian con la conducta agresiva, aunque parece que esta relación es mucho más compleja de lo que se consideraba inicialmente (Comai et al., 2012).

Las primeras evidencias se observaron en tejido *postmortem* de animales que habían sido aislados previamente y que se comportaban de manera agresiva cuando eran enfrentados a otros ratones aislados. Estos animales mostraban bajas concentraciones de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA (Giacolone, Tansella, Valzelli y Garattini, 1968). En la actualidad, la hipótesis de la deficiencia de 5-HT que relaciona la actividad serotoninérgica con una predisposición para la conducta agresiva está siendo reemplazada por propuestas más sofisticadas. Datos recientes clínicos y preclínicos apuntan hacia una importante diferenciación alélica en los genes para los diferentes subtipos de receptores 5-HT, transportadores de moléculas y enzimas catabólicas, en individuos agresivos impulsivos (de Boer y Koolhaas 2005; Lesch y Merschdorf, 2000; Miczek, Fish, De Bold y de Almeida, 2002; Miczek et al., 2007; Nelson y Chiavegatto 2001; Takahashi, Quadros, de Almeida y Miczek, 2011). Un segundo papel de la 5-HT es la modulación de la conducta agresiva por su actividad fásica, particularmente durante la anticipación de los actos agresivos y defensivos, y la terminación de los encuentros agresivos. La actividad 5-HT fásica parece estar relacionada con los episodios de los actos consumatorios de numerosas especies animales que van desde la alimentación hasta los conducta sexual. Durante la última década, los mecanismos epigenéticos para la expresión de ciertos genes que codifican las enzimas metabólicas 5-HT, transportadores de proteínas y receptores han sido objeto de escrutinio por su posible implicación en la conducta impulsiva de individuos violentos. Igualmente, en la última década se ha hecho un considerable esfuerzo para trasladar más fácilmente los datos preclínicos hacia las observaciones clínicas y viceversa (Takahashi, Quadros, de Almeida y Miczek, 2013).

Conductualmente, la administración sistémica de agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> disminuye de manera dosis dependiente los niveles de agresión en ratones y rata (de Boer, Lesourd, Mocaer y Koolhas, 1999, 2000; Mizcek, Hussain y Faccidomo, 1998). No obstante, en el rango de dosis que produce una efectiva reducción de la conducta agresiva, la mayoría de estos ligandos produce efectos inespecíficos como sedación, disminución de la conducta motora o movimientos estereotípicos, así como un reducido interés social. Los antagonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> revierten estos efectos de los agonistas, mientras que la administración de antagonistas por si solos no produce ningún efecto sobre la agresión (de Boer y Koolhaas 2005; Mendoza, Bravo y Swanson, 1999; Mizcek y de Almeida, 1998). No obstante, algunos agonistas reducen la conducta agresiva de manera específica sin afectar a otras conductas no agresivas, al menos en dos cepas de ratas (de Boer et al., 1999, 2000; de Boer y Koolhas, 2005). Estos compuestos sugieren que tienen diferentes efectos sobre los receptores 5-HT en los terminales presinápticos y postsinápticos, y por tanto, es posible que una subpoblación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> donde estos compuestos actúan esté implicada de manera específica en los efectos antiagresivos (Takahashi et al., 2013).

En cuanto a los agonistas de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, en la mayoría de las situaciones muestran una disminución de la conducta agresiva sin producir sedación (Miczek et al., 2007). Además, los ratones KO para este receptor exhiben un aumento de la conducta agresiva cuando se comparan con los animales controles (Bouwknicht et al. 2001; Saudou et al. 1994). Estos resultados sugieren un papel de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la inhibición de algunas conductas agresivas e impulsivas (Takahashi et al., 2013). Además, los agonistas de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> parecen ser más específicos que los de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>. En ratas y ratones, la administración sistémica de agonistas 5-HT<sub>1B</sub> reduce la conducta agresiva sin producir sedación o déficits motores/sensoriales (de Almeida, Faccidomo, Fish y Mizcek, 2001; de Almeida y Mizcek, 2002; de Boer y Koolhaas, 2005; Mizcek et al. 2004). No obstante, no existen compuestos aprobados clínicamente cuya diana sea este subtipo de receptor. Esto es debido a que existen diferencias en los sitios de unión de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> entre humanos y roedores y, por tanto, la especificidad y sensibilidad farmacológica de los agonistas 5-HT<sub>1B</sub> en roedores no pueden ser comparadas con humanos (Olivier, 2004). Las funciones precisas y los sitios de acción de los efectos antiagresivos de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> todavía deben ser clarificados (Takahashi et al., 2013).

Los estudios de microdiálisis *in vivo* han mostrado que durante la fase de inicio de la conducta agonística los niveles corticales de serotonina de una rata residente que se enfrenta a un intruso no cambian, mientras que durante la ejecución misma de la conducta agresiva y durante la terminación y la recuperación se produce una disminución de 5-HT en la corteza prefrontal, pero no en NAc (van Erp y Miczek, 2000). Por otro lado, estos trabajos han evidenciado que tanto la administración sistémica como intra-rafe de agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> disminuyen los niveles extracelulares de 5-HT en áreas del prosencéfalo que incluyen el estriado, hipocampo y corteza frontal (Adell, Celada y Artigas, 2001; De Groote, Olivier y Westenberg, 2003; Dekeyne, Brocco, Adhumeau, Gobert y Millan, 2000; Johnson, Rollema, Schimdt y McHarg, 2001; Knobelman, Kung y Lucki, 2000). Así, parece que la inhibición de la liberación de 5-HT por los agonistas de los subtipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> podría estar mediada por los autorreceptores 5-HT<sub>1</sub>. Por tanto, estos resultados sugieren que los compuestos que disminuyen la neurotransmisión 5-HT reducen al mismo tiempo la conducta agresiva, lo que contradice la hipótesis de la deficiencia de 5-HT en la agresión (Miczek, 2007; Takahashi et al., 2013). En suma, una apropiada interpretación del papel de 5-HT sobre la agresión dependerá del lugar de acción predominante de los agonistas de los receptores 5-HT (de Boer et al., 2015).

La técnica de microinyecciones intracraneal se ha usado para determinar las regiones que están mediando los efectos antiagresivos de los agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub>. La serotonina en el SNC deriva fundamentalmente del núcleo dorsal y medial del rafe (DRN y MRN, respectivamente). La activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> en el DRN con microinfusiones de agonistas selectivos reduce de manera consistente la conducta agresiva en ratas y ratones, pero con una concomitante reducción de la actividad motora e interacciones sociales (Bannai, Fish, Faccidomo y Miczek, 2007; Faccidomo, Bannai y Miczek, 2008; Mos, Olivier, Poth, Van Oorschot y Van Aken, 1993; van der Vegt et al. 2003). En la mayoría de los estudios, la activación local en las regiones de proyección (p. ej. área preóptica medial, septum lateral, corteza orbitofrontal, hipotálamo anterior y medial, sustancia gris periacueductal) disminuye la conducta agresiva con diversos procedimientos y en varias especies (Takahashi et al., 2013). Por el contrario, bajo condiciones en las que se intensifica la conducta agresiva, como el consumo moderado de alcohol o la agresión maternal, los agonistas 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> incrementan aún más los niveles de agresión cuando son administrados en PFCm (Faccidomo et al., 2008) o el área septal medial (de Almeida y Lucion, 1994), respectivamente. Por tanto, son necesarios más estudios para delinear los mecanismos asociados a estos efectos progresivos (Takahashi et al., 2013).



En cuanto a la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub>, los antipsicóticos atípicos, con una significativa acción antagonista sobre 5-HT<sub>2A</sub>, han demostrado reducir los episodios agresivos en pacientes con trastornos psiquiátricos. En modelos animales, los antagonistas selectivos 5-HT<sub>2A</sub> también reducen la conducta agresiva, pero de manera inespecífica (Miczek et al., 2007; Takahashi et al., 2013). El desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas que actúen más selectivamente permitirá diferenciar de manera más adecuada a los receptores 5-HT<sub>2</sub> y podrían ayudar a disociar los efectos agresivos y sedativos (Takahashi et al., 2013).

Por otro lado, se ha propuesto que los agonistas serotoninérgicos parciales o indirectos que actúan sobre los receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> producen una disminución de prolactina en individuos agresivos. Presumiblemente, esas acciones ocurren a través de proyecciones del núcleo de rafe hacia neuronas del núcleo paraventricular (PVN) que liberan oxitocina o vasopresina, y afecta a la prolactina, o bien mediante proyecciones del rafe hacia neuronas GABAérgicas en el hipotálamo mediobasal que después inhiben neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, los estudios que modifican los niveles de serotonina a través de manipulaciones en la dieta (ej. dieta sin triptófano) apoyan la hipótesis de que la deficiencia de serotonina aumenta la conducta agresiva (Miczek et al., 2007). En consonancia con la hipótesis de la deficiencia de 5-HT, se ha planteado que la restauración de los niveles de 5-HT representa un medio eficaz para calmar y sedar a los individuos agresivos. De hecho, los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS) han demostrado reducir la conducta agresiva en pacientes psiquiátricos, aunque ocasionalmente también han aumentado las conductas agresivas y suicidas. El tratamiento agudo y crónico con ISRS produce una reducción de la conducta agresiva en modelos animales, si bien parece que estos efectos antiagresivos son más probables bajo condiciones de agresión intensificada (Takahashi et al., 2013). Asimismo, es posible que los efectos de los ISRS aumenten la actividad de la alloprenanolona (ALLO), un modulador positivo del receptor GABA-A. Este mecanismo es interesante porque ALLO puede inhibir o activar la conducta agresiva, dependiendo de la experiencia individual previa, y puede contribuir al incremento ocasional de la agresión durante el uso clínico de ISRS (Pinna, Dong, Matsumoto, Costa y Guidotti, 2003).

Los genes que codifican los transportadores de 5-HT (SERT) también han sido relacionados con la conducta agresiva, tal y como se ha demostrado con animales mutantes (KO) y sus asociaciones con polimorfismos. Ratones KO SERT exhiben una reducción a largo plazo de la conducta agresiva, incrementando la síntesis de 5-HT y la reducción del almacenamiento de

5-HT (Holmes, Murphy y Crawley, 2002; Kim et al., 2005). Los ratones KO SERT incluso muestran una conducta ansiolítica, lo que debe contribuir sobre la disminución de la conducta agresiva (Holmes, Li, Murphy, Gold y Crawley, 2003; Holmes, Yang, Lesch, Crawley y Murphy, 2003). Diversos estudios en humanos y primates no humanos se han centrado en el papel de los polimorfismos en el gen SERT, que atribuye variación a la expresión en SERT y recaptación de 5-HT, en la modulación de la agresión. El transportador 5-HT ligado a la región polimórfica (5-HTTLPR) se ha asociado con numerosas características relacionadas con la agresión y otros trastornos afectivos, aunque existe controversia con respecto a la variación particular del alelo (Miczek et al., 2007).

Recientemente, se han desarrollado modelos animales que pueden ser útiles para estudiar la relación entre el sistema serotoninérgico y la agresión impulsiva. Así, se ha generado un modelo animal nulo para el gen *Tph2*. Estos animales carecen de la isoforma de la enzima triptófano hidroxilasa (TH), que se expresa exclusivamente en las neuronas y, por tanto, no tienen 5-HT en el cerebro. No obstante, mantienen intacto el sistema serotoninérgico al administrar 5-hidroxitriptófano (5-HTP), que permite sintetizar la serotonina. Estos ratones KO *Tph2* presentan una alta conducta agresiva (Bedrosian y Nelson, 2014).

### 3.1.2.2. Dopamina (DA)

La activación del sistema dopaminérgico juega un papel crítico en la modulación de la conducta agresiva. De manera específica, este neurotransmisor se localiza en regiones implicadas en la conducta agresiva. Así, la agresión correlaciona con cambios en los niveles de DA del hipotálamo. Además, incrementa la TH y se han encontrado niveles de ARNm de los transportadores de DA en el VTA en ratones ganadores, a diferencia de los perdedores y controles, que han pasado por la experiencia de repetidas confrontaciones agonísticas (Comai et al., 2012).

Dosis bajas de agonistas no selectivos e indirectos dopaminérgicos como las anfetaminas o la apomorfina, pueden incrementar la conducta agresiva de los roedores, mientras que dosis altas de anfetamina aumenta las reacciones defensivas (Miczek y Haney, 1994). La conducta hiperdefensiva de los animales tratados con anfetaminas pueden ser debidos a la reactividad general de los estímulos más que a un efecto específico de defensa. Estos datos farmacológicos sugieren un papel de la DA en los mecanismos neurobiológicos de la conducta agresiva en múltiples niveles: aumentar los niveles bajos de agresividad, desorganizar los rituales típicos de la

conducta agresiva que son específico de especies, aumentar los actos agresivos estereotípicos y prolongar las actividades agresivas (Miczek et al., 2007).

Los fármacos antipsicóticos que funcionan como antagonistas de los receptores dopaminérgicos continúan siendo usados comúnmente para reducir la conducta agresiva en pacientes esquizofrénicos (Citrome y Volavka, 1997a, b). Además, esa farmacoterapia puede ser efectiva en el tratamiento de la agresión impulsiva en el trastorno de personalidad límite (Friedel, 2004). Inicialmente, se utilizaban antipsicóticos clásicos como el haloperidol, que son fundamentalmente antagonistas de los receptores dopaminérgicos D2. No obstante, recientemente, se ha encontrado que los neurolépticos atípicos que tienen efectos pronunciados sobre otros neurotransmisores pueden ser también efectivos para reducir los episodios agresivos con menos efectos adversos y se están utilizando en varias condiciones psiquiátricas para reducir la agresión y la agitación (Miczek et al., 2007).

Se han asociado polimorfismos en los transportadores de la dopamina (DAT) con un aumento de la conducta agresiva (Chen et al., 2005). Además, existen diferencias en la distribución estriatal del DAT cuando se comparan alcohólicos violentos frente a no violentos (Tiihonen et al., 2005). Igualmente, la disrupción del gen DAT1 en ratones da lugar a un aumento de la conducta agresiva hacia congéneres (Rodríguez, Chu, Caron y Wetsel, 2004). Por tanto, este patrón de resultados sugiere que el incremento de la actividad de las sinapsis dopaminérgicas contribuye al aumento de la agresión.

Las enzimas catabólicas involucradas en la eliminación de las catecolaminas, COMT y MAO-A, han dado soporte a la implicación del papel de DA en la conducta agresiva. Así, animales KO de los genes COMT y MAO-A presentan conducta agresiva (Cases et al., 1995; Gogos et al., 1998). Estos resultados son particularmente interesantes ya que existe un marcado aumento de la conducta agresiva en personas que presentan una mutación puntual que reduce la actividad de la MAO-A (Martín-López, Perea, Morabet y Navarro, 2008). Además, se ha asociado también un polimorfismo específico del gen COMT con un incremento de la conducta agresiva de las personas con esquizofrenia (Kotler et al., 1998). En cualquier caso, estas enzimas están involucradas en la degradación de múltiples neurotransmisores.

Por otro lado, las sustancias que actúan sobre los receptores dopaminérgicos D1 y D2, disminuyen la conducta agresiva. En un estudio, Garmendia, Sánchez, Azpiroz, Brain y Simón

(1992) encontraron que la administración aguda de clozapina (antagonista del receptor dopaminérgico D2) disminuía de manera significativa las conductas de amenaza y ataque, sin afectar a la conducta motora. Por su parte, Navarro y Manzaneque (1997) observaron una disminución de las conductas ofensivas tras la administración de tiapride (antagonista selectivo del receptor dopaminérgico D2), sin afectar a la actividad motora, tanto tras la administración aguda como subcrónica (60 y 80 mg/kg). Sin embargo, la reducción de la agresión no siempre es selectiva ya que algunos antagonistas D2 disminuyen la conducta motora, por lo que los efectos antiagresivos estarían mediados, al menos en parte, por los efectos sedativos de estos fármacos. En la misma línea, Redolat, Brain y Simon (1991) encontraron que la administración aguda de sulpiride (antagonista selectivo del receptor dopaminérgico D2), producía un claro efecto antiagresivo. Además, la categoría conductual de inmovilidad, así como otras categorías conductuales motoras, resultaban incrementadas. No obstante, constataron que la acción antiagresiva del fármaco era resultado del efecto específico como antagonista dopaminérgico y no meramente un correlato inespecífico de su acción disruptiva sobre la conducta motora. Por otra parte, los agonistas D2 interrumpen y fragmentan la secuencia conductual requerida para la conducta agresiva típica de especies. Finalmente, los receptores D3 podrían ser una diana prometedora ya que se ha observado que los agonistas reducen la conducta agresiva sin producir efectos sedativos, aunque los antagonistas también ejercen efectos antiagresivos (Comai et al., 2012; Miczek et al., 2007). De hecho, Manzaneque y Navarro (1999) evidenciaron que tanto la administración aguda como subcrónica de amisulpride (5-20 mg/kg), antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D2 y D3, disminuía de manera notable las conductas ofensivas (amenaza y ataque), sin afectación de la actividad locomotora.

Las acciones de los agonistas y antagonistas del receptor de DA dependen de la regulación al alza o regulación a la baja de estos receptores, procesos que están regulados por el impulso de las vías dopaminérgicas que están ocasionadas por la conducta agresiva en sí misma. En tejidos *postmortem* de ratón y rata se ha observado un incremento de los niveles de DA en corteza y estriado ventral tras la ejecución de las conductas agresivas y defensivas (Haney, Noda, Kream y Miczek, 1990; Puglisi-Allegra y Cabib, 1990). Al mismo tiempo, estudios de microdiálisis *in vivo* han aportado medidas en tiempo real de los niveles de DA en estructuras corticolímbicas (NAc y PFC) desde el inicio de la conducta agresiva hasta su finalización (Miczek, Mutschler, van Erp, Blank y McInerney, 1999; Tidey y Miczek, 1996; van Erp y Miczek, 2000). Por otro lado, la experiencia agonística da lugar a cambios neuroadaptativos produciéndose aumentos de DA con la anticipación de la conducta (Miczek et al., 2007). Estos

incrementos deben reflejar elementos motivacionales de la agresión, ya que estos aumentos son similares a los que se aprecian en otras conductas motivadas y desencadenadas por señales (Comai et al., 2012).

### 3.1.2.3. Norepinefrina (NE)

Los enfrentamientos entre individuos se han caracterizado por un alto grado de “arousal”, así como por un incremento de la actividad central y periférica de NE. La lucha es uno de los muchos eventos asociados a la activación noradrenérgica y este resultado ha sido confirmado en varias especies animales y contextos. La activación NE no es específica de las interacciones agonísticas; de hecho, la mera observación de una lucha es suficiente para elevar los niveles de NE en la corteza. Todavía no se ha establecido una relación consistente entre la conducta agresiva y NE (Miczek et al., 2007) y se ha sugerido que el sistema noradrenérgico debe jugar un papel “permisivo” en la conducta agresiva, contribuyendo a determinar si el individuo elige luchar o huir en respuesta a un desafío (Comai et al., 2012).

La correlación entre la conducta agresiva y la NE o su metabolito MHPG en el cerebro o líquido cefalorraquídeo no es ni tan fuerte ni replicable en los estudios como lo son aquellos para 5-HT. Las correlaciones positivas encontradas sugieren una relación entre NE cerebral y conducta agresiva, aunque las manipulaciones genéticas de los niveles de NE ofrecen un apoyo más consistente (Miczek et al., 2007). Hasta ahora, tres manipulaciones genéticas del sistema NE han alterado los niveles de NE, afectando a la conducta agresiva. Los animales KO para el gen que codifica la proteína transportadora de noradrenalina (NET) o para la enzima monoamina oxidasa A (MAO-A) exhiben elevaciones de los niveles de NE y una consecuente conducta agresiva (Cases et al., 1995; Haller et al., 2002). Por otro lado, los animales KO para el gen que codifica la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa exhiben una ausencia de agresión (Marino, Bourdelat-Parks, Liles y Weinshenker, 2005). Curiosamente, los efectos de estas manipulaciones genéticas del sistema NE parece que son más importantes al inicio del ataque (Comai et al., 2012).

Los tratamientos con antidepresivos que incrementan los niveles extracelulares de NE mediante la inhibición de NET o MAO-A se han estudiado extensamente por sus efectos sobre la conducta agresiva. En este sentido, existe una significativa variabilidad entre los estudios (Miczek, Haney, Tidey, Vivian y Weerts, 1994). En muchos se han encontrado efectos inhibitorios de los antidepresivos tricíclicos sobre la conducta agresiva, mientras que en otros se ha observado que dosis bajas puede incrementar esta agresividad. Microinyecciones de NE en el

área hipotalámica medial, que regula la “defensa afectiva” en gatos, facilitan la exhibición de esta conducta. Por el contrario, la disminución de los niveles de NE puede atenuar los patrones de conducta ofensiva y facilitar algunas formas de conducta defensiva (Miczek et al., 2007).

Las acciones de la NE sobre la conducta agresiva dependen del tipo de receptor sobre el que se actúe, aunque la limitada selectividad de los agonistas y antagonistas sobre estos receptores implica ser prudentes a la hora de interpretar los resultados (Bell y Hepper, 1987; Haller, Makara y Kruk, 1998). Los efectos antiagresivos de los  $\beta$ -bloqueantes sugieren que la NE intensifica el “arousal”. No obstante, este efecto calmante está acompañado por una disminución de la conducta locomotora, lo que es evidente por los efectos sedativos producidos por el bloqueo de los receptores  $\beta$ . La modulación de la neurotransmisión de 5-HT podría ser un mecanismo por el que los  $\beta$ -bloqueantes afecten a la agresión (Miczek et al., 2007).

Tanto los agonistas como los antagonistas noradrenérgicos  $\alpha_2$  producen efectos antiagresivos. Así, los antagonistas del receptor  $\alpha_2$  provocan un aumento de la conducta defensiva, más que ofensiva, en ratones (Haller, Makara y Kovacs, 1996), lo que refleja posibles efectos ansiogénicos de estos compuestos (Charney, Heninger y Redmond, 1983). En ratas, se han descrito efectos bifásicos: dosis bajas aumentan la conducta agresiva mientras que dosis altas las disminuye (Haller, 1995). La modulación de la conducta agresiva en ratones tras la delección genética o sobreexpresión del gen confiere evidencia adicional del papel inhibitorio de subtipo de receptor  $\alpha_2$ . Así, ratones que carecen del gen para el receptor  $\alpha_2$  se vuelven agresivos, mientras que los que sobreexpresan este receptor presentan un fenotipo conductual opuesto (Comai et al., 2012; Sallinen, Haapalinna, Viitamaa, Kobilka y Scheinin, 1998). El efecto principal de este receptor está en la iniciación del ataque, ya que una vez que la lucha comienza, todos los ratones atacan igualmente (Miczek et al., 2007).

Es evidente que la activación noradrenérgica es un prerrequisito necesario para que tenga lugar la conducta agresiva; igualmente se produce una activación de NE como consecuencia de esta conducta agresiva. Una función clave de la NE cortical es su papel en la atención de los eventos salientes, y las confrontaciones agresivas ciertamente satisfacen esta definición. La NE puede regular la conducta agresiva actuando sobre los receptores  $\beta$  facilitando la agresión o sobre los adrenoreceptores  $\alpha$  inhibiendo la agresión. No obstante, los niveles basales de NE no diferencian de manera consistente los individuos con una historia previa de agresividad de

aquellos sin un historial agresivo. Esto sugiere que los mayores efectos de la NE deben ocurrir al mismo tiempo en que la lucha es iniciada, posiblemente por la determinación del individuo de luchar o huir (Miczek et al., 2007). La experiencia previa de victoria o derrota es probablemente un factor importante para tomar esa decisión, y la activación del locus coeruleus está fuertemente influenciada por las experiencias sociales pasadas (Kollack-Walker, Watson y Akil, 1997).

### 3.1.3. Monoamina oxidasa A (MAO-A)

La monoamino oxidasa A (MAO-A) es una enzima que regula la degradación metabólica de 5-HT y NE en el sistema nervioso. El gen que codifica esta enzima fue el primero que se identificó como posible determinante de la agresión en humanos, y ha sido el principal foco de atención de los estudios genéticos y epigenéticos (Takahashi et al., 2013).

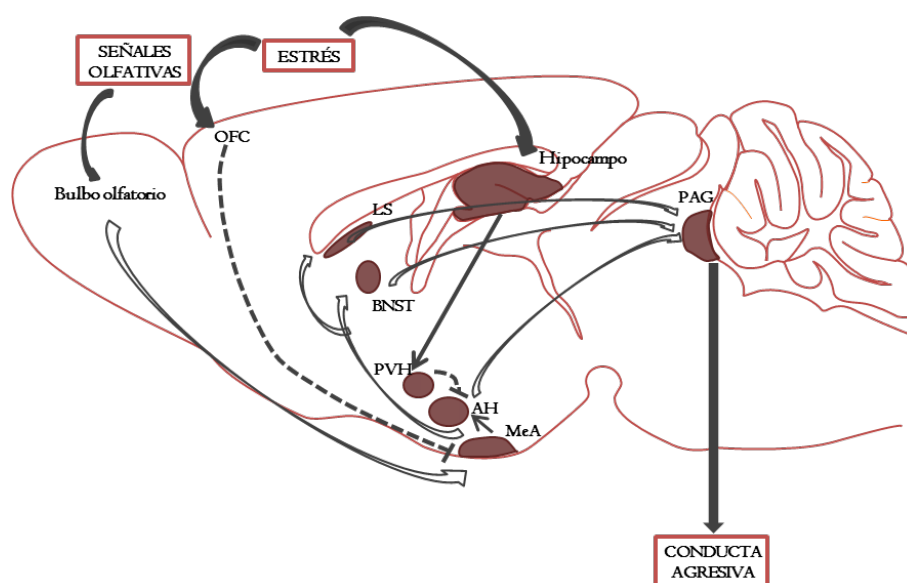
Una amplia evidencia implica a la MAO-A como un importante regulador de la conducta agresiva impulsiva. La conducta agresiva aumenta en animales KO para la enzima MAO-A. Estos animales deficientes de MAO-A muestran igualmente un fuerte incremento de 5-HT y NE y una leve elevación de DA en el cerebro e hígado; los cambios conductuales en los ratones deficientes de MAO-A están probablemente causados por estos cambios en la función serotoninérgica. Además, la agresión intensificada de los ratones mutantes MAO-A son bloqueados por los antagonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Dorfman et al., 2014; Takahashi et al., 2013).

Por último, hay que mencionar que se ha identificado una mutación sin sentido que se produce de manera natural en ratones. Estos portadores de alelos mutantes exhiben niveles altos de agresión reactiva, incluyendo un aumento de la frecuencia de ataque, un mayor golpeteo del rabo y una reducida latencia de ataque. Curiosamente, estos animales también muestran conductas exploratorias aberrantes (Dorfman et al., 2014).

## 3.2. NEUROANATOMÍA DE LA AGRESIÓN

La caracterización de los circuitos neuronales que controlan la agresión resulta compleja ya que estos circuitos regulan también otras conductas sociales. Así, la conducta agresiva procede de la amplia red implicada en la conducta social, que incluye el área preóptica medial (MPOA), septum lateral (LS), hipotálamo anterior (AH), hipotálamo ventromedial (VMH), sustancia gris

periacueductal (PAG), amígdala medial (MeA) y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (Nelson y Trainor, 2007; Siegel et al., 2007; Siever, 2008). En roedores, se envían inputs desde los bulbos olfatorios a la MeA y después se transmite hacia el BNST, MPOA, LS, AH, VMH y PAG. Esta vía no es lineal, sino que existen múltiples inter-conexiones entre estos núcleos (Fig. 8.1). Concretamente, investigaciones con c-Fos cerebral han determinado la participación de numerosas estructuras cerebrales en la conducta agresiva: corteza prefrontal (PFC), MPOA, LS, AH, VMH, LH, PVN, MeA y CeA, BNST, PAG, locus coeruleus (LC) y núcleo dorsal de rafe (DRN) (Takahashi y Miczek, 2014) (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Vías neuroanatómicas de la agresión en roedores. La información desde el bulbo olfatorio es procesado por la amígdala medial (MeA) y es enviada hacia el septum lateral (LS), lecho de la estría terminal (BNST) e hipotálamo anterior (AH). Estas áreas estimulan la sustancia gris periacueductal (PAG) dando lugar a conductas agresivas específicas de especies. El estrés puede inhibir la agresión a través de inputs inhibitorios desde la corteza orbitofrontal, el hipocampo y el núcleo hipotalámico paraventricular (PVH). [Las flechas gruesas representan inputs y outputs hacia y desde el cerebro; las flechas delgadas representan conexiones dentro del cerebro; y las líneas de puntos representan conexiones inhibitorias] (Adaptado de Nelson y Trainor (2007) y Takahashi y Miczek (2014)).

### 3.2.1. Hipotálamo

Los estudios de lesión o estimulación han confirmado la implicación de diferentes estructuras cerebrales en los circuitos que regulan la conducta agresiva. De todas estas regiones, el área hipotalámica es una de las mejor caracterizadas en relación con la agresión. El área hipotalámica de ataque (HAA) es una región que contiene numerosos núcleos hipotalámicos que pueden elicitar conducta de ataque cuando son electroestimulados (Kruk et al., 1983; Siegel, Roeling, Gregg y Kruk, 1999). La estimulación eléctrica de partes de HAA, como el hipotálamo



lateral o ventromedial, induce agresión intensificada en la rata, con un patrón conductual caracterizado por una combinación de diferentes tipos de agresión (Siegel et al., 1999). Incluso se ha observado que el ataque es dirigido hacia áreas vulnerables del cuerpo del oponente lo que sugiere que la estimulación de HAA da lugar a la agresión patológica. Uno de los neuromoduladores del hipotálamo que están especialmente relacionados con el nivel de agresión es la arginina vasopresina (AVP) (Donaldson y Young, 2008). En hamsters macho, microinyecciones de AVP dentro de AH o VMH aumenta la conducta agresiva, mientras que los antagonistas para AVP reducen la agresión. Los efectos de la AVP sobre la agresión dependen del fotoperiodo, los niveles basales de testosterona y el sexo del individuo (Takahashi y Miczek., 2014). Con técnicas optogenéticas se ha constatado que la manipulación de la actividad fásica del HAA puede inducir conducta agresiva en ratones macho (Lin et al., 2011). Es más, la activación temporal del área ventrolateral de VMH (VMHvl) en ratones macho provoca ataques tanto hacia oponentes macho como hembras, así como sobre objetos inanimados. Los ataques comienzan y terminan de manera concurrente a la aplicación del estímulo de luz, lo que sugiere que el VMHvl funciona como un interruptor que controla la ejecución de la conducta agresiva (Lin et al., 2011). Por tanto, las técnicas optogenéticas se pueden usar para diseccionar los microcircuitos funcionales del HAA que están asociadas a la conducta agresiva (Takahashi y Miczek, 2014).

### 3.2.1.1. Conexiones aferentes (de Boer et al., 2015)

Los mensajes olfativos con información químico-sensorial específica de especies, que es requerida para una apropiada y coherente conducta agresiva, proceden del sistema olfatorio principal y accesorio. Estas señales no llegan directamente al HAA, sino indirectamente a través de aferencias del núcleo del tracto olfatorio (NLOT), MeA y BNST, que proveen al HAA con la suficiente información para inducir ataque hacia el intruso.

Experimentos iniciales en los que se produjeron lesiones neuroanatómicas en estas regiones, mostraron que jugaban un papel en la conducta agonística. De manera particular, MeA ha sido implicado en conductas sociales prototípicas como agresión y sexo. Estudios electrofisiológicos o de inducción de c-Fos han demostrado que las neuronas de MeA están activadas particularmente como respuesta a las señales químico-sensoriales de los congéneres. Además, estudios de lesiones han implicado a MeA en la agresión, aunque la dirección (aumento, sin efecto o disminución) de estas lesiones permanece confusa. La excitación eléctrica de MeA en los gatos aumenta la conducta defensiva que es elicitada por el hipotálamo medial. Este efecto potenciador de la MeA está mediado por la estría terminal, que proyecta hacia el lecho de la estría

y la mitad rostral de MeA, incluyendo VMHvl. Un neurotransmisor importante de esta vía es la sustancia P, que actúa sobre los receptores de neuroquinina-I en MeA. Recientemente, se ha constatado que la mayoría de las neuronas positivas para c-Fos en MeA inducidas por ataque son neuronas GABAérgicas, y la fotoestimulación optogenética de estas neuronas GABAérgicas desencadenan ataques intensos hacia machos intrusos intactos o castrados, hembras e incluso hacia objetos inanimados, lo que sugiere una independencia de las señales sensoriales olfativas. Curiosamente, la fotoactivación de las neuronas vecinas glutamatérgicas suprime de manera efectiva las conductas sociales y promueven las no-sociales como el autoaseo. Aunque MeA está caracterizada por una alta densidad de receptores estrogénicos y androgénicos, no se conoce si están localizados en estas células GABAérgicas. Asimismo, todavía no se sabe si estos distintos grupos de neuronas de MeA están interconectadas con VMHvl y de qué modo lo están, pero es muy factible que formen un micro neuro-circuito funcional para la iniciación y la ejecución de los aspectos consumatorios de la conducta agresiva.

Entre las numerosas subdivisiones de la PFC, la corteza infralímbica (IL) y la corteza orbitofrontal (OFC) son activadas en ratas y ratones tras un encuentro agresivo. La estimulación eléctrica de PFC en gatos da lugar a un retraso del inicio del ataque predatorio o a una exhibición afectiva inducida por la estimulación hipotalámica. Además, lesiones bilaterales de la IL o la OFC aumentan la agresividad en las ratas. Estos mecanismos de control inhibitorio parece que provienen de las neuronas glutamatérgicas piramidales de IL, ya que estas proyectan hacia numerosas áreas del cerebro relacionadas con la agresión, como AH, MeA, VTA y DRN. Recientemente, Takahashi y Miczek (2014) han demostrado mediante técnicas optogenéticas que la fotoestimulación de estas neuronas excitatorias en PFCm, no en OFC, suprimen de manera potente la iniciación y ejecución de la agresión entre machos, mientras que el silenciamiento optogenético produce un aumento de la conducta agresiva. Así, es muy probable que PFCm inhiba la actividad de un circuito neuronal que está estrechamente controlada por la ejecución de los ataques agresivos (p. ej. VMHvl o MeA), aunque no parece que VMHvl reciba un input directo desde esta región. Recientemente, se ha constatado que la PFCm, y de manera específica las neuronas excitatorias que contiene, no está sólo selectivamente relacionada para controlar la conducta social agresiva sino que de manera más general afecta a respuestas conductuales que suponen un esfuerzo hacia situaciones desafiantes, como por ejemplo la natación forzada. En esta línea, Warden et al. (2012) han demostrado que la estimulación optogenética de proyecciones neuronales específicas de PFCm hacia DRN causa un fuerte incremento de la movilidad en el test de natación forzada, lo que sugiere que las vías PFCm-DRN controlan de manera específica la

selección de acciones ante las situaciones desafiantes. Otro mecanismo inhibitorio proviene de las regiones ventrales e intermedias del septum lateral. Las fibras descendientes desde las áreas septales atraviesan precisamente el HAA/IHA en una dirección caudal y los efectos funcionales de inhibición de la agresión se han comprobado en diversos estudios. Por otro lado, se ha sugerido que las numerosas fibras de oxitocina que atraviesan IHA y conectan con VMHvl debe poseer igualmente un efecto inhibitorio sobre la agresión.

### 3.2.1.2. Conexiones eferentes (de Boer et al., 2015)

Respecto a las conexiones eferentes del HAA, es importante subrayar que la conducta no solo involucra el control motor sino también al funcionamiento autonómico y de procesamiento sensorial. Manteniendo esto en mente, se puede comprender mejor la relevancia de estudiar las eferencias del HAA en relación con sus posibles efectos autonómicos, motores y sensoriales. Respecto a las proyecciones que influyen potencialmente sobre las funciones sensoriales, es evidente que las regiones corticales y olfatorias no se encuentran entre las principales eferencias. No obstante, numerosos núcleos talámicos reciben eferencias del HAA. En resumen, las eferencias del HAA pueden modificar perfectamente los *inputs* sensoriales de un roedor estimulado eléctricamente. También son perfectamente capaces de modificar los *outputs* autonómicos durante la agresión territorial, siendo más natural o violento tras la estimulación intracraneal.

Áreas cerebrales como las regiones septales o prefrontales mediales poseen un rico conjunto de conexiones recíprocas, lo que sugiere la existencia de continuas interacciones con el HAA. Las relaciones importantes con la PAG (DLPAG y LPAG) sugieren además más efectos descendientes del HAA. Otras regiones cerebrales que reciben eferencias, merecen atención. Estas son: 1- la parte intra-amigdalóide de la estría terminal, ya que muestra una fuerte activación neuronal tras los encuentros agresivos. 2- Núcleo premamilar dorsal (PMD), que recibe numerosas fibras del HAA, lo que sugiere un papel en la conducta agonística, muy diferente de la implicación de su vecino ventral PMV, que forma parte de la conducta de apareamiento. 3- VTA, que recibe proyecciones desde el HAA, está extensamente conectada con NAc y a través de las fibras dopaminérgicas debe estar involucrada en los mecanismos de recompensa y aprendizaje relacionados con la agresión.

Exhibir las formas y niveles apropiados de conducta agresiva implica que el animal debe analizar rápidamente muchos factores en un corto periodo de tiempo, lo que incluye la correcta

identificación y evaluación de las capacidades de los potenciales competidores, la evaluación del valor del recurso y/o la probabilidad de adquirirlo/defenderla, así como el estado fisiológico del animal. Claramente, necesitan ser utilizados múltiples sistemas sensoriales y circuitos para realizar esas evaluaciones y decisiones, mediando diferentes circuitos neuronales estas funciones. En suma, el HAA recibe una extensa información aferente de varias modalidades, suficientes para controlar la conducta agresiva, basada en el equilibrio de las influencias excitatorias e inhibitorias así como del estado interno del individuo. Las proyecciones del HAA no parecen que activen un “patrón generador de ataque”, pero parece que son suficientemente generalizados para influir sobre los mecanismos adaptativos sensoriales, conductuales/motores y autonómicos y mantener la conducta y el estado interno con una óptima congruencia.

### 3.2.2. Corteza prefrontal (PFC)

La importancia de la PFC en el control inhibitorio de la agresión se ha observado principalmente en primates, incluidos humanos (Nelson y Trainor, 2007). La PFC envía proyecciones glutamatérgicas a numerosas áreas del cerebro que están relacionadas con la agresión, como el hipotálamo, amígdala y DRN (Hoover y Vertes, 2011; Peiron, Petit, Rampon, Jouvett y Luppi, 1998; Rosenkranz y Grace, 2002;). En roedores, la PFC desempeña también un papel en la regulación de la agresión. Entre las diferentes subáreas de la PFC, PFCm y la OFC son activadas en ratas y ratones que han estado involucrados en un encuentro agresivo entre machos (Haller et al., 2006; Hálasz et al., 2006; Wall et al., 2012), o al ganar en la prueba de dominancia en ratones (Wang et al., 2012). La activación de PFCm es mitigada en ratas aisladas socialmente tras 4 semanas de aislamiento (Wall et al., 2012). Además, lesiones bilaterales de la OFC aumentan la agresión entre ratas macho (De Bruin et al., 1983). Recientemente, se han utilizado técnicas optogenéticas con el objetivo de modular la actividad de las neuronas excitatorias de la PFCm durante el encuentro agresivo entre ratones macho. Y se ha visto que la activación de PFCm inhibe de manera específica la conducta agresiva entre machos, sin verse afectada ninguna otra conducta (Takahashi, Nagayasu, Nishitani, Kaneko y Koide, 2014). Por lo que se concluye que PFCm ejerce un rol inhibitorio importante en la agresión, siendo mantenida en niveles de agresión típicos de especie (Takahashi y Miczek, 2014). Los receptores serotoninérgicos, glutamatérgicos y GABAérgicos ejercen un importante papel en la modulación de la actividad de PFC y, por tanto, en la conducta agresiva.

### 3.2.3. Núcleo dorsal del rafe (DRN)

La serotonina, uno de los neurotransmisores tradicionalmente implicado en la agresión, se origina principalmente desde el DRN. En concreto, el DRN contiene la mayor acumulación de somas neuronales de 5-HT en el cerebro, y envía proyecciones hacia numerosas dianas diferenciadas, entre las que se incluye estructuras límbicas y corteza (Azmitia y Segal, 1978; Dahlström y Fuxe, 1964; Michelsen et al., 2007). En ratas, la expresión de c-Fos aumenta en las neuronas de 5-HT del DRN tras un encuentro agonístico (van der Vegt et al., 2003). La actividad de DRN modula por sí mismo la liberación de 5-HT a través de los autorreceptores, así como GABA, Glu, NE y neuropéptidos (Adell et al., 2002). La activación a través de microinyecciones de agonistas selectivos de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> en DRN reduce consistentemente la conducta agresiva en ratas y ratones, aunque los agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> disminuyen de manera concomitante la conducta motora, así como las interacciones sociales (Bannai et al., 2007; Faccidomo et al., 2008; Mos et al., 1993). Por otro lado, parece que la estimulación de los receptores GABAérgicos en el DRN tiene un efecto agresivo más específico. La administración de baclofen, agonista del receptor GABA-A, dentro del DRN aumenta la conducta agresiva entre ratones macho (Takahashi et al., 2010b). Curiosamente, la administración de muscimol, agonista de GABA-B, solo incrementa la conducta agresiva en los ratones tras consumir una cantidad modesta de alcohol (Takahashi et al., 2010a). Por el contrario, la administración intra-DRN de muscimol en rata reduce la conducta agresiva (van der Vegt et al., 2003), o bien no ejerce efecto alguno (Takahashi et al., 2010b). Este patrón de efectos sugiere que los distintos subtipos de receptores GABA están involucrados en la conducta agresiva intensificada a través de diferentes mecanismos. Estudios de microdiálisis *in vivo* han demostrado que la activación de receptores GABA-B en el DRN aumenta los niveles extracelulares de 5-HT en PFCm (Takahashi et al., 2010b). No obstante, todavía queda por determinar bajo qué condiciones las neuronas 5-HT de DRN son activadas o inhibidas durante los diferentes tipos de agresión. Es probable que los niveles basales de 5-HT y los cambios fásicos de 5-HT ejerzan diferentes papeles en los distintos tipos de agresión (Takahashi y Miczek, 2014).

### 3.2.4. Núcleo accumbens (NAc)

La conducta agresiva posee propiedades reforzantes para los machos dominantes (Fish, DeBold y Miczek, 2002, 2005). Microinyecciones de antagonistas de los receptores

dopaminérgicos D1 y D2 reducen esta respuesta operante, lo que sugiere que estas respuestas reforzantes en los encuentros agresivos están mediados por dichos receptores en el NAc (Couppis y Kennedy, 2008). El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico media el procesamiento de recompensa, además de la motivación aversiva, y está constituido por neuronas dopaminérgicas en el VTA y sus proyecciones hacia el NAc y otras regiones (Kelley et al., 2002). Estudios de microdiálisis *in vivo* muestran que los niveles de dopamina en NAc aumentan durante y después de las confrontaciones agresivas en las ratas macho (Ferrari et al., 2003; van Erp y Miczek, 2000). Tras repetidos encuentros agresivos a la misma hora cada día, las ratas residentes muestran incrementos anticipatorios de los niveles de DA y un descenso de 5-HT, en el NAc a la hora prevista del encuentro, sin necesidad de que este se produzca. Por otro lado, las ratas “derrotadas” también exhiben incrementos de liberación de DA en NAc (Anstrom, Miczek y Budygin, 2009). Por tanto, los incrementos de DA en NAc no indican solamente una señal de recompensa *per se*, sino que caracteriza tanto la reacción como la anticipación ante una confrontación agresiva (Miczek et al., 2007; Takahashi y Miczek, 2014).

### 3.2.5. Sistema olfativo y agresión

Para los roedores, el principal sentido que regula las conductas sociales es el olfato (Brennan y Keverne, 2004). La información olfativa sobre el intruso es procesado primero por el bulbo olfatorio y después proyecta hacia la amígdala a través del tracto olfatorio lateral. Así, el sistema olfatorio es el primer lugar donde se evalúa la calidad del oponente (Guillot y Chapouthier, 1996). Existen dos tipos de sistemas olfatorios: el principal y el accesorio. Mientras que el bulbo olfatorio principal recibe toda la información aromática, el bulbo olfatorio accesorio recibe de manera específica la información feromonal, que es importante para la comunicación entre especies (Dulac y Torello, 2003). Los roedores machos dominantes marcan el territorio con señales de olor (Desjardins et al., 2003); su orina contiene las feromonas que provocan la agresión (Chamero et al., 2007). Además, se han identificado dos compuestos volátiles de la orina que también pueden inducir la agresión entre-machos. Los receptores para las feromonas residen en las neuronas sensoriales del órgano vomeronasal (VNO) y envía sus axones al bulbo olfatorio accesorio. Se ha demostrado que lesiones en el VNO producen un amplio rango de déficits en las conductas sociales (Bean y Wysocki, 1989; Clancy, Coquelin, Macrides, Gorski y Noble, 1984). Igualmente, la delección de los genes de la señalización VNO reduce la conducta agresiva, e incluso la capacidad de discriminar entre sexos (Chamero et al., 2011; Keverne, 2002). Ratones KO para TRP2 (canal catiónico que se expresa exclusivamente en las neuronas sensoriales VPO)

exhiben una ausencia total de la actividad neuronal provocada por la orina (Leypold et al., 2002; Stowers, Holy, Meister, Dulac y Koentges, 2002). Asimismo, la deleción de los receptores de feromonas (VIR y V2R) da lugar a una disminución de la conducta agresiva (Chamero et al., 2007, 2011; Del Punta et al., 2002).

---

## 4. GLUTAMATO Y AGRESIÓN

---



Diversos estudios realizados con modelos animales han involucrado al neurotransmisor glutamato en la regulación de la conducta agresiva, especialmente a través de los estudios farmacológicos de los receptores ionotrópicos NMDA, así como de los receptores AMPA, (véase tabla 4.I). Asimismo, la investigación con ratones *knockout* y el uso de nuevas herramientas farmacológicas están ayudando a desvelar el papel de los receptores iGlu (Takahashi y Miczek, 2014).

Los estudios farmacológicos han mostrado que los antagonistas del receptor NMDA suelen tener efectos bifásicos sobre la agresión, dando lugar a un incremento de agresión con dosis bajas y una supresión de la agresión con dosis altas. Así, en los primeros trabajos en los que se examinó la administración de antagonistas del receptor NMDA del glutamato, como la fenciclidina (PCP) o la dizocilpina (MK-801), se evidenciaron cambios en la conducta agresiva de los animales, aunque con resultados contradictorios, observando un efecto tanto proagresivo como antiagresivo, dependiendo de los agentes farmacológicos utilizados, las dosis administradas y la especie animal elegida como sujetos experimentales (McAllister, 1990; Miczek y Hanney, 1994; Mustly y Consroe, 1982). Asimismo, Wilmot, Vanderwende y Spoerlein (1987) demostraron que los efectos de PCP sobre la conducta agresiva dependen de la duración del aislamiento social, así como de la edad de inicio de tal aislamiento y la dosis utilizada. En este sentido, Audet, Goulet y Doré (2009) constataron un aumento de la agresión en ratas tratadas subcrónicamente con PCP (10 mg/kg). En su investigación evaluaron el efecto que producía la administración durante 15 días de PCP sobre la agresión, utilizando para ello el modelo de agresión inducida por aislamiento. El tratamiento subcrónico con PCP mimetiza las conductas reminiscentes de la esquizofrenia; se observó que disminuye la iniciación de los contactos afiliativos con sus congéneres y aumentan las respuestas agresivas.

Por su parte, Belozertseva y Bepalov (1999), utilizando un modelo de agresión inducida por aislamiento, analizaron el efecto de agentes que actuaban sobre el receptor NMDA con características farmacodinámicas distintas: antagonistas no competitivos (PCP, MK-801), antagonistas con poca afinidad por el receptor NMDA (memantina y MRZ 2/579) y antagonistas competitivos (D-CPPene). Los resultados pusieron de relieve que, a dosis bajas, aunque sin diferencias significativas, se apreciaba una tendencia proagresiva tras la administración de antagonistas no competitivos del receptor NMDA. Todos los agentes que demostraron un efecto antiagresivo lo hacían a dosis a las que también producían déficits en la actividad motora, y la mayoría de ellos no aumentaba las conductas sociales no agresivas, a excepción del D-CPPene,

único antagonista competitivo evaluado. En un estudio posterior, Sukhotina y Beshpalov (2000) evaluaron el efecto que producía los bloqueadores del receptor NMDA, memantina y neramexane (MRZ 2/579), sobre la agresión provocada por el síndrome de abstinencia a la morfina, en el modelo de agresión inducida por aislamiento. Es bien sabido que el síndrome de abstinencia a los opioides aumenta la conducta agresiva en los roedores de laboratorio y los antagonistas que actúan sobre el receptor NMDA disminuyen la expresión de los síntomas del síndrome de abstinencia a la morfina en los animales de laboratorio. Los resultados mostraron que la administración periférica de ambos compuestos reducía de manera dosis dependiente la expresión de la conducta agresiva causada por el síndrome de abstinencia, mientras que no ejercía ningún efecto significativo sobre la intensidad de los contactos sociales no agresivos. Además, sólo afectaba a la conducta locomotora con las dosis más altas (memantina y MRZ 2/579: 30 mg/kg), siendo éstas superiores a las requeridas para los efectos antiagresivos (memantina: 10 mg/kg; MRZ 2/579: 5.6 y 10 mg/kg). Por otro lado, Newman et al. (2012) evidenciaron un aumento de la frecuencia de ataque, tras la administración de memantina y neramexane en interacción con el alcohol, usando el modelo de agresión residente-intruso. En cualquier caso, los animales controles que no fueron tratados con morfina o con alcohol no mostraron ningún efecto específico sobre la agresión debido a la memantina (Sukhotina y Beshpalov, 2000; Newman et al., 2012), sí en cambio debido a la ketamina (antagonista no competitivo del receptor NMDA) (Newman et al., 2012).

Por otro lado, se ha asociado el tratamiento con anabolizantes androgénicos esteroideos (EAA) con un aumento de la conducta agresiva. Se conoce que los NMDAR modulan los receptores androgénicos. Le Grevès et al. (1997) investigaron los efectos tras el tratamiento crónico, en ratas macho, con EEA sobre la expresión de ARNm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en el hipocampo, hipotálamo y corteza, lugares donde se expresan abundantemente. Los resultados mostraron que se producía una significativa disminución del ARNm que codifica la subunidad NR2A en el hipocampo e hipotálamo, pero no en la corteza. Una disminución de los niveles de ARNm para la subunidad NR2B se observó en el hipotálamo con la dosis más pequeña, pero en las otras áreas estudiadas no se evidenciaron cambios. En cambio, la subunidad NR1 no se vio afectada por el tratamiento. Así, los efectos del esteroide en la expresión del ARNm para las subunidades del receptor NMDA en el hipocampo e hipotálamo sugieren que están involucradas en la modulación de la conducta agresiva. De hecho, Zhao et al. (2009) comprobaron que se producía un aumento de la expresión de las subunidades NR2A y NR2B en

el hipocampo, mientras que se reducía la expresión de NR2A en la corteza prefrontal, en un modelo de agresión inducido por aislamiento en rata.

Finalmente, se ha intentado examinar el papel de los receptores NMDA mediante ratones *knockout*, pero desafortunadamente, la completa ablación de la expresión del receptor para las subunidades NR1 o NR2B es letal durante el periodo prenatal (Li, Erzurumlu, Chen, Jhaveri, y Tonegawa, 1994; Forrest et al., 1994). No obstante, se generó una línea de ratones mutantes que sólo expresaban alrededor de un 5% de los niveles normales de la subunidad NR1, que sobrevivía en la edad adulta y tenían un desarrollo normal. Estos ratones mostraban un gran déficit en investigación social, y por tanto, rara vez manifestaban conducta agresiva. Además, presentaban otras conductas anómalas como, por ejemplo, hiperactividad o falta de motivación para buscar comida (Duncan et al., 2004; Mohn et al., 1999). Así, estos cambios pleiotrópicos en otros varios fenotipos pueden contribuir a la reducción de la agresión.

Otra línea de investigación se ha centrado en la manipulación de la enzima dipeptidasa ácida (NAALADasa), que interviene en la formación de glutamato en el SNC. Esta enzima se caracteriza por hidrolizar al neuromodulador N-acetil-aspartilglutamato (NAAG) y convertirlo en glutamato y N-acetilaspártato, con lo que su inhibición impide la transformación de NAAG en glutamato, disminuyendo de este modo la cantidad de glutamato cerebral. Así, Lumley et al. (2004) observaron que tras la administración de GPI-5232, agente farmacológico que actúa inhibiendo la enzima NAALADasa, se producía un efecto antiagresivo, utilizando un modelo de agresión inducida por aislamiento. La inhibición de esta enzima provoca una disminución del glutamato cerebral por distintas vías. Por un lado, la no transformación de NAAG en glutamato hace que decaiga el nivel de glutamato en el SNC y, por otra parte, esta inhibición origina una acumulación de NAAG en el cerebro, por lo que esta sustancia podría actuar como agonista total para los receptores presinápticos mGlu3 del glutamato, siendo además un agonista parcial de los receptores NMDA.

Tabla 4.I. Estudios farmacológicos de los iGluR y la agresión.

iGluR	Fármaco	Acción	Especie	Modelo conductual	Resultados	Efectos adversos	Conclusión	Autores
NMDA	PCP (0,3, 1, 3 y 10 mg/kg)	Antagonistas no competitivos	Ratón	Agresión inducida por aislamiento	1- Inhibición de la expresión de la conducta agresiva (con las dosis más altas).	Ataxia	Los bloqueadores de los receptores NMDA no ejercen efectos selectivos sobre la conducta agresiva.	Belozertseva y Bespalov, 1999
	MK-801 (0,01, 0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg)							
	Memantina (1, 3, 10 y 30 mg/kg)	Antagonistas con poca afinidad			1- Sin efecto sobre la conducta agresiva.	Sin efectos adversos		
	MRZ 2/579 (0,3, 1, 3,2, 5,6 y 10 mg/kg)				1- Reducción de la agresión (3,2 y 5,6 mg/kg). 2- Aumento de sociabilidad (3,2 mg/kg).			
	D-CPPene (0,1, 0,3, 1, 3,2 y 5,6 mg/kg)	Antagonista competitivo						
NMDA	Memantina (1, 3, 10 y 30 mg/kg)	Antagonistas con poca afinidad	Ratón	Agresión inducida por aislamiento / modelo de dependencia	1- Disminución de la agresión provocada por el síndrome de abstinencia a la morfina (Memantina: 10 mg/kg; MRZ 2/579: 5,6 y 10 mg/kg).	Sin efectos adversos	Efectos antiagresivos específicos debido a la interacción de los antagonistas con los procesos desencadenados por el síndrome de abstinencia.	Sukhotina y Bespalov, 2000
	MRZ 2/579 (1, 3,2, 5,6 y 10 mg/kg)							
AMPA	CNQX (0,75, 1,5 y 3 mg/kg)	Antagonistas competitivos	Ratón	Agresión inducida por aislamiento / preselección inicial según los niveles basales de agresividad	1- Disminución del componente de "morder" en la conducta agresiva.	Aumento de la ansiedad	Los receptores AMPA están involucrados en la modulación de la agresión.	Vekovischeva et al., 2007
	NBQX (3,5, 7 y 10 mg/kg)							
	GYKI 52466 (2,5 y 5 mg/kg)	Antagonista no competitivo			1- Disminución de todo el repertorio de la conducta agresiva.			
AMPA	Topiramato (10, 20, 40 y 80 mg/kg)	Antagonista competitivo	Ratón	Modelo de agresión inducida por aislamiento	1- Disminución de las conductas ofensivas (amenaza y ataque) (20-80 mg/kg).	Sin efectos adversos	El bloqueo de los receptores AMPA modula la conducta agresiva.	Navarro et al., 2007
NMDA	PCP (1, 8 y 15 mg/kg)	Antagonista no competitivo	Rata	Agresión inducida por aislamiento / modelo de esquizofrenia	1- Aumento de la conducta agresiva con todas las dosis. 2- Disminución de los contactos afiliativos (8 y 15 mg/kg).	Sin evidencia	El bloqueo de los receptores NMDA modula la conducta agresiva.	Audet et al., 2009
NMDA	Memantina (1, 3, 10 y 17 mg/kg)	Antagonistas con poca afinidad	Ratón	Paradigma residente- intruso / modelo de autoadministración	1- Aumento de la conducta agresiva en interacción con el alcohol (1 y 3 mg/kg).	Sin efectos adversos	Los antagonistas de los receptores NMDA interaccionan con el alcohol dando lugar a un aumento de la conducta agresiva.	Newman et al., 2012
	MRZ 2/579 (0,3, 1, 3 y 10 mg/kg)				1- Aumento de la conducta agresiva en interacción con el alcohol (1 mg/kg) 2- Aumento general del arousal			
	Ketamina (5,6, 10, 17 y 30 mg/kg)	Antagonista no competitivo			1- Aumenta la conducta agresiva sin interaccionar con el alcohol (10 mg/kg). 2- Reduce la conducta agresiva en interacción con el alcohol (30 mg/kg).	1- Aumento de la conducta locomotora <i>per se</i> (10 mg/kg). 2- Reduce la conducta de exploración vertical al interaccionar con el alcohol (30 mg/kg).		
AMPA	NBQX (5 y 10 mg/kg)	Antagonista no competitivo	Ratón	Agresión inducida por aislamiento	1- Disminución de la conducta agresiva con todas las dosis utilizadas.	Sin efectos adversos	Los receptores AMPA están involucrados en la conducta agresiva.	Araki et al., 2014

En cuanto a los receptores AMPA, estos también han sido implicados en la regulación de la conducta agresiva. En concreto, en un primer estudio, Vekovischeva et al. (2004) encontraron una reducción de la conducta agonística en ratones machos que carecían de la subunidad GluRI de este receptor. En un trabajo posterior, se comparó el efecto de distintos antagonistas del receptor AMPA, dos de ellos competitivos y poco selectivos (CNQX y NBQX) y uno no competitivo y muy selectivo (GYKI 52466), sobre la conducta agresiva de dos grupos de ratones que diferían en sus niveles de agresión innata. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la administración de antagonistas competitivos disminuía el componente “morder” de la conducta de ataque en los dos grupos de ratones, mientras que la administración del antagonista no competitivo producía una disminución de todos los componentes de la conducta de ataque en ambos grupos. Aunque todos ellos ocasionaron una disminución de alguna categoría de la conducta agresiva, también incrementaron los niveles de ansiedad durante el encuentro agonístico (Vekovischeva et al., 2007). Asimismo, otros fármacos que actúan (al menos parcialmente) modulando la actividad de los receptores AMPA, como el topiramato, han demostrado también efectos antiagresivos en modelos animales (Navarro, Burón y Martín-López, 2007). Por su parte, Araki et al. (2014) han demostrado que el antagonista del receptor AMPA (NBQX) inhibe no solo la hiperactividad provocada por los encuentros sociales y los incrementos en la corteza prefrontal (PFC) de los niveles de DA y 5-HT, sino que disminuye la conducta agresiva y los déficits cognitivos observados en ratones criados en aislamiento. No obstante, en un estudio muy reciente, Shimizu, Kurosawa y Seki (2016) no han constatado efecto alguno del compuesto NBQX sobre la conducta agresiva inducida por aislamiento. Del mismo modo, tampoco han observado que inyecciones intra-amigdalinas del agonista de los receptores AMPA, S-AMPA, induzca conducta agresiva. Así, concluyen que quizás la conducta agresiva se deba a la regulación al alza de AMPAR en PFC y no en la amígdala. Por otro lado, Shimsek et al. (2006) informaron que ratones deficientes de la subunidad GluR2 no mostraban conducta agresiva. Incluso, el gen de la subunidad GluR3 parece que está relacionado con la agresión de los ratones, ya que Brodtkin, Goforth, Keene, Fossella y Silver (2002) han logrado identificar un QTL (locus de carácter cuantitativo), al comparar dos cepas de ratones que se diferenciaba en los niveles de agresividad. Esto último ha sido confirmado en un estudio reciente en el que Adamczyk et al. (2012) han demostrado que ratones *knockout* del receptor GluR3 exhibían un incremento de agresión inducido por aislamiento en el paradigma residente-intruso. No obstante, en el modelo de interacción social en un área neutral los animales mostraron un aumento de la conducta social, lo que sugiere que la falta del receptor GluR3 afecta al amplio espectro de conductas sociales en los roedores.

En roedores, se ha localizado actividad glutamatérgica en diversas regiones cerebrales implicadas en la conducta agresiva, incluyendo el hipotálamo o la amígdala medial (Fisher, Ricci y Melloni, 2007). Por ejemplo, en ratas, la denominada “área de ataque hipotalámica” (HAA) posee una densa actividad glutamatérgica (Hrabovszky et al., 2005), y la infusión de L-glutamato en una región homóloga hipotalámica en el gato activa una respuesta agresiva (Brody, DeFeudis y DeFeudis 1969). En este sentido, en ratas, la coinfección de un agonista del receptor kainato y un antagonista GABA A en el HAA parece elicitar conductas de ataque (Haller et al., 1998). Respecto a la familia de receptores AMPA, como señalamos con anterioridad, la subunidad GluRI parece jugar un destacado papel en la facilitación de la agresión, habiéndose descrito expresión ARNm para dicha proteína en regiones hipotalámicas y límbicas, incluyendo los núcleos hipotalámicos anterior, medial y ventrolateral, septum lateral, y núcleos amigdaloides. Asimismo, los receptores que contienen la subunidad GluRI colocalizan dentro de neuronas que expresan el receptor androgénico en el hipotálamo y estructuras límbicas (Diano, Naftolin y Horvath, 1997). Además, Fischer et al. (2007) encontraron un aumento del número de neuronas que expresaban la subunidad GluRI en el hipotálamo ventrolateral y núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), en animales tratados con esteroides gonadales. Por otra parte, la activación mediada por los receptores AMPA de la corteza prefrontal medial juega un papel importante en la jerarquía social y conducta agresiva (Wang et al., 2011).

En último lugar, y referente a los receptores kainato, se ha visto que los ratones nulos del gen de la subunidad GluR6 muestran, entre otros, un aumento de la conducta agresiva. Además, presentan bajos niveles de los receptores GluR5 y KA2 en la corteza prefrontal e hipocampo (Shaltiel et al., 2008).

En contraste con los receptores ionotrópicos, el posible papel de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) en la modulación de la agresión es escasamente conocida. Así, Navarro, Postigo, Martín-López y Burón (2006), empleando el modelo de agresión inducida por aislamiento, encontraron que la administración aguda de 2-metil-6-(feniletinil) piridina (MPEP), antagonista selectivo de los receptores mGlu5, reducía la conducta ofensiva (amenaza y ataque) con todas las dosis utilizadas (5-25 mg/kg) en ratones macho, sugiriendo un papel de estos receptores en la regulación de la agresión. A tenor de estos resultados, en una investigación similar, Huertas, Martín-López, Burón y Navarro (2007), estudiaron los efectos de la administración de (RS)-2-cloro-5-hidroxfenilglicina (CHPG), agonista selectivo de los receptores mGlu5. En contra de lo esperado, los resultados indicaron que la administración de

CHPG no produjo efectos significativos sobre la conducta agonística con ninguna de las dosis utilizadas (0.75-12 mg/kg), lo que podría deberse a las características propias del ligando utilizado (agonista parcial *versus* agonista total), al rango de dosis elegido o al intervalo utilizado entre la administración del fármaco y la evaluación de sus efectos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en otro estudio preliminar con un ligando selectivo de los receptores mGlu2/3 (LY379268) sugieren que estos receptores podrían estar también implicados en la agresión (Navarro, Luque y Martín-López, 2009). Concretamente, observaron una reducción significativa de la conducta de ataque con las dosis de 2 y 4 mg/kg pero, con la dosis más alta, el efecto antiagresivo se acompañó de un incremento significativo de la inmovilidad, indicando una acción no selectiva del fármaco para esa dosis. En consonancia con estos resultados se encuentra el trabajo de Newman et al. (2012). Estos investigadores, utilizando un modelo de agresión incrementado por instigación, observaron que el compuesto LY379268 reducía de forma significativa la frecuencia de amenaza (1 y 3 mg/kg) y ataque (3 mg/kg), aunque los efectos eran inespecíficos, ya que reducía la conducta locomotora y exploratoria (1 y 3 mg/kg). En este sentido, se ha constatado que JNJI6259685, antagonista del receptor mGlu1, reduce de forma significativa la agresión intensificada por instigación (Martín-López, Infante, Cavas y Navarro, 2013). En concreto, una dosis aguda de 0.5 mg/kg del ligando JNJI6259685 revertía tanto la disminución de la latencia de ataque provocada por la instigación, como el aumento de la frecuencia y duración de los ataques. Por otra parte, Masugi-Tokita, Flor y Kawata (2015) han encontrado una reducción severa de la agresión entre machos en animales KO para el receptor mGlu7, utilizando el paradigma de residente-intruso. Además, estos animales presentaban alteraciones en otras conductas sociales. Descubrieron que existía una importante reducción de actividad neuronal (mediante el marcador c-Fos) en el lecho de la estría terminal (BNST). Asimismo, reprodujeron al completo el fenotipo de estos ratones mediante la administración intra-BNST del antagonista no competitivo MMPIP. Por tanto, concluyeron que el receptor mGlu7 debe actuar como un potenciador de la actividad neural en el BNST y que es muy importante para la agresión entre machos.

Finalmente, Takahashi et al. (2015) observaron que microinyecciones de L-glutamato dentro del núcleo dorsal del rafe (DRN) aumentaba los ataques de manera dosis-dependiente hacia el intruso, utilizando un modelo de agresión intensificada en ratones macho. Estudios de microdiálisis *in vivo* mostraron que la liberación de Glu aumentaba en DRN durante el encuentro agresivo, y el nivel de Glu se incrementaba aún más cuando el animal estaba implicado

en la conducta de agresión intensificada tras la instigación social. De hecho, PFC envía proyecciones glutamatérgicas a DRN, así como a otras estructuras relacionadas con la agresión, como el hipotálamo, la amígdala y PAG. Por lo que es probable que PFCm inhiba la actividad del circuito neuronal que está implicada en la ejecución de la conducta agresiva (Takahashi, Nagayasu, Nishitani, Kaneko y Koide, 2014).



---

## 5. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

---

Investigar el sustrato neuroquímico de la agresión es crucial, tanto por conocer la base biológica de la agresión, como por descubrir nuevas posibilidades terapéuticas para numerosos trastornos psiquiátricos, como el trastorno de personalidad límite, personalidad antisocial, bipolaridad o esquizofrenia entre otros, ya que los episodios agresivos son una característica común que se dan en estos trastornos (Dolenc et al., 2015; Lobbestael, Cima y Lemmens, 2015; Mancke, Bertsch y Herpertz, 2015; Newhill, Eack y Mulvey, 2009; Volavka, 2013, 2014).

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante del sistema nervioso central, y su señalización central y periférica incluye múltiples transportadores, así como receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Eulenburg y Gomeza, 2010; Kew y Kemp, 2005; Sato, Tamba, Ishii y Bannai, 1999). En los últimos años se aprecia un interés creciente por conocer la implicación de este neurotransmisor en la regulación de la conducta agresiva. Los primeros estudios se centraron en estudiar el papel que juegan los receptores ionotrópicos de glutamato en la agresión (Belozertseva y Bespalov, 1999; Mc Allister, 1990; Miczek y Hanney, 1994; Mustly y Consroe, 1982; Wilmot et al., 1987). Actualmente, su relación con la modulación de la agresión sigue sin estar clara, ya que los resultados son contradictorios. Por un lado, se ha constatado que el antagonismo de los receptores NMDA y AMPA reduce la conducta agresiva (Araki e tal., 2014; Navarro et al., 2007; Sukhotina y Bespalov, 2000; Vekovischeva et al., 2007), mientras que otros estudios evidencian un aumento de la agresión (Audet et al., 2009; Newman et al., 2012).

A diferencia de los receptores ionotrópicos, son escasos los estudios que han analizado el rol que ejercen los distintos grupos de receptores metabotrópicos de glutamato (grupo I, II y III) sobre la conducta agresiva. Navarro et al. (2006) encontraron que la administración aguda de un amplio rango de dosis (5-25 mg/kg) de MPEP, antagonista selectivo del receptor mGlu5, reducía de manera significativa las conductas ofensivas (amenaza y ataque) en ratones macho en un modelo de agresión inducida por aislamiento. Por el contrario, Huertas et al. (2007), no observaron cambios sobre la conducta agresiva tras la administración de CHPG (agonista del receptor mGlu5) empleando el mismo modelo agresión. Por otra parte, en un estudio preliminar con un compuesto selectivo de los receptores mGlu2/3 (LY379268) se observó un efecto antiagresivo (reducción de la conducta de ataque con dosis de 2 y 4 mg/kg), aunque la dosis más alta produjo también incrementos en la conducta de inmovilidad, sugiriendo una acción antiagresiva no selectiva (Navarro et al., 2009).

Este trabajo de investigación se propone como objetivo general el estudio del papel de los diferentes receptores metabotrópicos del glutamato en la regulación de la conducta agresiva en ratones machos (Tablas 5.1 y 5.2).

Para ello, nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

- I. Analizar la relación del grupo I de receptores mGluI y la conducta agresiva.
  - a. Examinaremos el efecto de la administración aguda de JNJI6259685 (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/kg), un antagonista selectivo del receptor mGluI, en la modulación de la conducta agresiva (experimento 1).

Cabe esperar que la administración de este fármaco produzca un efecto antiagresivo, reduciendo el tiempo acumulado en conductas ofensivas (amenaza y ataque), ya que mGluRI se encuentra localizado fundamentalmente a nivel postsináptico e inhibirá (directa o indirectamente) la excitación neuronal en áreas relacionadas con la agresión.

2. Analizar el papel del grupo III de receptores mGlu (mGlu7 y mGlu8) en la regulación de la conducta agresiva.

Se utilizarán ligandos específicos de los distintos subtipos de receptores mGlu de este grupo para poder investigar su posible participación en el control de la agresión. Y se empleará un ligando potente y selectivo del receptor mGlu8 que permite analizar al mismo tiempo la acción del bloqueo de los receptores AMPA. Así:

- a. Se estudiará el efecto de la administración de AMN082 (0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/kg), un ligando agonista selectivo del receptor mGlu7, sobre la conducta agresiva (experimento 2).
- b. Se evaluará el efecto de la administración de (S)-3,4-DCPG (2.5, 5 y 10 mg/kg), agonista selectivo del receptor mGlu8, sobre la conducta agresiva en ratones machos (experimento 3).
- c. Se comprobará la acción del (RS)-3,4-DCPG (5, 10 y 20 mg/kg) sobre la conducta agresiva en ratones machos. El ligando (RS)-3,4-DCPG es un antagonista del receptor AMPA y agonista del receptor mGlu8 (experimento 4).

3. Analizar el papel del grupo II de receptores mGlu (mGlu2 y mGlu3) en la regulación de la conducta agresiva.
  - a. Se estudiarán los efectos de la administración aguda de LY654740 (4, 8, 12 y 16 mg/kg), un ligando agonista del receptor mGlu2/3, sobre la conducta agonística en ratones macho (experimento 5).
  
4. Analizar el curso temporal que siguen los efectos de la administración subcrónica (7 días) de JNJI6259685 en la conducta agonística en ratones machos.
  - a. Estudiaremos el posible desarrollo de tolerancia a los efectos agudos observados sobre la conducta agresiva del ligando selectivo del receptor mGluI JNJI6259685 (experimento 6).
  
5. Examinar el efecto de la administración aguda y subcrónica (7 días) del ligando JNJI6259685 sobre la actividad c-Fos cerebral tras interacciones agonísticas entre ratones, y compararlos a su vez con aquellos que no han pasado por la experiencia agonística y que han permanecido agrupado.
  - a. Realizaremos un estudio a lo largo del eje rostro-caudal, analizando la inmunorreactividad para c-Fos en diferentes regiones cerebrales implicadas en la conducta agresiva (experimento 6). Se analizarán las siguientes estructuras: corteza prelímbica, infralímbica y cingulada; septum lateral dorsal y ventral; núcleos hipotalámicos paraventricular, anterior y ventromedial; amígdala basolateral y medial; área tegmental ventral; y, por último, sustancia gris periacueductal anterior, lateral y dorsolateral.

Tabla 5.1. Ligandos de los receptores mGlu empleados en los distintos experimentos.

GRUPO MGLUR	FÁRMACO	DOSIS	ESTUDIO REALIZADO
Grupo I	JNJ16259685, antagonista mGluI	0.125-8 mg/kg	Evaluación conductual
Grupo II	LY354740, agonista mGlu2/3	4-16 mg/kg	Evaluación conductual
Grupo III	AMN082, agonista mGlu7	0.5-8 mg/kg	Evaluación conductual
	(S)3,4-DCPG, agonista mGlu8	2.5-10 mg/kg	Evaluación conductual
	(RS)3,4-DCPG, antagonista	5-20 mg/kg	Evaluación conductual

Tabla 5.2. Diseño del experimento 6.

CONDICIÓN EXPERIMENTAL	AGUDO VS SUBCRÓNICO	DOSIS	ESTUDIO REALIZADO
ASLADOS	JNJ16259685 1 DÍA vs JNJ16259685 7 DÍAS	0.25-1 mg/kg	Evaluación conductual /c-Fos
AGRUPADOS	JNJ16259685 1 DÍA vs JNJ16259685 7 DÍAS	0.25-1 mg/kg	c-Fos

---

## 6. METODOLOGÍA

---

## 6.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones albinos machos de la cepa Swiss OF.I, con 22-24 gramos de peso a la llegada al laboratorio, adquiridos en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad Málaga. A la llegada a nuestro laboratorio, todos los animales fueron alojados en grupos de 5 durante una semana para permitir su adaptación a nuestras instalaciones y al ciclo de luz/oscuridad impuesto (luz: 20.00h - 8.00h), antes de iniciar el período de aislamiento. Transcurrido el período de adaptación, la mitad de los animales fueron empleados como animales experimentales y controles, siendo alojados individualmente durante un período de 30 días (modelo de agresión inducida por aislamiento) en jaulas de plástico transparentes (Tecniplast-Letica, Madrid) de 24 x 13.5 x 13 cm. Una vez finalizado el período de aislamiento, estos animales fueron distribuidos aleatoriamente a las distintas condiciones experimentales. La otra mitad se utilizaron como oponentes “anósicos” (anosmia producida por sulfato de zinc al 4%) y fueron alojados en grupos de 5 en jaulas de las mismas características que las anteriores hasta el momento de la realización de la prueba conductual. Para todos los animales la comida y la bebida se administraron *ad libitum*. Las condiciones ambientales del laboratorio donde estaban ubicados los animales fueron cuidadosamente controladas, manteniéndose una temperatura (20 °C) y humedad constantes. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante el ciclo de oscuridad de los animales y de acuerdo con las principales reglas de cuidado y uso de Animales de Laboratorio aprobado por el Consejo Directivo de las Comunidades Europeas del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC).

## 6.2. FÁRMACOS (véase tabla 6.2.I)

### 6.2.1. JNJI6259685

Es un antagonista selectivo no competitivo del receptor mGluI. Inhibe la movilización de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) inducida por glutamato con una concentración inhibidora media ( $\text{CI}_{50}$ ) de  $3.24 \pm 1.00$  en rata o  $1.21 \pm 1.21$  en humano. Presenta una constante de inhibición ( $\text{K}_i$ ) de  $0.34 \pm 0.20$  nM. En los cultivos cerebelares, JNJI6259685 inhibe la producción de fosfoinosítoles con un  $\text{CI}_{50}$  de  $1.73 \pm 0.40$  nM. Administrado subcutáneamente muestra una ocupación central altamente potente de los receptores mGluI en el cerebelo y tálamo con una concentración efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ) de 0.040 y 0.014 mg/kg, respectivamente. En resumen, muestra una alta selectividad y potencia para los receptores mGluI, tanto en roedores como en humanos. Además,

atraviesa la barrera hematoencefálica de forma muy rápida y ocupa los receptores centrales de mGluI incluso con dosis muy bajas (Lavreysen et al., 2004b).

Su fórmula molecular es  $C_{20}H_{23}NO_3$  (Fig. 6.2.1).

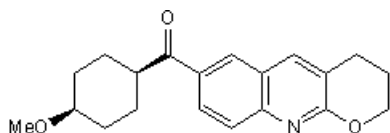


Figura 6.2.1. JNJ16259685

## 2.2. AMN082.

Es un modulador alostérico positivo del receptor mGlu7. Inhibe la acumulación de AMPc y estimula la unión de  $GTP\gamma S$  ( $CE_{50} = 64-290$  nM). Es oralmente activo y atraviesa la barrera hematoencefálica fácilmente (Mitsukawa et al., 2005).

Su fórmula molecular es  $C_{28}H_{28}N_2 \cdot 2HCl$  (Fig. 6.2.2).

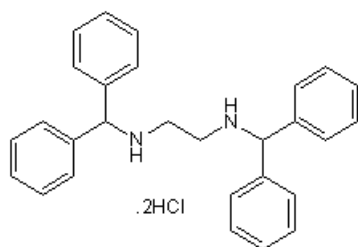


Figura 6.2.2. AMN082

## 2.3. (S)-3,4-DCPG.

Es un agonista potente y selectivo del receptor mGlu8. Posee una  $CE_{50}$  de 31 nM.

Su fórmula molecular es:  $C_{10}H_9NO_6$  (Fig. 6.2.3).



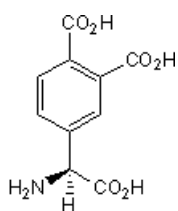


Figura 6.2.3. (S)-3,4-DCPG

#### 2.4. (RS)-3,4-DCPG.

Es un agonista potente y selectivo del receptor mGlu8 y antagonista del receptor ionotrópico AMPA. Es 100 más potente que sus enantiómeros (S)-3,4-DCPG y (R)-3,4-DCPG por separado (Tomas, Clayton y Jane, 1997).

Su fórmula molecular es:  $C_{10}H_9NO_6$  (Fig. 6.2.4).

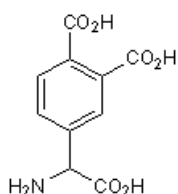


Figura 6.2.4. (RS)-3,4-DCPG

#### 2.5. LY354740.

Es un agonista potente y selectivo de los receptores metabotrópicos del grupo II. En los receptores de humano mGlu2 produce más de un 90% de supresión de AMPc estimulado por forskolina con una  $CE_{50}$  de  $5.1 \pm 0.3$  nM, siendo 6 veces menos potente para activar los receptores mGlu3 ( $CE_{50} = 24.3 \pm 0.5$  nM). LY354740 tiene una potencia y selectividad similar para las ratas (Schoepp et al., 1997). Posee una  $K_i = 0.8$  (Moore, Rees y Monn 1999).

Su fórmula molecular es:  $C_8H_{11}NO_4$  (Fig. 6.2.5.)

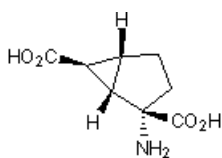


Figura 6.2.5. LY354740

Tabla 6.2.I. Fármacos.

Fármacos	Receptor	Acción	Mecanismo de transducción	CI50/CE50
JNJ 16259685	mGluI	Antagonista	↑ PLC	0,55nM
LY 354740	mGlu2/3	Agonista	↓ AC	5,1 y 24,3 nM
AMN 082	mGlu7	Agonista	↓ AC	64-290 nM
(S)-3,4-DCPG	mGlu8	Agonista	↓ AC	31 nM
(RS)-3,4-DCPG	AMPA/mGlu8	Antagonista/Agonista	↓ AC	

NOTA: Todos los fármacos se obtuvieron a través de la casa comercial Tocris y se diluyeron en suero fisiológico con dimetilsulfóxido (DMSO), a un volumen constante de 10 ml/kg. La concentración de DMSO vino determinada por la solubilidad del fármaco.

### 6.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 6.3.I. Estudios conductuales: agresión

Los encuentros agonísticos entre los animales aislados (experimentales y controles) y los oponentes anónimos tuvieron lugar en un área neutral. Como zona neutral se utilizó un recipiente de cristal transparente con dimensiones de 50 x 26 x 30 cm. Tras la realización de cada encuentro se renovaba el serrín de dicho recipiente, con el fin de evitar posibles interferencias de olores. Antes de comenzar la prueba conductual se mantenía a los dos animales en extremos opuestos del área neutral durante un período de adaptación de 1 minuto, tras lo cual se retiraba el separador y daba comienzo la prueba conductual, que duraba 10 minutos. Todos los encuentros agonísticos fueron grabados en vídeo para su posterior análisis etológico mediante un programa de ordenador diseñado al efecto (Brain, McAllister y Walmsey, 1989), lo que facilitó la estimación de la frecuencia y el tiempo asignado a las diez categorías generales conductuales. Todas las pruebas conductuales se realizaron a los 30 o 60 minutos tras la administración del fármaco, iniciándose los encuentros agresivos en la segunda hora del período de oscuridad (y por tanto de actividad) de los ratones.

Las diez categorías conductuales analizadas (Fig. 6.3.I) fueron las siguientes: (1) Cuidado corporal (aseo abreviado, autoaseo, lavado, rascarse); (2) Escarbar (escarbar, escarbar hacia delante, escarbar hacia atrás); (3) Exploración no social (deambulación, salto, erguido, erguido contra la pared, ojeo); (4) Exploración a distancia (aproximación, atención, ida y vuelta,

Figura 6.3.I. Repertorio conductual del ratón.

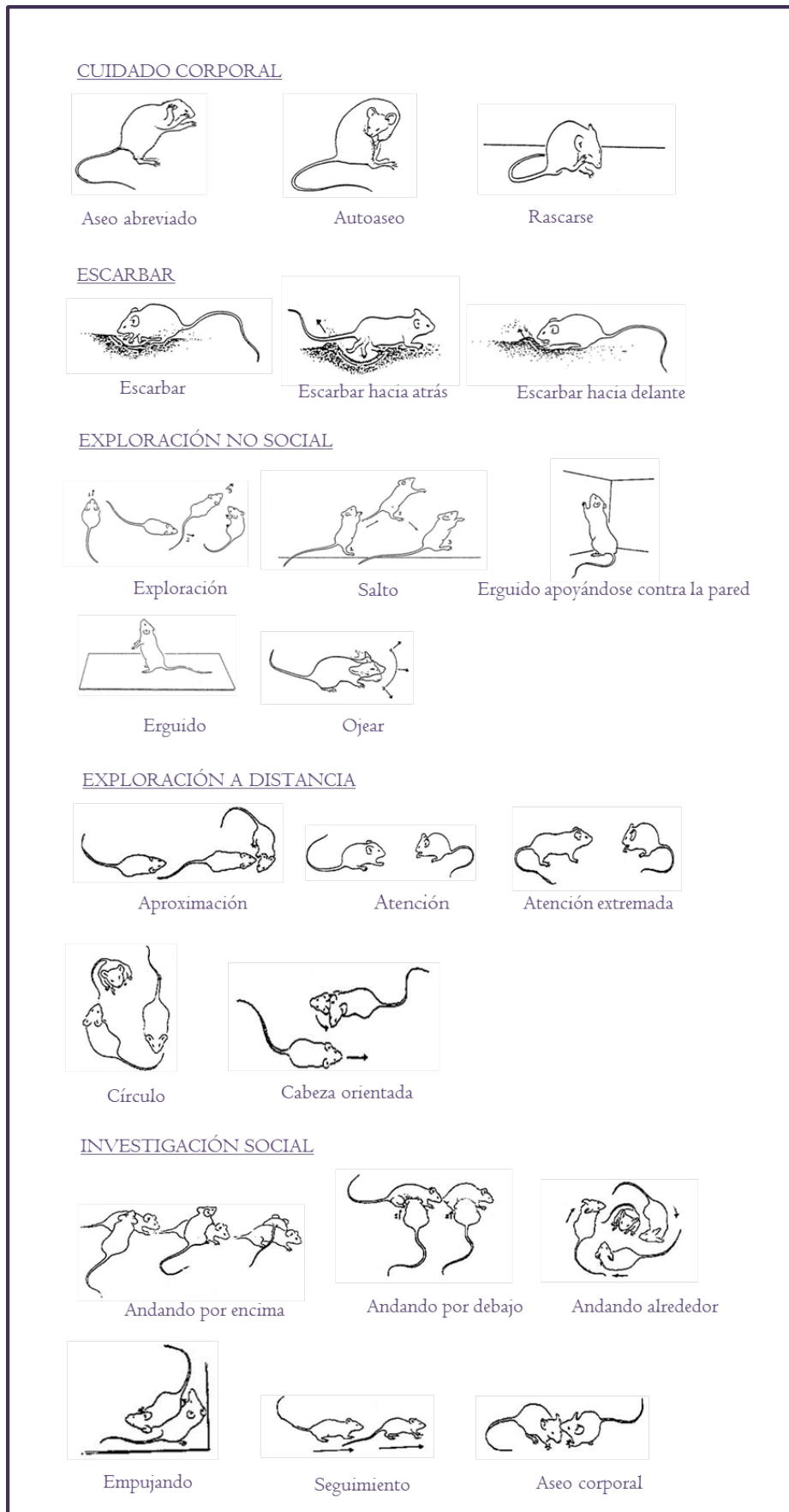
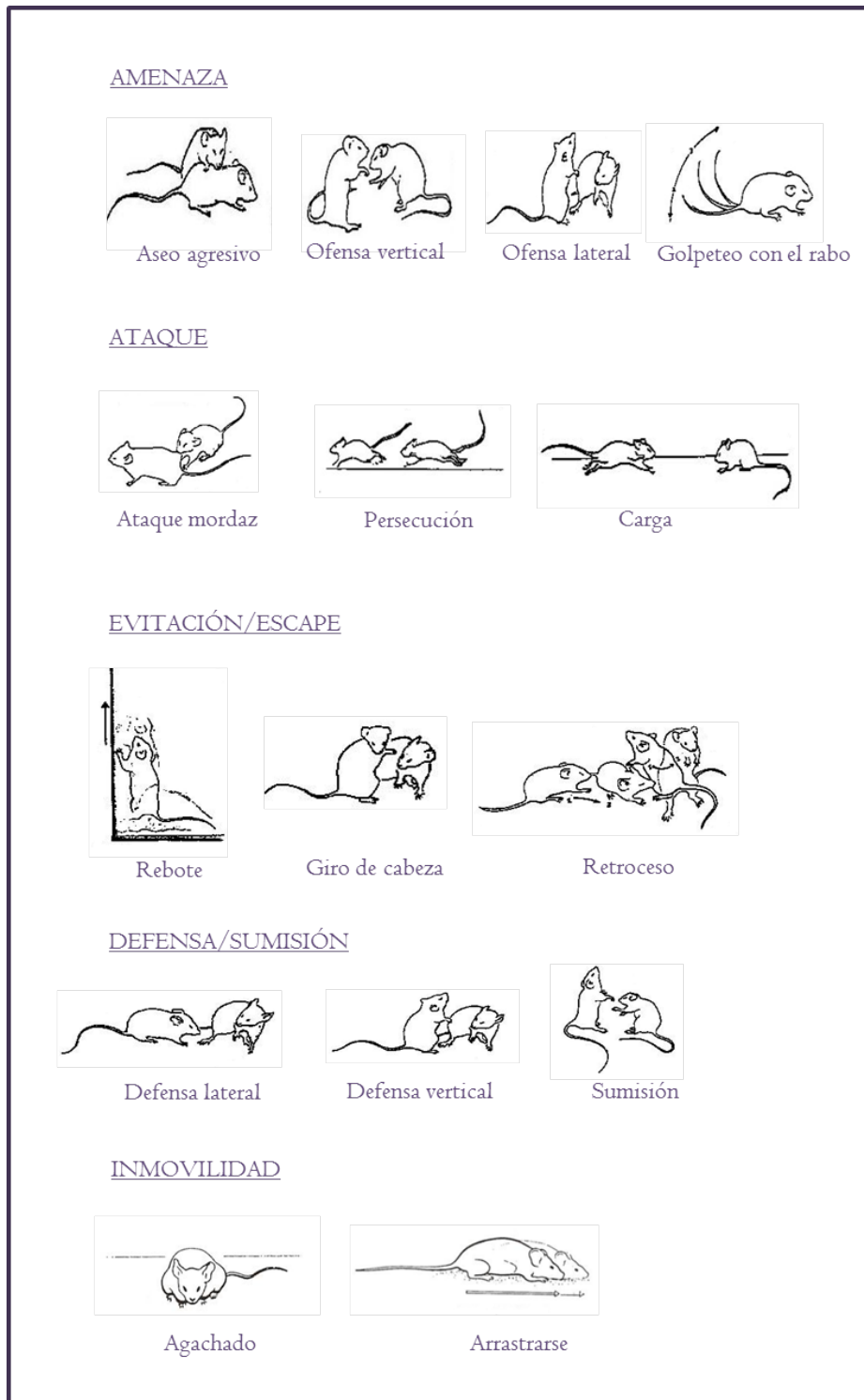


Figura 6.3.I (continuación). Repertorio conductual del ratón.



atención extremada, cabeza orientada); (5) Investigación social (pasar por encima, pasar por debajo, rodeo, aseo de la cabeza, olfateo corporal, olfateo de la nariz, olfateo anogenital, seguimiento, empujando, aseo corporal); (6) Amenaza (aseo agresivo, ofensa vertical, ofensa lateral, golpeteo con el rabo); (7) Ataque (ataque mordaz, persecución, carga); (8) Evitación/huida (alejamiento, retirada, salto, acorralado contra la pared, salto junto a la pared, sobresalto, giro de la cabeza, retroceso); (9) Defensa/sumisión (defensa lateral, defensa vertical, sumisión vertical), y (10) Inmovilidad (agachado, arrastrarse). Cada categoría representa una suma de diferentes elementos y posturas. Una descripción más detallada de estas categorías, así como de sus elementos constituyentes, se puede encontrar en Brain et al. (1989). Este procedimiento experimental permite una completa cuantificación de los elementos conductuales mostrados por los sujetos durante el encuentro agonístico. La evaluación conductual se efectuó tan sólo sobre las conductas exhibidas por el animal experimental. La valoración se realizó de manera “ciega”, no conociendo inicialmente el investigador a qué condición experimental pertenecía cada animal evaluado.

#### *Modelo de agresión inducida por aislamiento y descripción de la anosmia*

En nuestra investigación hemos empleado el modelo de agresión inducida por aislamiento, considerado uno de los modelos de elección para provocar conductas ofensivas entre ratones machos. El procedimiento seguido consiste en alojar a los animales machos en jaulas individuales durante un periodo de 30 días, durante las cuales disponen de comida y bebida *ad libitum*. Pasado este tiempo, se realizan los encuentros conductuales de agresión cuya duración es de 10 minutos. El animal dominante muestra conductas de amenaza y ataque dirigidas hacia el oponente, mientras que el subordinado no ataca y adopta posturas defensivas (Brain, Benton, Childs y Parmigiani, 1981; Miczek, Maxson, Fish y Faccidomo 2001).

Numerosas evidencias implican al sistema olfatorio en el desencadenamiento de la conducta agresiva en roedores. Así, se ha demostrado que una vez extirpados los bulbos olfatorios, los animales ya no manifiestan conductas ofensivas, ni siquiera al ser mordidos por miembros de su misma especie (Bergvall et al., 1991). El procedimiento más habitual para producir una anosmia periférica (y transitoria) consiste en administrar sulfato de zinc (al 4%) a través de los orificios nasales, lo que origina una necrosis reversible del epitelio nasal. La razón por la cual los ratones machos no luchan contra sus oponentes reside, probablemente, en que no pueden oler una feromona presente en la orina de los ratones, que constituye una señal

desencadenante de la conducta ofensiva en ratones con un olfato normal (Donat, Krisiak y Sulcova, 1994; Mugford y Novell, 1970; Tachikawa, Yoshihara y Kuroda, 2013; Tirindelli, Dibattista, Pifferi y Menini, 2009). Así, en un encuentro con un ratón “anósmico” la lucha será siempre unidireccional y fácil de cuantificar (Brain et al., 1981; Liebenauer y Slotnick, 1996). En nuestro caso, la anosmia se llevó a cabo mediante instilación de un volumen de 0.025 ml. de sulfato de zinc al 4% en cada orificio nasal de los roedores. Este procedimiento se efectuó los días 1 y 3 previos a la realización de cada prueba conductual.

### 6.3.2. Estudios inmunohistoquímicos: c-Fos

Se usaron técnicas inmunohistoquímicas para la cuantificación de cambios en la expresión de factores de transcripción. Así, el análisis de la expresión c-Fos tras el tratamiento de JNJI6259685 se realizó mediante esta técnica, cuantificando el número de núcleos inmunorreactivos para el factor de transcripción c-Fos.

#### 6.3.2.1. Preparación del tejido para microscopía óptica

##### 6.3.2.1.1. Fijación del tejido

Los animales se anestesiaron profundamente mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (*Abbott*, 60 mg/kg, i. p) y posteriormente se perfundieron transcardialmente con ayuda de una bomba de perfusión (Dinko, D25V). Primero, se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo y se hizo pasar una solución tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (PBS) (véase Apéndice II.2.1). Para el drenaje, se hizo una incisión en la aurícula derecha. Seguidamente se pasó la solución fijadora, paraformaldehído al 4% en tampón fosfato PB 0,1 M, pH 7,4 (véase Apéndice II.2.1). Se utilizaron aproximadamente unos 200 ml de solución fijadora por cada animal.

Posteriormente se extrajeron los cerebros y se postfijaron por inmersión durante 24 horas en la misma solución fijadora de la perfusión a temperatura ambiente y en agitación.

### 6.3.2.1.2. Crioprotección

Para preservar la estructura del tejido durante la congelación se sometió a los cerebros a un proceso de crioprotección. Para ello, tras lavar los cerebros en abundante PBS con el fin de eliminar los restos del fijador (3 lavados de 10 minutos cada uno), se pasaron a una solución de sacarosa al 30% con azida sódica al 0.02% en PBS (véase Apéndice II.2.2). Se mantuvieron a 4°C y en agitación suave durante 72 horas. Finalmente, se preservaron a 4°C hasta su posterior procesamiento.

### 6.3.2.1.3. Congelación de los cerebros y obtención de las secciones

Una vez congelados los cerebros con nieve carbónica (para una congelación rápida y así evitar la formación de cristales), se obtuvieron las secciones coronales de 30 µm de grosor con un microtomo de congelación (modelo CM 1325, Leica). Estas secciones se recogieron de forma seriada en placas multipocillos (Fig. 6.3.2.I. (a)), que contenían una solución de PBS con azida sódica al 0.02% (técnica “free-floating”, en flotación). Las secciones se distribuyeron en 12 series de modo que en cada compartimento se encontraba una sección representativa de cada nivel del eje rostro-caudal del cerebro, por lo que entre secciones consecutivas de un mismo compartimento había una diferencia de 360 µm. Por tanto, cada pocillo tiene una representación de 1/12 parte del total de cerebro. Las placas que contenían las secciones fueron almacenadas a 4 °C, renovando regularmente el tampón PBS con azida sódica (con el fin de evitar el crecimiento fúngico), hasta su posterior procesamiento con la técnica inmunohistoquímica para microscopía óptica convencional.

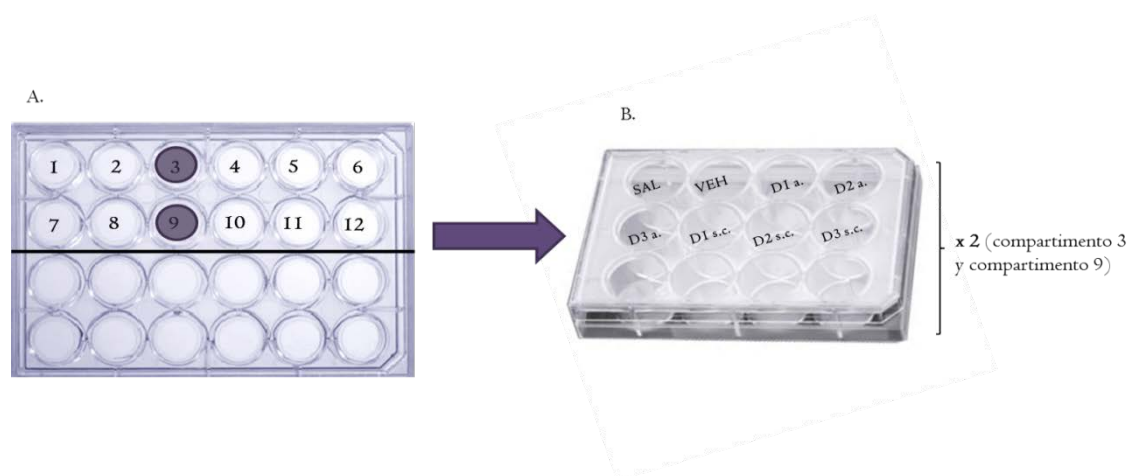


Figura 6.3.2.I. (a) Seriado de los cortes y (b) organización del tejido de los distintos grupos para los experimentos inmunohistoquímicos.

### 6.3.2.2. Técnica inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistoquímicas aprovechan las características de la reacción antígeno-anticuerpo para detectar la presencia de una o varias moléculas en un tejido. Con el fin de amplificar la señal obtenida se pueden utilizar anticuerpos secundarios biotilados y posteriormente acoplados a moléculas de extravidina-peroxidasa.

#### 6.3.2.2.1. Anticuerpo primario

El anticuerpo primario utilizado en este trabajo fue anti-c-Fos. Se diluyó en una solución de PBS con Tritón X-100 al 0.2% y azida sódica al 0.02%. La información detallada se recoge a continuación:

Anticuerpo	Especie inmunizada	Secuencia/Especie Anigénica	Casa comercial Referencia	Dilución
Anti c-Fos	Conejo	Péptido N-terminal Humano	Santa Cruz Biotechnology sc-52	1:1000

#### 6.3.2.2.2. Protocolo de la técnica inmunohistoquímica para microscopía óptica

La técnica inmunohistoquímica se realizó simultáneamente a una serie rostro-caudal completa del cerebro de cada animal (véase Figs. 6.3.2.2-6.3.2.7). Se realizaron dos experimentos idénticos para obtener finalmente una representación rostro-caudal de 1/6 parte del total del cerebro, de forma que en ella estuviera el suficiente número de secciones de todas las estructuras a estudiar para la posterior cuantificación. Las secciones coronales flotantes se procesaron con algunas variaciones siguiendo el método convencional de la avidina-biotina (Hsu et al., 1981).

En primer lugar se inactivó la peroxidasa endógena tratando las secciones con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación el tejido se lavó abundantemente (tres lavados de 10 minutos) con PBS. Posteriormente, las secciones se incubaron en el anticuerpo primario durante 24 horas.



Transcurrido el periodo de incubación, se lavaron las secciones con PBS (3 lavados de 10 minutos) y se incubaron durante una hora en anticuerpo secundario biotinilado dirigido contra el anticuerpo primario para la detección de la unión específica de éste al tejido [anti-IgG de conejo desarrollado en cabra (Vector)]. El anticuerpo secundario se diluyó a una concentración de 1:500 en PBS con Tritón X-100 al 0.2% y azida sódica al 0.02%. Posteriormente se procedió al lavado del tejido con PBS (3 lavados de 10 minutos) y seguidamente se incubó durante una hora en extravidina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) diluida a 1:2000 en PBS con Tritón X-100 al 0.2%. Para la visualización de la reacción de la peroxidasa, las secciones se incubaron en una solución de revelado DAB (3-3'Diaminobenzidina, Sigma Aldrich) diluido en PBS 0.2 mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01%. La reacción se intensificó con sulfato amónico de níquel a una concentración de 0.8 mg/ml. El tiempo de incubación de la solución de revelado viene determinada por la intensidad de la señal inmunohistoquímica deseada (máxima señal con el mínimo fondo inespecífico).

Finalmente, tras lavar las secciones con PBS, éstas se montaron sobre portaobjetos gelatinados (véase Apéndice II.2.3), y se dejaron secar, primero al aire y después en la estufa de 37°C durante una noche. A continuación, se deshidrataron en una gradación ascendente de alcoholes (50°, 70°, 96° y 100°) con una duración de 10 minutos por cada uno, se aclararon con xileno (durante 20 minutos) y se cubrieron usando Entellan® (Merk) como medio de montaje.

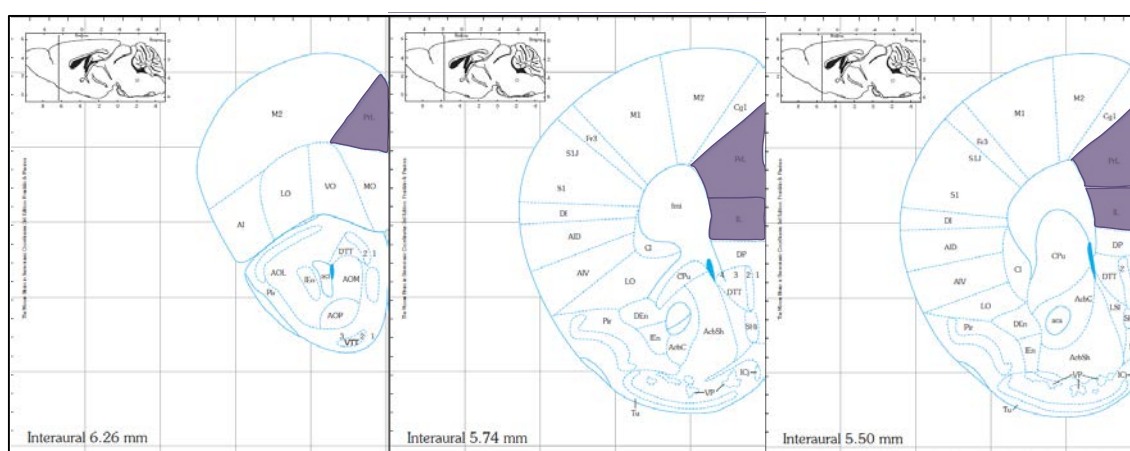
NOTA: Todos los pasos de lavados e incubaciones se realizaron en agitación constante y a temperatura ambiente.

### 6.3.2.3. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico

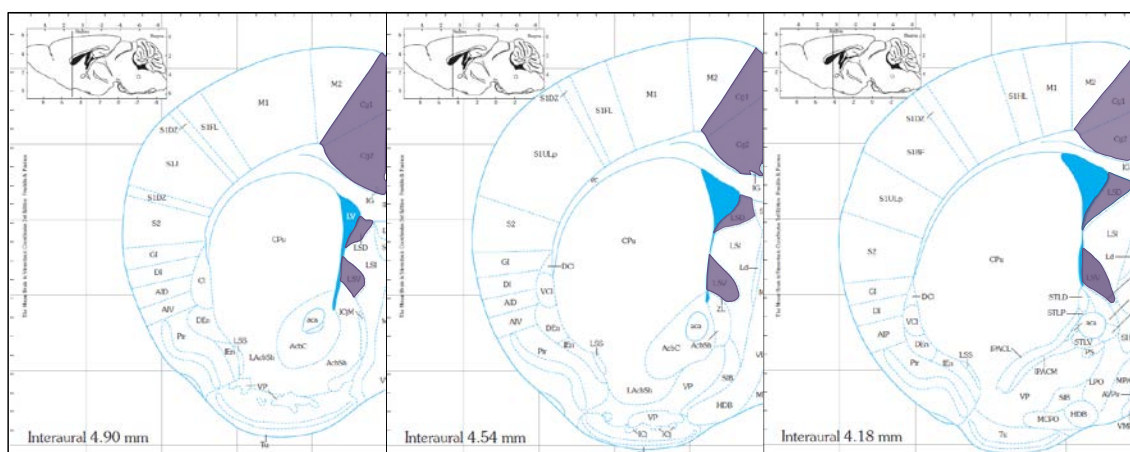
Las imágenes de inmunohistoquímica de las secciones de las distintas estructuras teñidas con el anticuerpo anti c-Fos se obtuvieron con una cámara digital (DS-Fi1, Nikon) acoplada a un microscopio óptico (Eclipse E400, Nikon). Las microfotografías se obtuvieron con el objetivo de 40x y se utilizaron entre 4 y 6 secciones para la cuantificación de ambos hemisferios de cada una de las estructuras. Las estructuras a estudiar fueron: corteza prefrontal (cingulada, prelímbica e infralímbica), septum lateral (dorsal y ventral), núcleos hipotalámicos (paraventricular, anterior y ventromedial), amígdala (basolateral y medial), sustancia gris periacueductal (anterior, lateral y dorsolateral) y área tegmental ventral. Así, se definieron los siguientes niveles, según el atlas de Franklin y Paxinos (2008): corteza prelímbica (entre Bregma +2.46 y +1.54), corteza

infralímbica (entre Bregma +1.98 y +1.34), corteza cingulada y septum lateral (entre Bregma +1.10 y +0.14), núcleos hipotalámicos paraventricular y anterior (entre Bregma -0.58 y -1.22), núcleo hipotalámico ventromedial (entre Bregma -1.22 y -1.94), amígdala (entre Bregma -1.22 y -1.82), área tegmental ventral y sustancia gris periacueductal (entre Bregma -2.80 y -3.16) y sustancia gris lateral y dorsolateral (entre Bregma -3.40 y -4.36).

En las siguientes figuras se detallan, de manera ilustrativa, algunos niveles rostro-caudales, de ratón, analizados:



**Figura 6.3.2.2.** Representación rostro-caudal de la corteza prelímbica (PrL) e infralímbica (IL). Niveles I0 (Bregma +2.46), I5 (Bregma +1.94) y I7 (Bregma +1.70).



**Figura 6.3.2.3.** Representación rostro-caudal de la corteza cingulada (Cg) y del septum lateral dorsal (LSD) y ventral (LSV). Niveles 22 Bregma (+1.10), 25 (Bregma +0.74) y 28 (Bregma +0.38).

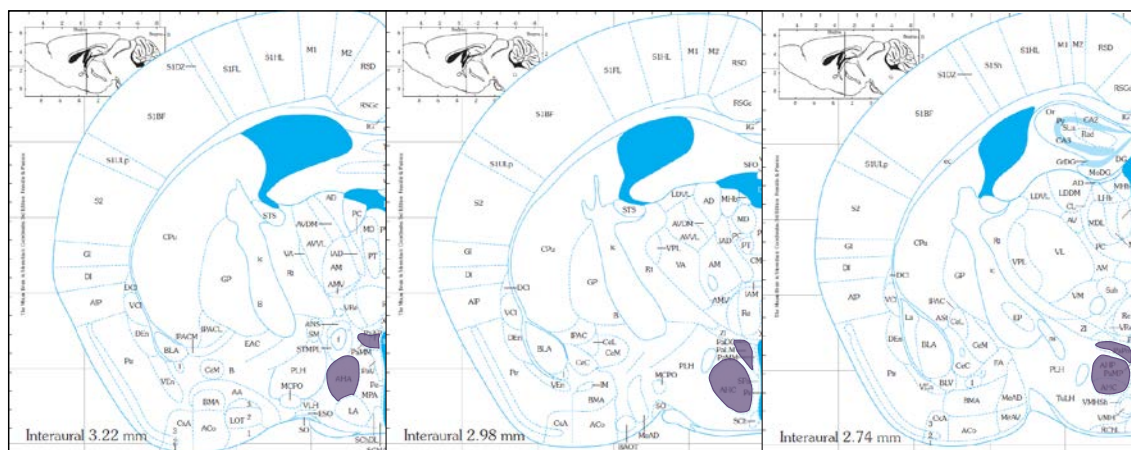


Figura 6.3.2.4. Representación rostro-caudal de los núcleos hipotalámicos paraventricular (PVN) y anterior (AH). Niveles 36 (Bregma -0.58), 38 (Bregma -0.82) y 40 (Bregma -1.06).

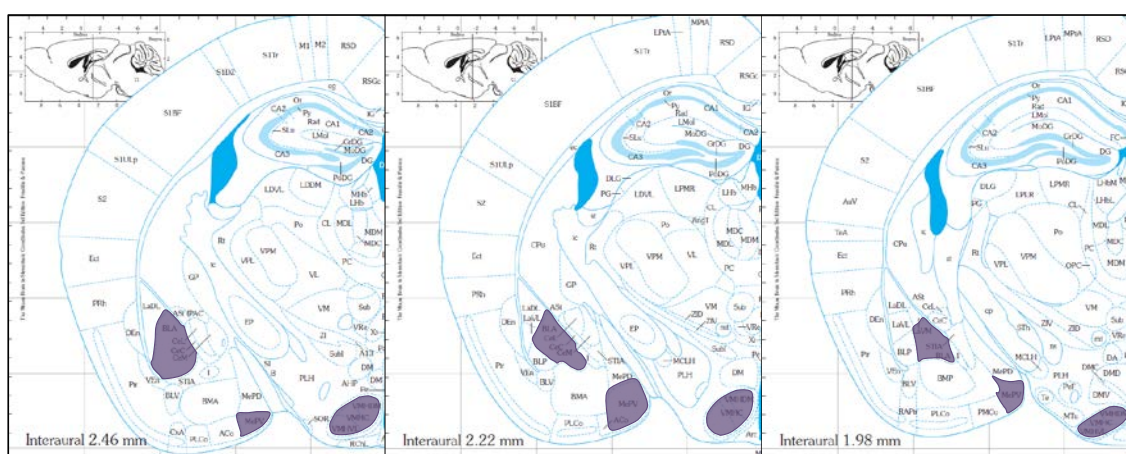


Figura 6.3.2.5. Representación rostro-caudal de la amígdala basolateral (BLA) y medial (MeA) y del núcleo hipotalámico ventromedial (VMH). Niveles 42 (Bregma -1.34), 44 (Bregma -1.58) y 46 (Bregma -1.82).

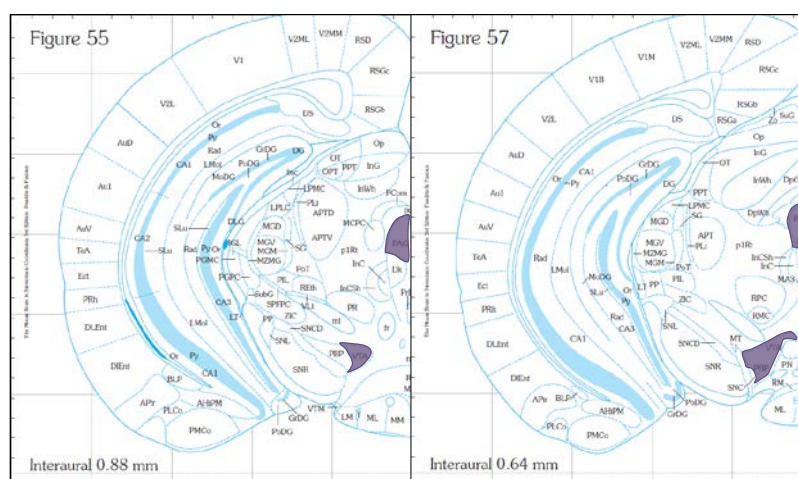


Figura 6.3.2.6. Representación del área tegmental ventral (VTA) y de la sustancia gris periacueductal anterior (PAG). Nivel 55 (Bregma -2.22) y 57 (Bregma -3.16).

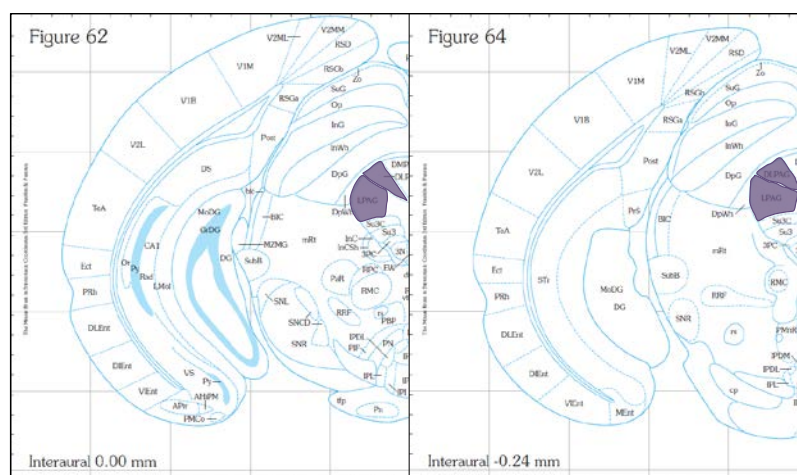


Figura 6.3.2.7. Representación de la sustancia gris periacueductal lateral (LPAG) y dorsolateral (DLPAG). Nivel 62 (Bregma -3.80) y 64 (Bregma -4.04).

De cada microfotografía se determinó el umbral homogéneo en la escala de valores de grises utilizando el programa de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop CS 10.0 para detectar en las microfotografías los núcleos inmunorreactivos (IR) de intensidad media-alta. El número de núcleos IR para los distintos anticuerpos se valoró con el programa de análisis de imagen ImageJ 1.42q.

### 6.3.3. Análisis estadístico

Tanto para los estudios de la conducta agresiva como para los estudios de inmunohistoquímica el análisis se llevó a cabo utilizando estadística no paramétrica, ya que los datos no cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad). Por un lado, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comprobar la existencia de diferencias significativas de las categorías conductuales o de las distintas estructuras, entre los diferentes grupos experimentales (controles y tratamiento). Posteriormente, se efectuaron comparaciones entre pares de grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney. Para ello, se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS 11.5.

---

## 7. RESULTADOS

---

## EXPERIMENTO I: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE JNJI6259685 (ANTAGONISTA DEL RECEPTOR MGLUI) SOBRE LA CONDUCTA AGONÍSTICA EN RATONES MACHO.

### 7.1.1. Introducción

Diversos estudios han demostrado la implicación del glutamato en la regulación de la agresión. Y aunque hay evidencias de que los receptores ionotrópicos del glutamato podrían estar involucrados en su modulación (véase apartado 4. “Glutamato y agresión”), la posible implicación de los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR) es escasamente conocida. Navarro et al. (2006), encontraron que la administración aguda de 2-metil-6-(feniletilnil) piridina (MPEP), un antagonista selectivo de los receptores mGlu5, reducía la conducta ofensiva en ratones macho, sugiriendo un papel de estos receptores en la regulación de la agresión. Por su parte, los receptores mGluI, pertenecientes también al grupo I de los receptores metabotrópicos del glutamato, están presentes en estructuras del cerebro implicadas en la agresión, como la sustancia gris periacueductal, la amígdala o el septum lateral (Lavreysen, Nóbrega, Leysen, y Lesage, 2004a).

En el presente experimento, nos planteamos como objetivo evaluar los efectos de la administración de JNJI6259685, antagonista selectivo del receptor mGluI, sobre la conducta agonística en ratones machos, empleando para ello el modelo de agresión inducido por aislamiento.

### 7.1.2. Metodología

Se utilizaron 264 ratones albinos machos de la cepa Swiss OF1. En total se formaron nueve grupos con los animales aislados (n= 132). Los ratones fueron distribuidos al azar en dos grupos control (n= 15 cada grupo) que recibían suero salino o vehículo [salino (90%) más DMSO (10%)], y siete grupos experimentales (n= 14-16 cada grupo) a los que se les administraba las diferentes dosis del fármaco. Tanto la administración del fármaco como del suero salino o vehículo, se realizaba siempre treinta minutos antes de la prueba conductual y se realizó por vía intraperitoneal (i. p.). Las dosis elegidas para el tratamiento fueron: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/kg (Fig 7.1.1). Se seleccionaron en base a recientes estudios que utilizaron este compuesto (Dravolina et al., 2007; Steckler et al., 2005a, b).

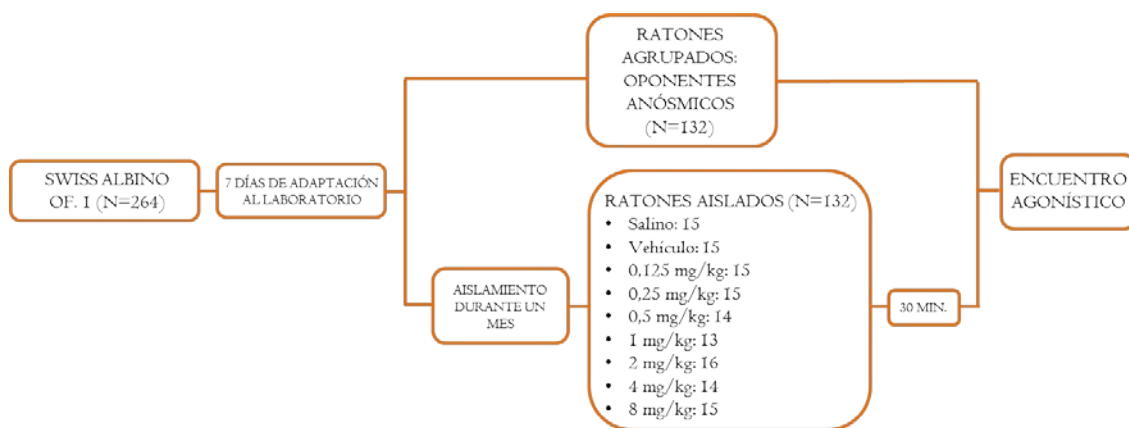


Figura 7.I.I. Diseño experimento I.

### 7.I.3. Resultados

En la tabla 7.I.I se muestran las medianas (intervalos) del tiempo acumulado (en segundos) en cada una de las categorías conductuales para cada grupo de tratamiento.

El análisis de la prueba de Kruskal-Wallis muestra que hay diferencias estadísticamente significativas en las categorías de cuidado corporal, escarbar, exploración no social, amenaza y ataque ( $p < 0.0001$ ).

Cuando se realizó la prueba U de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias entre los dos grupos controles (salino y vehículo). Por otro lado, los datos revelaron que el fármaco reducía significativamente el tiempo empleado en la conducta de escarbar (0.25-8 mg/kg;  $p < 0.0001$ - $p < 0.05$ ), amenaza (todas las dosis;  $p < 0.0001$ - $p < 0.01$ ) y ataque (todas las dosis;  $p < 0.0001$ - $p < 0.05$ ), en comparación con el grupo vehículo. La conducta de cuidado corporal también disminuyó tras el tratamiento con JNJ16259685 (2, 4 y 8 mg/kg;  $p < 0.0001$ - $p < 0.002$ ), mientras que la conducta de exploración no-social (0.25-8 mg/kg) aumentó, en comparación con el grupo vehículo ( $p < 0.0001$ - $p < 0.001$ ). Las medianas para las categorías de defensa/sumisión e inmovilidad fueron cero para todos los grupos. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos control (salino y vehículo) en ninguna de las categorías conductuales analizadas.

Tabla 7.1.1. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con JNJ16259685 (0.125-8 mg/kg i. p.).

Categorías	Dosis de JNJ16259685 (mg/kg)								
	Salino	Vehículo	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Cuidado corporal <sup>a</sup>	10,07 (4-18)	7,94 (0-38)	8,9 (0,5-22)	6,2 (0-31)	9,8 (0-26)	7,32 (0,4-31)	<b>3,2<sup>e</sup></b> (0-11)	<b>0,7<sup>e</sup></b> (0-22)	<b>1,2<sup>e</sup></b> (0-12)
Escarbar <sup>a</sup>	12,04 (0-28)	4,2 (0-42)	4,6 (0-24)	<b>0,32<sup>b</sup></b> (0-6)	<b>0,71<sup>b</sup></b> (0-9)	<b>0,33<sup>b</sup></b> (0-14)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-8)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-22)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-9)
Expl. no social <sup>d</sup>	339 (199-462)	368 (246-459)	403 (250-519)	<b>447<sup>c</sup></b> (338-506)	<b>492<sup>c</sup></b> (289-561)	<b>444<sup>c</sup></b> (320-521)	<b>489<sup>c</sup></b> (290-525)	<b>485<sup>c</sup></b> (434-527)	<b>480<sup>c</sup></b> (352-547)
Expl. a distancia	21,93 (0,6-82)	24,17 (3,4-101)	7,4 (0,7-36)	10,3 (0,7-27)	21,8 (2,7-92)	15,9 (2,4-64)	17,6 (5,5-74)	29,2 (2,3-55)	21,1 (6-55)
Inv. social	54,85 (2,4-232)	71,38 (11,7-196)	87,3 (21-243)	113,6 (30-256)	73,3 (9-128)	89,6 (0-170)	69,6 (37-284)	62,6 (27-123)	76,3 (32-191)
Amenaza <sup>a</sup>	132,1 (0-208)	88,54 (0-210)	<b>28,3<sup>d</sup></b> (0-131)	<b>0<sup>d</sup></b> (0-118)	<b>0<sup>d</sup></b> (0-100)	<b>0<sup>d</sup></b> (0-173)	<b>0<sup>d</sup></b> (0-115)	<b>0<sup>d</sup></b> (0-0,3)	<b>0<sup>d</sup></b> (0-97)
Ataque <sup>a</sup>	32,17 (0-92,4)	33,87 (0-98)	<b>6,1<sup>b</sup></b> (0-88)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-25)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-97)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-66)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-35)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-0)	<b>0<sup>b</sup></b> (0-76)
Evitación/huída	0 (0-4)	0 (0-2,6)	0 (0-3,5)	0 (0-4,8)	0,5 (0-5,2)	0 (0-2,1)	0,9 (0-7,2)	0,25 (0-7,1)	0 (0-5,7)
Defensa/sumisión	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-46)	0 (0-62)	0 (0-81)

Prueba de Kruskal-Wallis: <sup>a</sup> p<0.0001.

Diferencias con el vehículo en la prueba U de Mann-Whitney: <sup>b</sup> p<0.0001-p<0.05; <sup>c</sup> p<0.0001-p<0.01; <sup>d</sup> p<0.001-p<0.01; <sup>e</sup> p<0.0001-p<0.002.

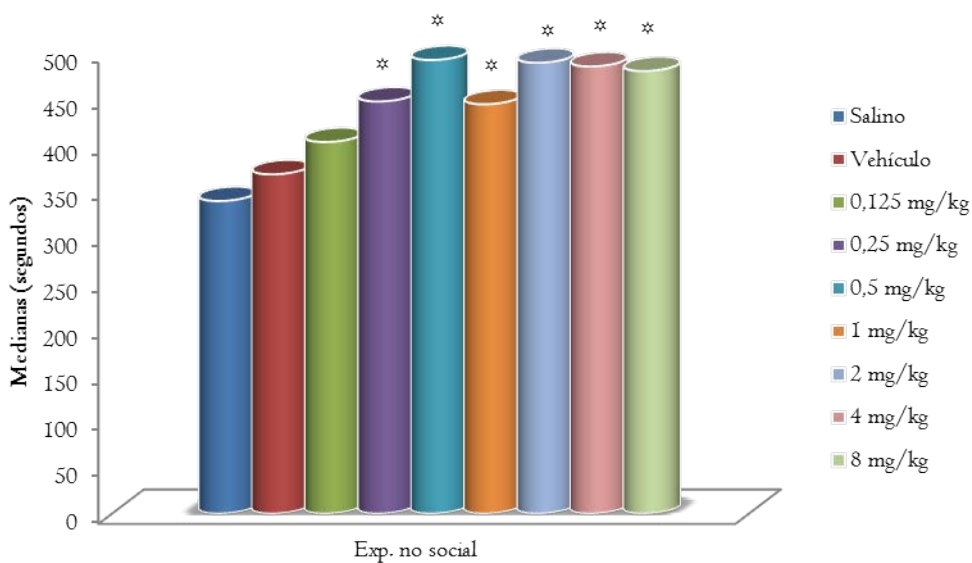


Figura 7.1.2. Medianas de tiempo en segundos para la categoría de exploración no social con JNJ16259685.

Prueba U de Mann-Whitney(diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo):  
\* p<0.0001-<0.001.



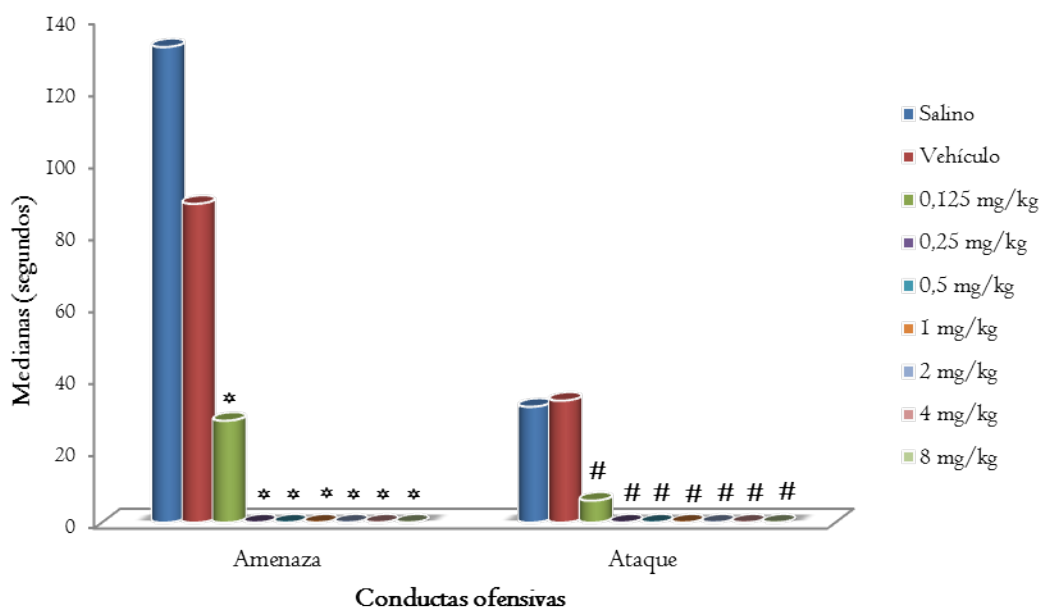


Figura 7.1.3. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con JNJI6258695.

Prueba U de Mann-Whitney (diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo):  
\* $p < 0.001$ - $p < 0.01$ ; # $p < 0.0001$ - $p < 0.05$ .

#### 7.1.4. Discusión breve

Como muestra la Tabla 7.1.1, los resultados de este estudio indican que la administración aguda de JNJI6259685 en un amplio rango de dosis (0.125-8 mg/kg i. p.) produce una fuerte reducción de la conducta ofensiva (amenaza y ataque), sin afectar al sistema motor —ausencia de inmovilidad—, comparado con el grupo vehículo. Las dosis empleadas en este estudio son muy similares a aquellos utilizados por otros autores (0.63-10 mg/kg i. p.) en ratones (Steckler et al., 2005a), igualmente sin afectar a la motilidad. Estos datos representan los primeros resultados que describen los efectos de un ligando selectivo de los receptores mGluI sobre la agresión en experimentación animal.

Además, la reducción de la conducta ofensiva después del tratamiento con JNJI6259685 fue acompañada por un incremento de la conducta de exploración no social así como de un decremento de la conducta de escarbar en todas las dosis utilizadas, lo que se ajusta al típico perfil de conducta antiagresiva (figura 7.1.2). Escarbar está involucrado en la conducta agresiva junto con amenaza y ataque. De hecho, normalmente existe una correlación positiva entre estas categorías conductuales (Kudryavtseva, Bondar y Alekseyenko, 2000); asimismo estas conductas

pueden ser inducidas a través de la estimulación eléctrica en el hipotálamo lateral (Lammers, Meelis, Kruk y van der Poel, 1987).

La administración de JNJI6259685 produce una potente acción antiagresiva, puesto que con todas las dosis empleadas la reducción de las conductas ofensivas (amenaza y ataque) es estadísticamente significativa (figura 7.1.3). Estos resultados indican que la dosis de 0.125 mg/kg sería suficiente para producir una reducción de la agresión (siendo especialmente marcada esta reducción a partir de los 0.25 mg/kg), provocado quizás por un efecto “techo”. Lo que se traduce en que la administración de dosis mayores del compuesto produciría similares decrementos de agresión. La acción antiagresiva inducida por el bloqueo de los receptores mGluI es muy similar a la descrita por Navarro et al. (2006) con MPEP, un antagonista selectivo del receptor mGlu5.

Los efectos antiagresivos de JNJI6259685 están mediados a través del bloqueo de los receptores mGluI ya que este fármaco es un antagonista potente y altamente selectivo de este subtipo de receptor. En conclusión, esta es la primera demostración de que un antagonista de los receptores mGluI disminuye las conductas de amenaza y ataque en ratones macho.

Por tanto, estos resultados sugieren un papel de estos receptores en la regulación de la agresión. No obstante, sería necesario realizar más estudios que utilizaran otros ligandos selectivos para el receptor mGluI para corroborar estos resultados.

## EXPERIMENTO 2: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE AMN082 (AGONISTA DEL RECEPTO MGLU7) SOBRE LA CONDUCTA AGONÍSTICA EN RATONES MACHO.

### 7.2.1. Introducción

En el experimento 1, donde utilizamos el compuesto JNJI6259685, antagonista selectivo del receptor mGluI, observamos una robusta disminución de las conductas ofensivas en todo el rango de dosis utilizado (0.125-8 mg/kg i. p.) sin afectación del sistema motor. Por tanto, estos resultados, junto con los obtenidos por Navarro et al. (2006), parecen indicar que los mGluR del grupo I están implicados en la modulación de la agresión. Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios acerca del papel funcional de los mGluR del grupo III sobre la conducta agresiva en modelos animales. Los receptores mGlu7 se localizan en regiones que están relacionadas con la agresión, como por ejemplo corteza prefrontal, amígdala y núcleos hipotalámicos (Ohishi, Akazawa, Shigemoto, Nakanishi, y Mizuno, 1995).

Así, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar los efectos de la administración aguda de AMN082, agonista selectivo del receptor mGlu7, sobre la conducta agonística en ratones machos, empleando para ello el modelo de agresión inducida por aislamiento.

### 7.2.2. Metodología

Se utilizaron un total de 192 ratones albinos macho de la cepa OF1. Los animales fueron asignados al azar a las diferentes condiciones experimentales. En total se formaron 6 grupos con los animales aislados (n= 96). Un grupo control (n= 21) que recibió vehículo (90% suero salino + 10% DMSO) y cinco grupos experimentales (n= 13-16) que recibieron las distintas dosis del fármaco. Las dosis elegidas fueron: 0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/kg. (Fig 7.2.1). Se seleccionaron en base a estudios pilotos previos realizados en nuestro laboratorio, además de otro estudio conductual que utilizó este compuesto en roedores (Palucha et al., 2007). Tanto el fármaco como el vehículo fueron inyectados de manera i. p. y el encuentro conductual tuvo lugar pasados 60 min. de la aplicación del tratamiento.

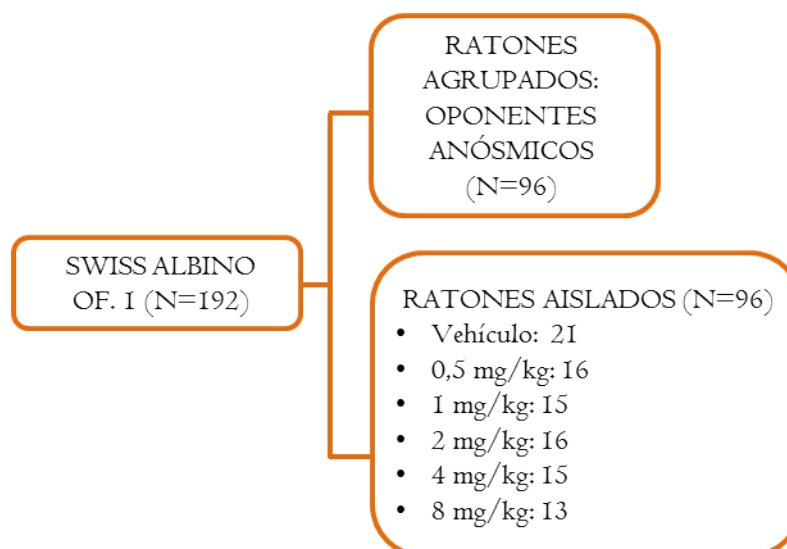


Figura 7.2.1. Diseño experimento 2.

### 7.2.3. Resultados

En la tabla 7.2.1 se muestran las medianas (intervalos) del tiempo acumulado (en segundos) en cada una de las categorías conductuales para cada grupo de tratamiento. La dosis de 8 mg/kg fue descartada para el análisis ya que los ratones manifestaron una fuerte afectación del sistema motor (especialmente temblores).

El análisis de Kruskal-Wallis indicó que existían diferencias significativas en las categorías de cuidado corporal ( $p < 0.006$ ), escarbar ( $p < 0.005$ ), exploración no social ( $p < 0.00001$ ), exploración a distancia ( $p < 0.03$ ), amenaza ( $p < 0.0001$ ) y ataque ( $p < 0.0001$ ).

Las comparaciones de pares usando la prueba U de Mann-Whitney reveló que la dosis más alta (4 mg/kg) reducía de forma significativa el tiempo empleado en cuidado corporal ( $p < 0.001$ ), escarbar ( $p < 0.001$ ), amenaza ( $p < 0.0001$ ) y ataque ( $p < 0.0001$ ) comparado con el grupo control, mientras que las conductas de exploración no social ( $p < 0.0001$ ) y de exploración desde una distancia ( $p < 0.002$ ) fueron aumentadas significativamente. Las medianas para las categorías de evitación/huída y defensa/sumisión fueron cero para todos los grupos.

Tabla 7.2.1. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con AMN082 (0.5-4 mg/kg i. p.).

Categorías conductuales	Dosis de AMN082 (mg/kg)				
	Vehículo	0,5	1	2	4
Cuidado corporal <sup>a</sup>	9,41 (0-27)	9,8 (1-31)	6,6 (2-18)	5,4 (0-22)	1** (0-18)
Escarbar <sup>c</sup>	2,37 (0-30)	0,4 (0-23)	1,4 (0-26)	0,4 (0-27)	0*** (0-5)
Expl. no social <sup>d</sup>	371 (238-495)	345 (249-413)	378 (282-466)	381 (273-532)	476* (421-531)
Expl. a distancia <sup>b</sup>	14,7 (0-27)	12,5 (0-45)	12,4 (2-50)	12,8 (1,5-32)	26,9*** (4-66)
Inv. social	99 (8-175)	61,6 (3-202)	85,7 (0-272)	102 (4-270)	97 (38-149)
Amenaza <sup>d</sup>	92,5 (0-182)	149 (0-243)	99 (0-213)	27 (0-185)	0* (0-2,4)
Ataque <sup>d</sup>	6,6 (0-93)	11,4 (0-50)	8,1 (0-44)	2,4 (0-62)	0* (0-0)
Evitación/huída	0 (0-1,2)	0 (0-2,4)	0 (0-5)	0 (0-0)	0 (0-2)
Defensa/sumisión	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-0)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Prueba de Kruskal-Wallis: <sup>a</sup> p<0.006; <sup>b</sup> p<0.03; <sup>c</sup> p<0.01; <sup>d</sup> p<0.0001.  
 Diferencias con el vehículo en la prueba U de Mann-Whitney: \* p<0.0001; \*\*p<0.001; \*\*\*p<0.002.

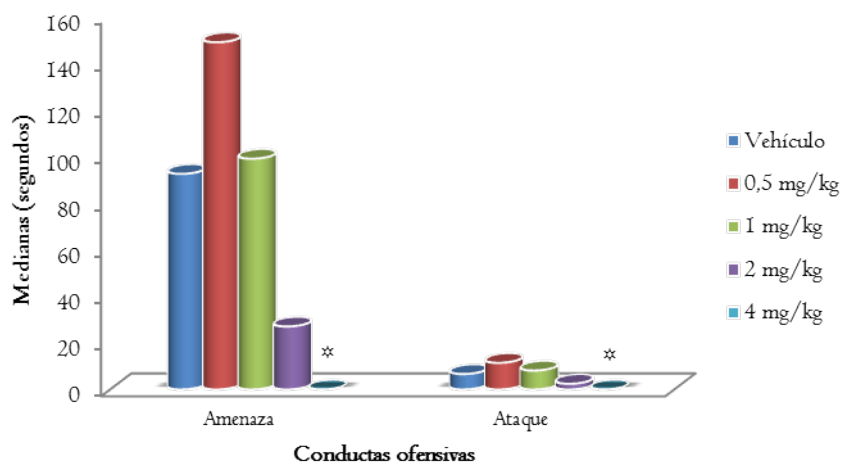


Figura 7.2.2. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con AMN082. Prueba U de Mann-Whitney (diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo): \* p<0.0001.

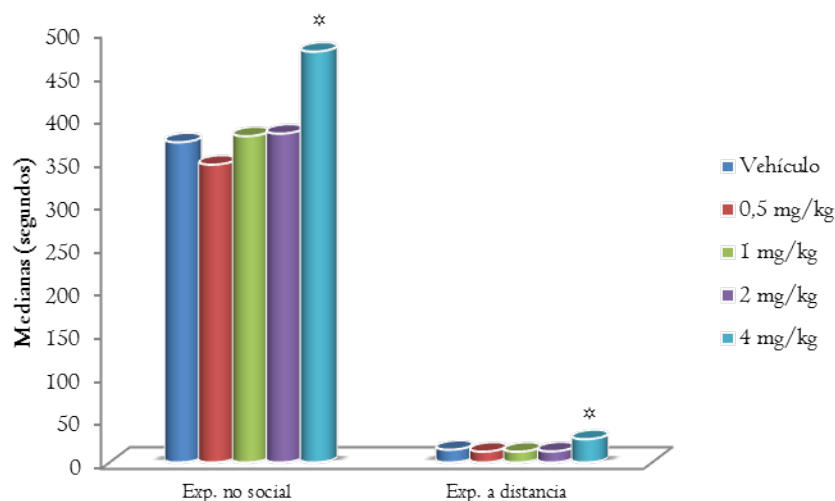


Figura 7.2.3. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de exploración no social y exploración a distancia con AMN082. Prueba U de Mann-Whitney (diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo): \*  $p < 0.0001$  -  $p < 0.002$ .

#### 7.2.4. Discusión breve

Los receptores mGlu7 están implicados en numerosas funciones del SNC de los mamíferos. Así, el compuesto AMN082 produce efectos conductuales específicos en los roedores, particularmente una potente acción antidepresiva (Bradley et al., 2012; Palucha et al., 2007); además, produce bloqueo en la respuesta de adquisición en el condicionamiento de miedo (Siegl, Flor, y Fendt, 2008) y es pro-nociceptivo (Palazzo, Fu, Ji, Maione, y Neugebauer, 2008). En relación con la ansiedad, en cambio, existen datos controvertidos habiéndose documentado tanto efectos ansiolíticos (Stachowicz et al., 2008) como ansiogénicos (Palazzo et al., 2008) tras la administración del fármaco (Lavreysen y Dautzenberg, 2008).

Estos receptores están localizados principalmente de forma presináptica y se cree que funcionan como autorreceptores. Se encuentran ampliamente distribuidos a través de todo el SNC. Concretamente, los receptores mGlu7 se expresan en áreas del cerebro como: las regiones neocorticales, la corteza cingulada y piriforme, las regiones CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo, la amígdala, el locus coeruleus y los núcleos hipotalámicos y talámicos (Ohishi, et al., 1995). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo mostraron que la dosis de 8 mg/kg afectaba de forma robusta al sistema motor. Los ratones manifestaron temblores en la patas, convulsiones de tipo epiléptico, así como catalepsia. Estos resultados se asemejan a los que obtuvo Palucha et al. (2007), quienes encontraron que la dosis de 10 mg/kg de AMN082 producía temblores de

forma general por todo el cuerpo. Además, observaron este mismo fenómeno en los ratones knockout (KO) para el receptor mGlu7. De esta forma, sugieren una actividad no específica del compuesto.

Por otro lado, como muestra la tabla 7.2.1, la dosis de 4 mg/kg produjo una reducción significativa de las conductas ofensivas (amenaza y ataque), sin afectar al sistema motor, comparado con el grupo vehículo (figura 7.2.2). Esta reducción de la agresión fue acompañada por una disminución significativa de las categorías de escarbar y cuidado corporal. La conducta de escarbar correlaciona con las conductas de amenaza y ataque (Kudryavtseva et al., 2000) y por otro lado, el cuidado corporal es una respuesta etológica considerada una parte importante del repertorio del animal, que es sensible tanto a factores endógenos como exógenos de modo que resulta útil para valorar la reactividad a la novedad y al estrés (Gómez, Carrasco y Redolat, 2008). Esta reducción en el cuidado corporal asociado a la reducción de las conductas ofensivas fue observada, asimismo, en el experimento I. Además, la exploración a distancia (conducta que se considera como un anticipo al contacto social) y la exploración no social aumentaron tras la administración de las dosis de 4mg/kg (figura 7.2.3).

Por tanto, siendo este el primer estudio en investigar la implicación del receptor mGlu7 en la regulación de la agresión, se concluye que es posible que los receptores mGlu7 estén implicados en su modulación, aunque hace falta realizar estudios adicionales con otros ligandos selectivos para poder confirmar estos resultados.

### EXPERIMENTO 3: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE (S)-3,4-DCPG (AGONISTA DEL RECEPTO MGLU8) SOBRE LA CONDUCTA AGONÍSTICA EN RATONES MACHO.

#### 7.3.1. Introducción

Los receptores metabotrópicos del grupo I, mGlu5 y mGlu1, están implicados en la regulación de la conducta agresiva (Navarro et al., 2006; experimento 1). En cuanto a los mGluR del grupo III, en el experimento 2 se ha visto que la dosis de 4 mg/kg del compuesto AMN082, agonista del receptor mGlu7, reduce las conductas ofensivas de amenaza y ataque, sin afectar a la conducta motora. No obstante, hasta la fecha, no existen estudios que analicen el papel de los receptores mGlu8 sobre la conducta agresiva. Aunque de localización más limitada, se han encontrado receptores mGlu8 en algunas estructuras relacionadas con la agresión, como los bulbos olfatorios o la corteza piriforme (Shigemoto et al., 1997).

El objetivo de este experimento ha sido evaluar los efectos de la administración aguda de (S)-3,4-DCPG, agonista selectivo del receptor mGlu8, sobre la conducta agonística en ratones machos, empleando el modelo de agresión inducida por aislamiento.

#### 7.3.2. Metodología

Se utilizaron un total de 110 ratones albinos macho de la cepa OF1. Los animales fueron asignados al azar a las diferentes condiciones experimentales. En total se formaron 4 grupos con los animales aislados (n= 55). Un grupo control (n= 14) que recibió vehículo (90% suero salino + 10% DMSO) y tres grupos experimentales (n= 13-14) que recibieron las distintas dosis del fármaco (Fig 7.3.1). Las dosis elegidas fueron: 2,5, 5 y 10 mg/kg y se seleccionaron en base a estudios anteriores que usaban este compuesto en roedores con un rango de dosis similar al que utilizamos en nuestro estudio (Bäckström y Hyytiä, 2005). Tanto el fármaco como el vehículo fueron inyectados de manera i. p. y pasados 30 min. de la aplicación del tratamiento tuvo lugar el encuentro conductual.



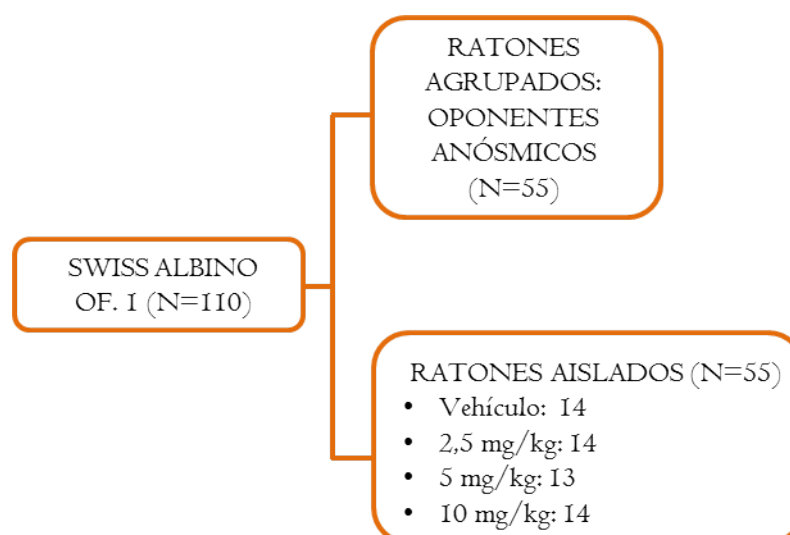


Figura 7.3.I. Diseño experimento 3.

### 7.3.3. Resultados

La prueba de Kruskal-Wallis indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las categorías. Del mismo modo, la prueba U de Mann-Whitney no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pares de grupos (tabla 7.3.I).

Tabla 7.3.I. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con (S)-3,4-DCPG (2.5-10 mg/kg i. p.).

Categorías	Dosis de (S)-3,4-DCPG (mg/kg)			
	Vehículo	2,5	5	10
<b>Cuidado corporal</b>	8,9 (0-22)	11,3 (0,7-21)	11,4 (2-23)	9,7 (5-20)
<b>Escarbar</b>	17 (1-56)	17 (0,7-52,5)	12,4 (0-44,6)	9,7 (0-64,5)
<b>Expl. no social</b>	376 (241-484)	343 (259-478)	367 (238-443)	373 (326-498)
<b>Expl. a distancia</b>	14,3 (2,3-52)	17,4 (4-44,7)	22,1 (5,7-82)	18,6 (3,5-53)
<b>Inv. social</b>	76,6 (2-125)	32,4 (10,4-313)	71 (2,6-196)	39,1 (5-148)
<b>Amenaza</b>	89,8 (0-289)	96,7 (0-224)	83,5 (3,7-296)	122 (0-188)
<b>Ataque</b>	6,6 (0-34)	12,3 (0-53,6)	9,8 (0-45,2)	19,7 (0-56,4)
<b>Evitación/huída</b>	0 (0-21)	0 (0-5)	0 (0-1,3)	0 (0-1)
<b>Defensa/sumisión</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2)
<b>Inmovilidad</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-36,5)

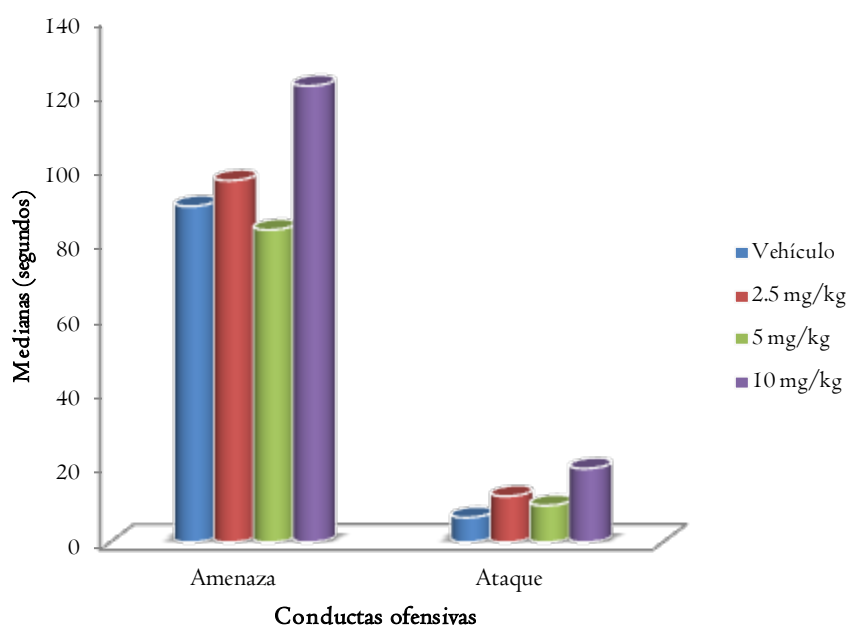


Figura 7.3.2. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con (S)-3,4-DCPG.

#### 7.3.4. Discusión breve

Los receptores metabotrópicos del grupo III, mGlu7 y mGlu8 están implicados en muchas funciones del SNC. A diferencia de la controversia existente en cuanto a la implicación de los receptores mGlu7 en la modulación de la ansiedad (Stachowicz et al., 2008; Palazzo et al., 2008), hay estudios que demuestran que el compuesto (S)-3,4-DCPG, así como otros ligandos que actúan sobre los receptores mGlu8, poseen un papel potencial sobre la ansiedad (Duvoisin et al., 2005; Linden, Bergeron, Baez y Schoepp, 2003). Por otro lado, se ha evidenciado una implicación de los receptores mGlu8 en la autoadministración e ingesta de alcohol (Bäckström y Hyttiä, 2005), y en la modulación de la percepción de dolor en ratones (Marabese et al., 2007).

Los receptores mGlu8, en comparación con los receptores mGlu7, se expresan de manera más restringida en el SNC (Schoepp, 2001). Se localizan principalmente en los terminales presinápticos de los bulbos olfatorios, corteza piriforme, corteza entorrinal, hipocampo y cerebelo (Shigemoto et al., 1997). Como se puede observar en la tabla 7.3.I, la administración aguda de (S)-3,4-DCPG no produjo ningún efecto en ninguna de las categorías observadas con ninguna de las dosis utilizadas. Por tanto, se concluye que los receptores mGlu8 no deben estar implicados en la modulación de la agresión (figura 7.3.2). Así pues, la diferente implicación de los receptores

mGlu7 y mGlu8 en la regulación de la agresión, debe de estar relacionado con la distinta distribución de estos receptores en estructuras como la amígdala o el hipotálamo. En cualquier caso, es necesario realizar más estudios utilizando ligando selectivos para clarificar la relación de los mGluR del grupo III con la modulación de la agresión.

## EXPERIMENTO 4: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE (RS)-3,4-DCPG (ANTAGONISTA DEL RECEPTOR AMPA/AGONISTA DEL RECEPTOR MGLU8) SOBRE LA CONDUCTA AGONÍSTICA EN RATONES MACHO.

### 7.4.1. Introducción

Existen diversos estudios que demuestran la implicación de los iGluR AMPA en la conducta agresiva (véase apartado 4. “Glutamato y agresión”). Por otro lado, en el experimento 3 no observamos que el agonista selectivo del receptor mGlu8 ejerciera ningún efecto sobre ninguna de las categorías conductuales estudiadas. Por su parte, el compuesto (RS)-3,4-DCPG es 100 más potente que sus enantiómeros (S)-3,4-DCPG y (R)-3,4-DCPG por separado (Tomas et al., 1997).

Así, el objetivo de este estudio ha sido analizar el efecto que produce la administración aguda del ligando (RS)-3,4-DCPG, antagonista del receptor AMPA y agonista del receptor mGlu8, sobre la conducta agonística en ratones macho, utilizando para ello el modelo de agresión inducido por aislamiento.

### 7.4.2. Metodología

Se utilizaron un total de 94 ratones albinos macho de la cepa OF1. Los animales fueron asignados al azar a las diferentes condiciones experimentales. En total se formaron 4 grupos con los animales aislados (n= 47). Un grupo control (n= 14) que recibió vehículo (90% suero salino + 10% DMSO) y tres grupos experimentales (n=11) que recibieron las distintas dosis del fármaco (Fig 7.4.1). Las dosis elegidas fueron: 5, 10 y 20 mg/kg y se seleccionaron en base a estudios anteriores (Owssowska et al., 2004). Tanto el fármaco como el vehículo fueron inyectados de manera i. p. y transcurridos 30 min. tuvo lugar el encuentro agonístico.

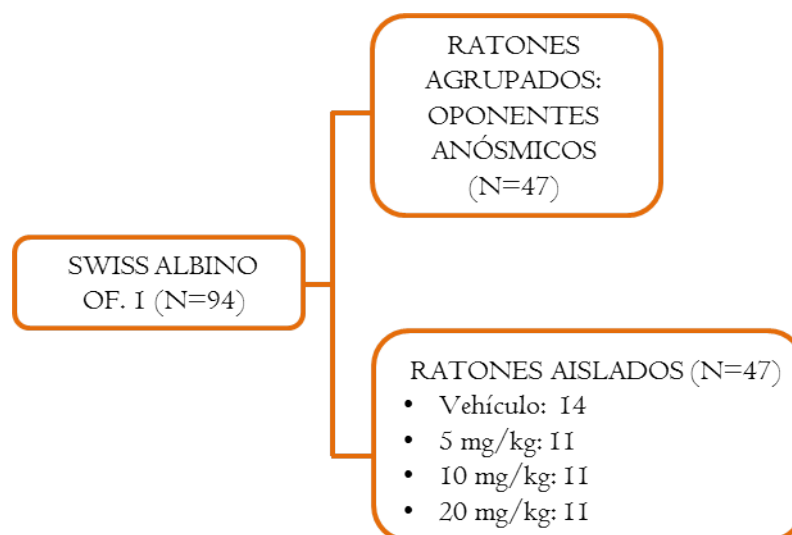


Fig. 7.4.I. Diseño experimento 4.

### 7.4.3. Resultados

Como muestra la tabla 7.4.I, al realizar los análisis estadísticos no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las categorías conductuales analizadas, entre ningún grupo experimental.

Tabla 7.4.I. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con (RS)-3,4-DCPG (5-20 mg/kg i. p.).

Categorías conductuales	Dosis de (RS)-3,4-DCPG (mg/kg)			
	Vehículo	5	10	20
<b>Cuidado corporal</b>	8,9 (0-22)	10 (1,5-28)	10 (2-44)	12,4 (3-32)
<b>Escarbar</b>	17 (1-56)	8,7 (0,5-52,5)	4,2 (0-48)	9,2 (0-57)
<b>Expl. no social</b>	376 (241-484)	328 (255-446)	361 (203-392)	416 (231-503)
<b>Expl. a distancia</b>	14,3 (2,3-52)	16,9 (5,4-52)	14,2 (5,7-35)	20,4 (6-47,5)
<b>Inv. social</b>	76,6 (2-125)	75,7 (8-268)	60 (19-301)	59,6 (18-173)
<b>Amenaza</b>	89,8 (0-289)	84,4 (0-177)	116,7 (45-200)	49,1 (0-118)
<b>Ataque</b>	6,6 (0-34)	11,3 (0-69)	23,7 (6-53)	6,7 (0-35)
<b>Evitación/huída</b>	0 (0-21)	0 (0-12)	0 (0-5)	0 (0-19)
<b>Defensa/sumisión</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>Inmovilidad</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

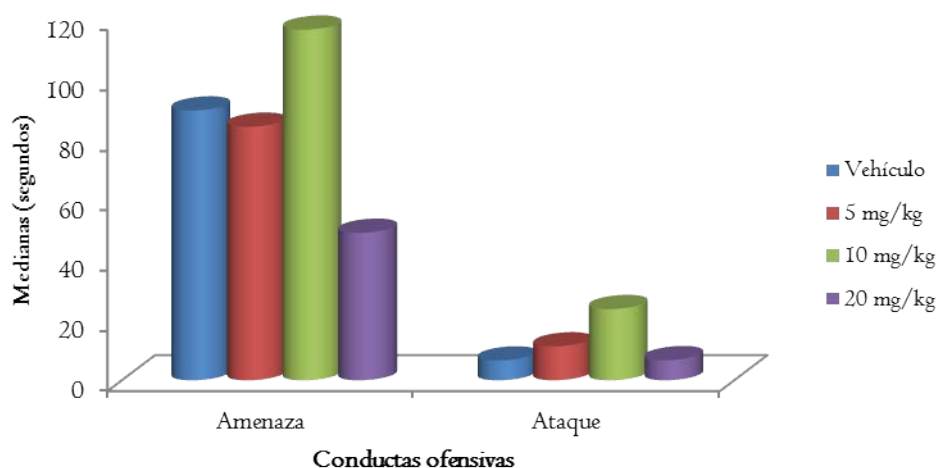


Figura 7.4.2. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con (RS)-3,4-DCPG.

#### 7.4.4. Discusión breve

Los estudios farmacológicos realizados para examinar el papel funcional de los receptores mGlu8 han estado limitados por la carencia de ligandos selectivos para dichos receptores. Recientemente, sin embargo, se han caracterizado varios fármacos que actúan como agonistas de tales receptores y son activos cuando se administran sistémicamente (Linden et al., 2003).

Como se aprecia en la tabla 7.4.I, ninguna de las dosis de (RS)-3,4-DCPG utilizadas en este estudio (5, 10 y 20 mg/kg, i. p.) modificó de forma estadísticamente significativa las conductas ofensivas (amenaza y ataque), en comparación con el grupo control (Fig. 7.4.2). Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas en el resto de las categorías conductuales examinadas. Estos resultados están en consonancia con los encontrados tras la administración del enantiómero (S)-3,4-DCPG, que actúa selectivamente en los receptores mGlu8, sin mostrar afinidad por los receptores AMPA.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente experimento indican que el antagonismo de los receptores AMPA por el isómero R y la estimulación de los receptores mGlu8 por el isómero S no parecen actuar sinérgicamente en la agresión en la forma racémica del compuesto 3,4-DCPG. Una limitación de este trabajo es que sólo se evalúa el perfil conductual de la forma racémica del 3,4-DCPG. Por lo tanto, son necesarios experimentos adicionales que comparen también entre sí ambos isómeros del DCPG.

## EXPERIMENTO 5: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE LY354740 (AGONISTA DEL RECEPTOR MGLU2/3) SOBRE LA CONDUCTA AGONÍSTICA EN RATONES MACHO.

### 7.5.1. Introducción

Los receptores metabotrópicos mGlu2/3 se expresan principalmente en los cuerpos celulares de la mayoría de las estructuras claves involucradas en la recepción, procesamiento y transmisión de la información de las respuestas emocionales, como la ansiedad y la agresión (Gu et al, 2008). Por otro lado, los resultados obtenidos en un estudio preliminar con un ligando selectivo de los receptores mGlu2/3 (LY379268) sugieren que estos receptores podrían estar también implicados en la agresión (Navarro et al., 2009).

Por tanto, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la implicación de los receptores mGlu2/3 en la modulación de la conducta agresiva. Para ello, se analizaron los efectos de la administración aguda de LY354740, agonista selectivo de los receptores metabotrópicos del grupo II sobre la conducta agonística en ratones machos, empleando el modelo de agresión inducida por aislamiento.

### 7.5.2. Metodología

Se utilizaron 168 ratones albinos machos de la cepa Swiss OF1. Los animales aislados (n= 84) fueron distribuidos al azar en cinco grupos. Un grupo control (n= 20) que recibió vehículo [suero salino (91.5%) más DMSO (8.5%)], y cuatro grupos experimentales (n= 16-20 cada grupo). Las dosis empleadas fueron: 4, 8, 12 y 16 mg/kg, seleccionadas en base a diversos estudios conductuales con animales de experimentación (Klodzinska et al, 1999; Moore et al., 1999; Schlumberger et al., 2009). La administración del fármaco y del vehículo se realizó siempre treinta minutos antes de la prueba conductual y se realizó por vía intraperitoneal (i. p.).

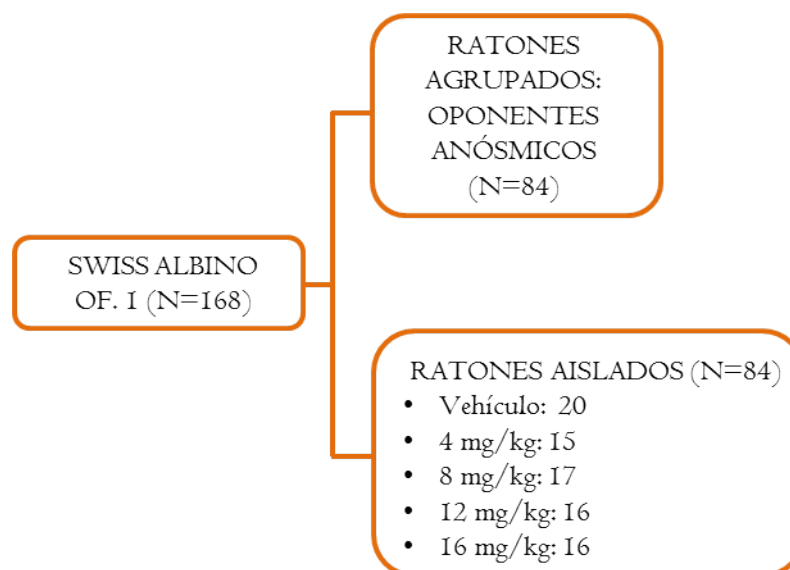


Figura 7.5.I. Diseño experimento 5.

### 7.5.3. Resultados

En la tabla 7.5.I se muestran las medianas (intervalos) del tiempo acumulado (en segundos) en cada una de las categorías conductuales para cada grupo de tratamiento, así como los rangos mínimos y máximos.

El análisis de Kruskal-Wallis indicó que existían diferencias estadísticamente significativas en las categorías de cuidado corporal, exploración a distancia, amenaza y ataque ( $p < 0.01$  -  $p < 0.05$ ).

La prueba U de Mann-Whitney reveló que la administración de LY354740 reducía de forma significativa el tiempo empleado por los animales en conductas de cuidado corporal (16 mg/kg:  $p < 0.006$ ), escarbar (12 mg/kg:  $p < 0.05$ ; 16 mg/kg:  $p < 0.03$ ), amenaza (12 mg/kg:  $p < 0.002$ ; 16 mg/kg:  $p < 0.021$ ) y ataque (12 mg/kg:  $p < 0.01$ ), en comparación con los animales del grupo control, mientras que las conductas de exploración a distancia se vieron significativamente incrementadas (12 mg/kg:  $p < 0.004$ ). Las medianas para las categorías conductuales de evitación/huída, defensa/sumisión e inmovilidad fueron cero para todos los grupos.



Tabla 7.5.1. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo con LY354740 (4-16 mg/kg i. p.).

Categorías conductuales	Dosis de LY354740 (mg/kg)				
	Vehículo	4	8	12	16
Cuidado corporal <sup>a</sup>	10,3 (1-33)	10,6 (4-21)	6,7 (1-45)	8,4 (0-26)	4,3* (0-14)
Escarbar	9,9 (0-48)	3,5 (0-29)	5,7 (0-24)	3* (0-64)	1,2*** (0-34)
Expl. no social	385 (247-426)	348 (146-449)	378,5 (203-450)	400,7 (261-435)	395 (221-509)
Expl. a distancia <sup>b</sup>	17 (7-52)	27 (10-41,5)	23,5 (3-46)	33,5**** (10-78)	23,8 (12-70)
Inv. social	127 (52-253)	109 (68-207)	137 (38-334)	131,6 (24-274)	129 (42-218)
Amenaza <sup>c</sup>	33 (0-180)	53,3 (0-178)	20,8 (0-119)	0# (0-117)	0## (0-145)
Ataque <sup>a</sup>	9,5 (0-51,5)	8,6 (0-69)	2,9 (0-66)	0#### (0-25)	0 (0-40)
Evitación/huída	0 (0-9)	0 (0-3,5)	0 (0-1)	0 (0-0,4)	0 (0-0,35)
Defensa/sumisión	0 (0-8)	0 (0-0,4)	0 (0-0)	0 (0-0,4)	0 (0-4)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-201)	0 (0-74)

Prueba de Kruskal-Wallis: <sup>a</sup> p<0.02; <sup>b</sup> p<0.05; <sup>c</sup> p<0.01.

Diferencias significativas respecto al grupo control en la prueba de Mann-Whitney: \* p<0.006;

\*\*\* p<0.05; \*\*p<0.03; \*\*\*\*p<0.004; # p<0.002; ## p<0.021; #### p<0.01.

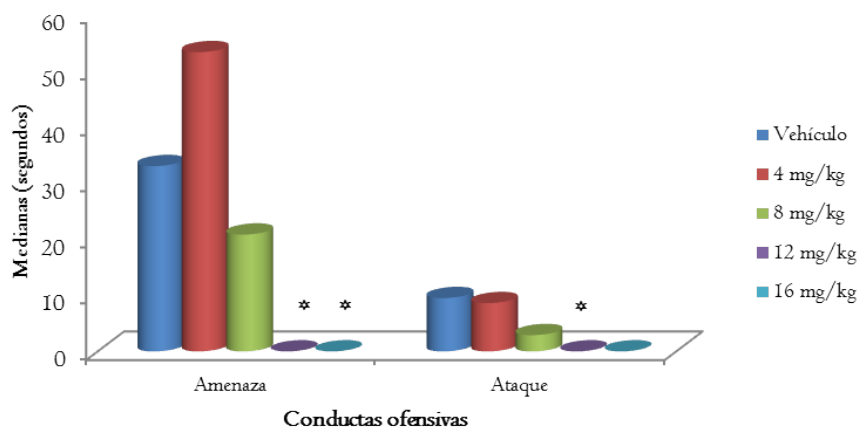


Figura 7.5.2. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con LY354740.

Prueba U de Mann-Whitney(diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo):

\* p<0.002 – p<0.01.

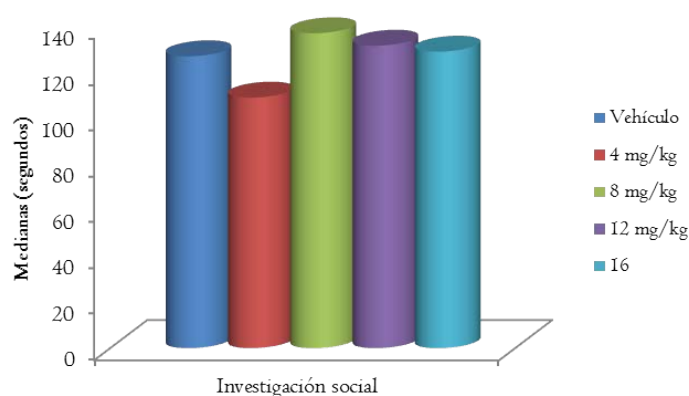


Figura 7.5.3. Medianas de tiempo en segundos para la categoría de investigación social con LY354740.

#### 7.5.4. Discusión breve

Los receptores metabotrópicos del grupo II se encuentran localizados tanto postsináptica como presinápticamente (Klodzinska et al., 1999). Independientemente de su localización sináptica, la estimulación de los receptores mGlu del grupo II produce respuestas inhibitorias en el cerebro. Por otro lado, los receptores mGlu2/3 están ampliamente distribuidos a través del SNC en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala. Estas regiones del cerebro están comúnmente asociadas con trastornos de ansiedad (Cryan y Dev, 2008). Así, hay una creciente evidencia que indica que la estimulación de los receptores metabotrópicos del tipo II reduce la ansiedad (Bespalov et al., 2008). No obstante, las implicaciones clínicas de los receptores mGlu2/3 no se circunscriben solo a la ansiedad/estrés, sino que abarca un amplio número de trastornos psiquiátricos y neurológicos (Marek, 2004). En este sentido, estructuras límbicas como la amígdala, la formación hipocampal, el área septal, la corteza prefrontal y el giro cingulado anterior, ejercen también importantes funciones moduladoras sobre la conducta agresiva, siendo el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal (PAG) las principales responsables de su expresión (Siegel et al., 2007; Siever, 2008). Por tanto, los receptores mGlu2 y mGlu3 se encuentran presentes en estructuras relacionadas con la agresión.

Como se puede observar en la tabla 7.5.I, la administración aguda del ligando selectivo LY354740 produjo una reducción significativa de las conductas ofensivas con la dosis de 12 mg/kg (amenaza y ataque), y de 16 mg/kg (amenaza), sin un aumento concomitante de las conductas de inmovilidad, sugiriendo un perfil antiagresivo específico (figura 7.5.2). Asimismo, la reducción de las conductas ofensivas se acompañó de una disminución de las conductas de

escarbar (12 y 16 mg/kg). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Navarro et al. (2009). Por otro lado, aunque se produce igualmente una disminución del cuidado corporal con las dosis utilizadas (4, 8, 12 y 16 mg/kg), conducta que está relacionada con la ansiedad/estrés, no apreciamos una acción ansiolítica ya que las conductas de exploración no social y, especialmente, de investigación social (fig 7.5.3), cuyo incremento se asocia tradicionalmente a una reducción de la ansiedad (Brain, Kusumorini y Benton, 1991; Navarro y Maldonado, 2004), no se han visto significativamente afectadas con ninguna de las dosis empleadas.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente experimento sugieren que los receptores metabotrópicos de glutamato mGlu2/3 podrían estar implicados en la modulación de la agresión, aunque serían necesarios realizar más estudios para clarificar el papel diferencial que podrían ejercer el receptor mGlu2 y mGlu3.

## EXPERIMENTO 6: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE JNJI6259685 SOBRE LA CONDUCTA AGONÍSTICA Y LA ACTIVIDAD C-FOS CEREBRAL.

### 7.6.I. Introducción

En los experimentos anteriores examinamos el papel de diferentes receptores metabotrópicos en la regulación de la conducta agresiva. De todos los receptores analizados, el más claramente implicado fue el receptor mGluI. Concretamente, se encontró que la administración aguda de JNJI6259685, con todas las dosis utilizadas (0.125-8 mg/kg i. p.), producía una potente disminución de las conductas ofensivas (amenaza y ataque), sin afectar al sistema motor. En el presente experimento, además de intentar replicar los resultados de los efectos agudos de JNJI6259685 sobre la conducta agonística que se obtuvieron en el experimento I, el objetivo ha sido analizar el posible desarrollo de tolerancia a los efectos antiagresivos tras 7 días consecutivos de administración subcrónica. Un objetivo adicional ha sido examinar la actividad c-Fos cerebral tras la prueba conductual y compararla a su vez con aquellos animales igualmente tratados pero que no han pasado por la experiencia agonística y que han permanecido agrupados.

La actividad neuronal puede conducir a la expresión de proteínas procedentes de la activación de determinados genes (denominados protooncogenes), que a su vez modifican la actividad de otros genes. Uno de los más estudiados ha sido el factor de transcripción c-Fos, que puede ser utilizado como marcador metabólico de alta resolución para trazar sistemas polisinápticos en el SNC (Herrera y Roberson, 1996; Sagar, Sharp y Curran, 1988). La expresión de c-Fos en neuronas específicas a menudo ocurre tras su activación, dando lugar a un mapa *in vivo* de las respuestas celulares hacia un estímulo dado (Morgan y Curran, 1995).

Por otro lado, en estudios anteriores se han visto patrones específicos de activación neuronal, medidos por la expresión c-Fos, en diversas estructuras cerebrales relacionadas con la conducta agonística (Haller, Tóth, Halasz y De Boer, 2006; Konoshenko, Timoshenko y Plyusnina, 2013; Pan, Xu, Young, Wang y Zhang, 2010). Así, en vista a la literatura previa, las estructuras que nos disponemos a analizar son las siguientes: corteza prefrontal prelímbica (PrL), infralímbica (IL) y cingulada (Cg); septum lateral dorsal (LSd) y ventral (LSv); núcleos hipotalámicos paraventricular (PVN), anterior (AH) y ventromedial (VMH); amígdala

basolateral (BLA) y medial (MeA); área tegmental ventral (VTA) y, por último, sustancia gris periacueductal anterior (PAG), lateral (LPAG) y dorsolateral (DLPAG).

### 7.6.2. Metodología

Se utilizaron un total de 204 ratones albinos machos de la cepa Swiss OF1. Todos los animales fueron asignados al azar a las distintas condiciones experimentales: (1) encuentro agonístico (n=156) y (2) agrupados y que no realizan la prueba conductual (n=48). Para ambas condiciones experimentales se formaron dos grupos controles que recibían suero salino o vehículo [salino (95%) más DMSO (5%)], y seis grupos experimentales que recibían las distintas dosis de JNJ16259685 (0.25, 0.5 and 1 mg/kg), de forma aguda o subcrónica (Fig 7.6.I). Para ello, se administraron los tratamientos de la siguiente manera: (a) tratamiento agudo: cada animal recibía suero salino durante 6 días consecutivos y JNJ16259685 en el día 7; (b) tratamiento subcrónico: cada animal recibía una inyección diaria de JNJ16259685 durante 7 días seguidos; (c) tratamiento vehículo: cada animal recibía una inyección diaria de vehículo [suero salino (95%) más DMSO (5%)] durante 7 días consecutivos; (d) tratamiento con suero salino: cada animal recibía una inyección diaria de suero fisiológico durante 7 días seguidos. Las interacciones agonísticas tuvieron lugar 30 min. después de la administración de los distintos tratamientos, en el día 7. Los animales para el posterior estudio inmunohistoquímico fueron perfundidos transcurrido un intervalo de 2 h desde la administración de los tratamientos (Navarro, Rivera, Maldonado, Cavas y de la Calle, 2004).

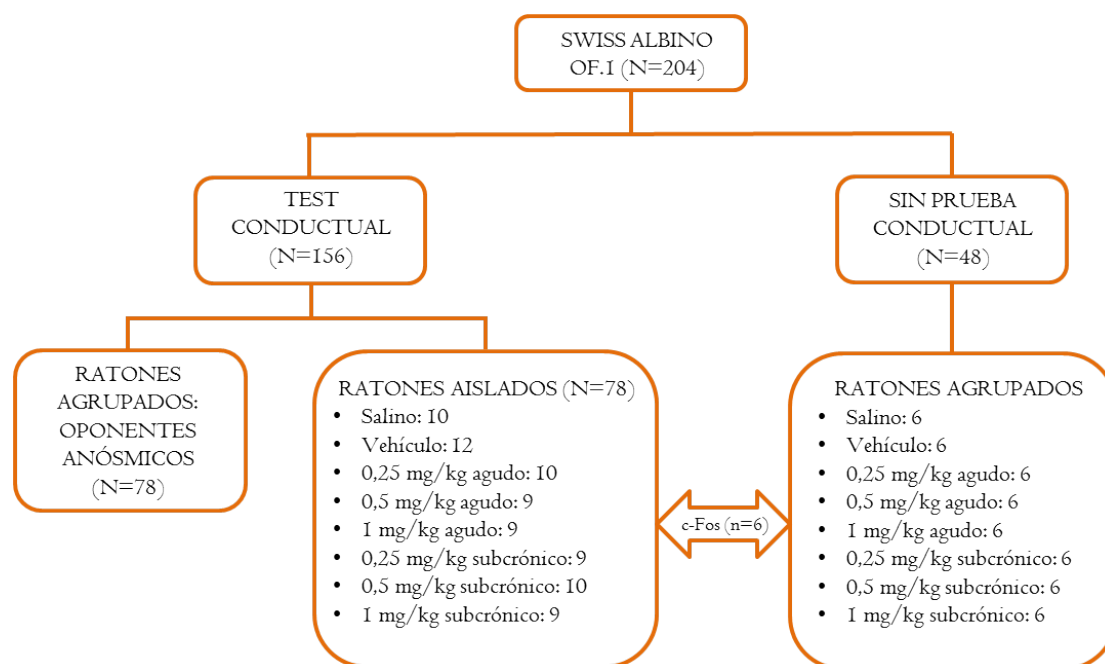


Figura 7.6.I. Diseño experimental con JNJ16259685 agudo y subcrónico.

### 7.6.3. Resultados

#### 7.6.3.1. Efectos de JNJI6259685 sobre la conducta agonística

Como muestra la tabla 7.6.I el análisis de Kruskal-Wallis indicó que existían diferencias estadísticamente significativas en las categorías de exploración no social, exploración a distancia, amenaza y ataque ( $p < 0.0001$  -  $p < 0.05$ ).

Cuando se realizó la prueba U de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles (salino y vehículo). Por otro lado, los datos revelaron que la administración aguda de JNJI6259685 reducía de forma significativa el tiempo empleado por los animales en las conductas de exploración a distancia (0.5 mg/kg:  $p < 0.028$ ), amenaza (0.5 mg/kg:  $p < 0.0001$ ; 1 mg/kg:  $p < 0.003$ ;) y ataque (0.5 mg/kg:  $p < 0.001$ ; 1 mg/kg:  $p < 0.023$ ), sin verse afectada la motilidad, en comparación con los animales del grupo vehículo, mientras que las conductas de exploración no social (0.5 mg/kg:  $p < 0.004$ ) se vieron significativamente incrementadas (Figura 7.6.2.). Este perfil conductual se mantuvo cuando se administró el fármaco de manera subcrónica. Así, se reducía de forma significativa el tiempo empleado por los animales en las conductas de amenaza (0.5 mg/kg:  $p < 0.003$ ; 1 mg/kg:  $p < 0.004$ ;) y ataque (0.5 mg/kg:  $p < 0.03$ ; 1 mg/kg:  $p < 0.018$ ), sin verse afectada la motilidad, en comparación con los animales del grupo vehículo. Además, disminuía el tiempo empleado en la categoría de cuidado corporal (0.25 mg/kg:  $p < 0.015$ ; 0.5 mg/kg:  $p < 0.004$ ; 1 mg/kg:  $p < 0.023$ ) y exploración a distancia (0.5 mg/kg:  $p < 0.021$ ). Por otro lado, las conductas de exploración no social (1 mg/kg:  $p < 0.049$ ) se vieron significativamente incrementadas. Las medianas para las categorías conductuales de evitación/huida, defensa/sumisión e inmovilidad fueron cero para todos los grupos.

Tabla 7.6.1. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes categorías conductuales en animales que reciben tratamiento agudo y subcrónico con JNJI6259685 (0,25-I mg/kg i. p.).

Categorías conductuales	Dosis aguda de JNJ (mg/kg)					Dosis subcrónica de JNJ		
	Salino	Vehículo	0,25	0,5	I	0,25	0,5	I
Cuidado corporal	10,64 (3-11)	14,82 (4-43)	7,23 (0-37)	8,81 (0-63)	6,88 (0-90)	<b>5,73**</b> (0-18)	<b>2,48**</b> (0-30)	<b>4,45*</b> (0-35)
Escarbar	2,58 (0-8)	2,14 (0-20)	7,41 (0-262)	5,77 (0-31)	2,21 (0-33)	2,8 (0-15)	4,95 (0-29)	1,43 (0-21)
Expl. no social <sup>b</sup>	325,13 (254-405)	347,34 (279-444)	386,3 (3-476)	<b>434,24**</b> (358-530)	388,96 (329-483)	368,47 (302-460)	382,75 (272-574)	<b>428,57*</b> (265-640)
Expl. a distancia <sup>c</sup>	23,5 (11-46)	19,45 (2-52)	25,91 (4-132)	<b>9,36*</b> (0,9-43)	21,86 (3-84)	8,87 (2-30)	<b>8,69*</b> (2-28)	12,17 (4-62)
Inv. social	86,97 (26-159)	64,95 (6-188)	76,61 (42-171)	133,61 (26-174)	123,97 (59-188)	128,13 (6-229)	150,69 (5-215)	113,54 (65-252)
Amenaza <sup>a</sup>	119,44 (24-199)	81,46 (0-255)	13,81 (0-145)	<b>0<sup>#</sup></b> (0-0)	<b>0<sup>**</sup></b> (0-78)	79,59 (0-110)	<b>0<sup>**</sup></b> (0-75)	<b>0<sup>**</sup></b> (0-193)
Ataque <sup>a</sup>	16,42 (2-82)	17,48 (0-46)	7,79 (0-31)	<b>0<sup>***</sup></b> (0-0)	<b>0<sup>*</sup></b> (0-28)	2,45 (0-153)	<b>0<sup>*</sup></b> (0-36)	<b>0<sup>**</sup></b> (0-48)
Evitación/huída	0,19 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-0,7)	0 (0-5)	0,27 (0-16)	0 (0-7)	0 (0-0,5)	0,27 (0-4)
Defensa/sumisión	0 (0-2)	0 (0-20)	0 (0-9)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-4)	0 (0-9)
Inmovilidad	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-93)	0 (0-0)

Prueba de Kruskal-Wallis: <sup>a</sup> p<0.0001; <sup>b</sup> p<0.01; <sup>c</sup> p<0.05

Diferencias con el vehículo en la prueba U de Mann-Whitney: <sup>#</sup> p<0.0001; <sup>\*\*\*</sup> p<0.001; <sup>\*\*</sup> p<0.01; <sup>\*</sup> p<0.05

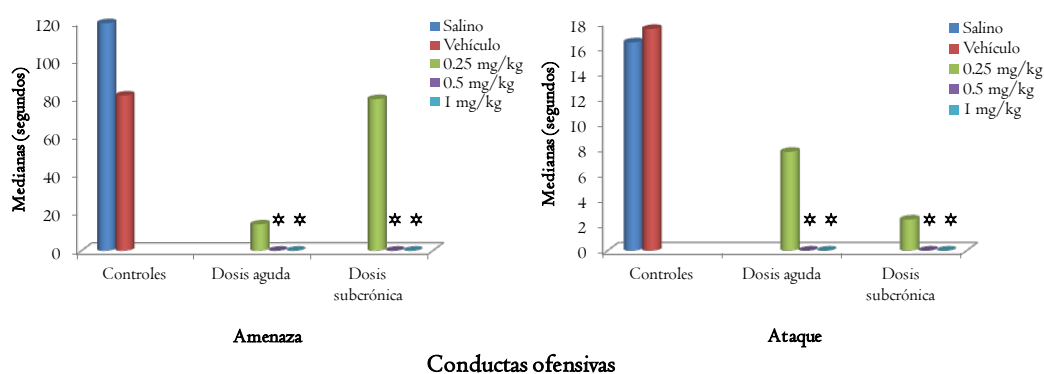


Figura 7.6.2. Medianas de tiempo en segundos para las categorías de amenaza y ataque con JNJI6259685.

Prueba U de Mann-Whitney (diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo):

\* p<0.0001 – p<0.05.

7.6.3.2. *Efectos de JNJ16259685 sobre la inmunorreactividad c-Fos inducida por las distintas condiciones experimentales (experiencia agonística vs agrupados)*

Cuando se aplicó el análisis de varianza de doble vía (condición experimental x tratamiento) los resultados mostraron que la experiencia agonística daba lugar a un incremento en la densidad de núcleos c-Fos en las siguientes estructuras: IL ( $F_{(1,368)}=12.265$ ;  $p<0.001$ ) y Cg ( $F_{(1,699)}=54.934$ ;  $p<0.001$ ); LSd ( $F_{(1,646)}=12.867$ ;  $p<0.001$ ) y LSv ( $F_{(1,682)}=51.942$ ;  $p<0.001$ ); PVH ( $F_{(1,548)}=41.436$ ;  $p<0.001$ ), AH ( $F_{(1,538)}=13.439$ ;  $p<0.001$ ) y VMH ( $F_{(1,549)}=4.201$ ;  $p=0.041$ ); MeA ( $F_{(1,643)}=94.661$ ;  $p<0.001$ ); y LPAG ( $F_{(1,644)}=3.969$ ;  $p=0.047$ ) (Figuras 7.6.3. y 7.6.4.). Además, se observó un efecto de tratamiento, así como de interacción entre la condición experimental y el tratamiento en PVN [ $(F_{(7,538)}=2.259$ ;  $p=0.028$ ) y  $(F_{(7,548)}=2.212$ ;  $p=0.032)$ ] y en AH [ $(F_{(7,538)}=2.266$ ;  $p=0.028$ ) y  $(F_{(7,538)}=3.033$ ;  $p=0.004)$ ]. Igualmente, el análisis de varianza mostró un efecto de interacción entre la condición experimental y el tratamiento en VMH ( $F_{(7,549)}=2.268$ ;  $p=0.028$ ) y también en LPAG ( $F_{(7,644)}=2.889$ ;  $p=0.006$ ).

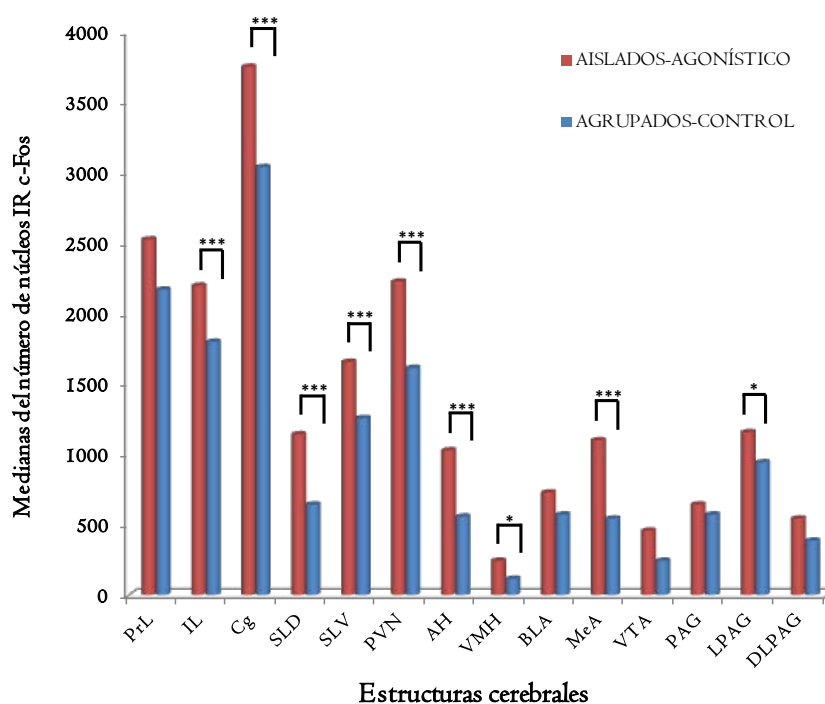


Figura 7.6.3. Medianas del número de núcleos inmunorreactivos c-Fos para las distintas estructuras cerebrales comparando los vehículos del grupo aislado con prueba conductual vs los vehículos que permanecieron agrupados. Anova de doble vía: \*\*\*  $p<0.001$ , \*  $p<0.05$ .



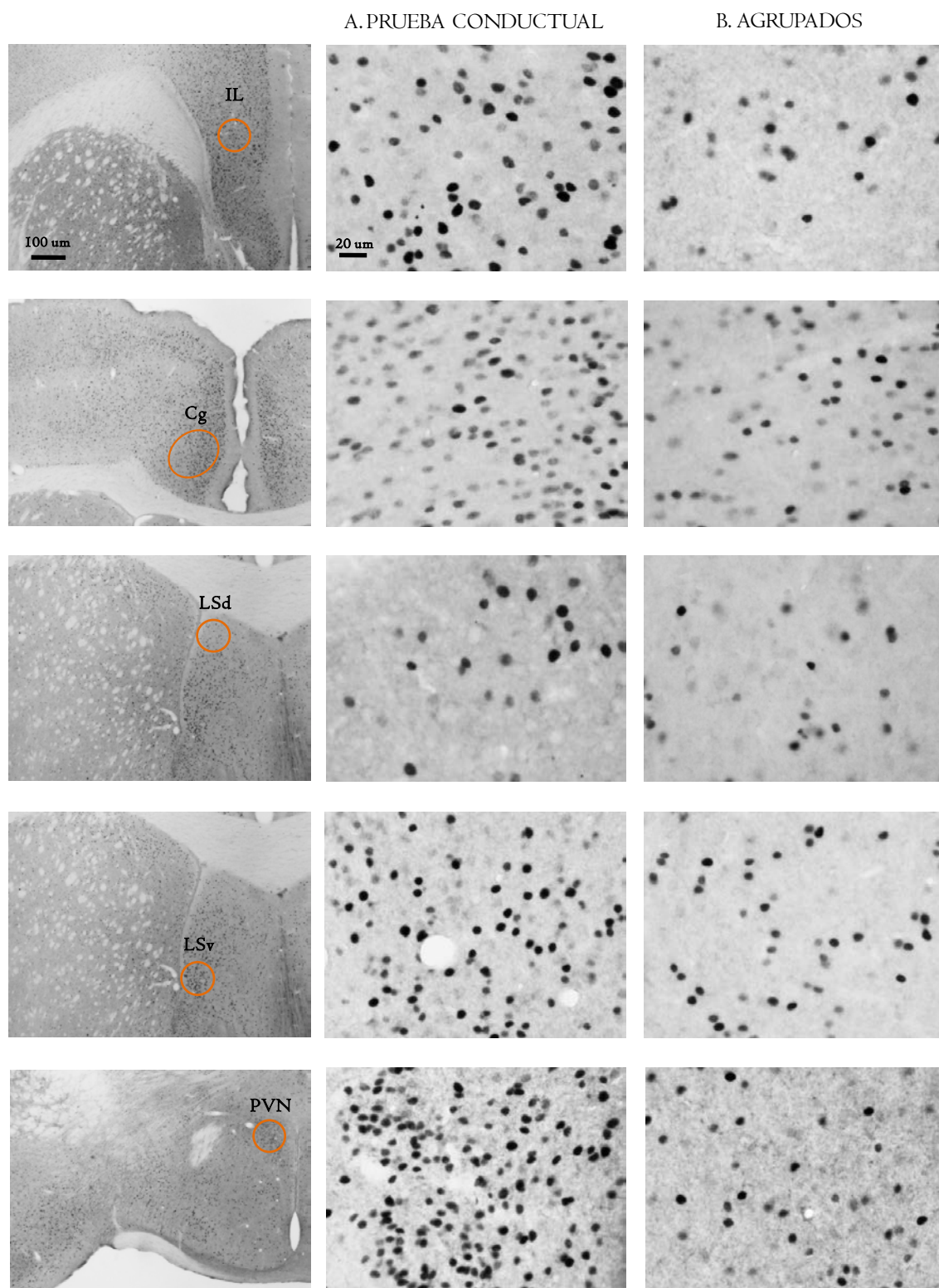


Figura 7.6.4. Microfotografías que representan la activación c-Fos para las distintas estructuras cerebrales comparando los vehículos del grupo aislado con prueba conductual vs los vehículos que permanecieron agrupados. IL: corteza infralímbica; Cg, corteza cingulada; LSd, septum lateral dorsal; LSv, septum lateral ventral; PVN, núcleo hipotalámico paraventricular.

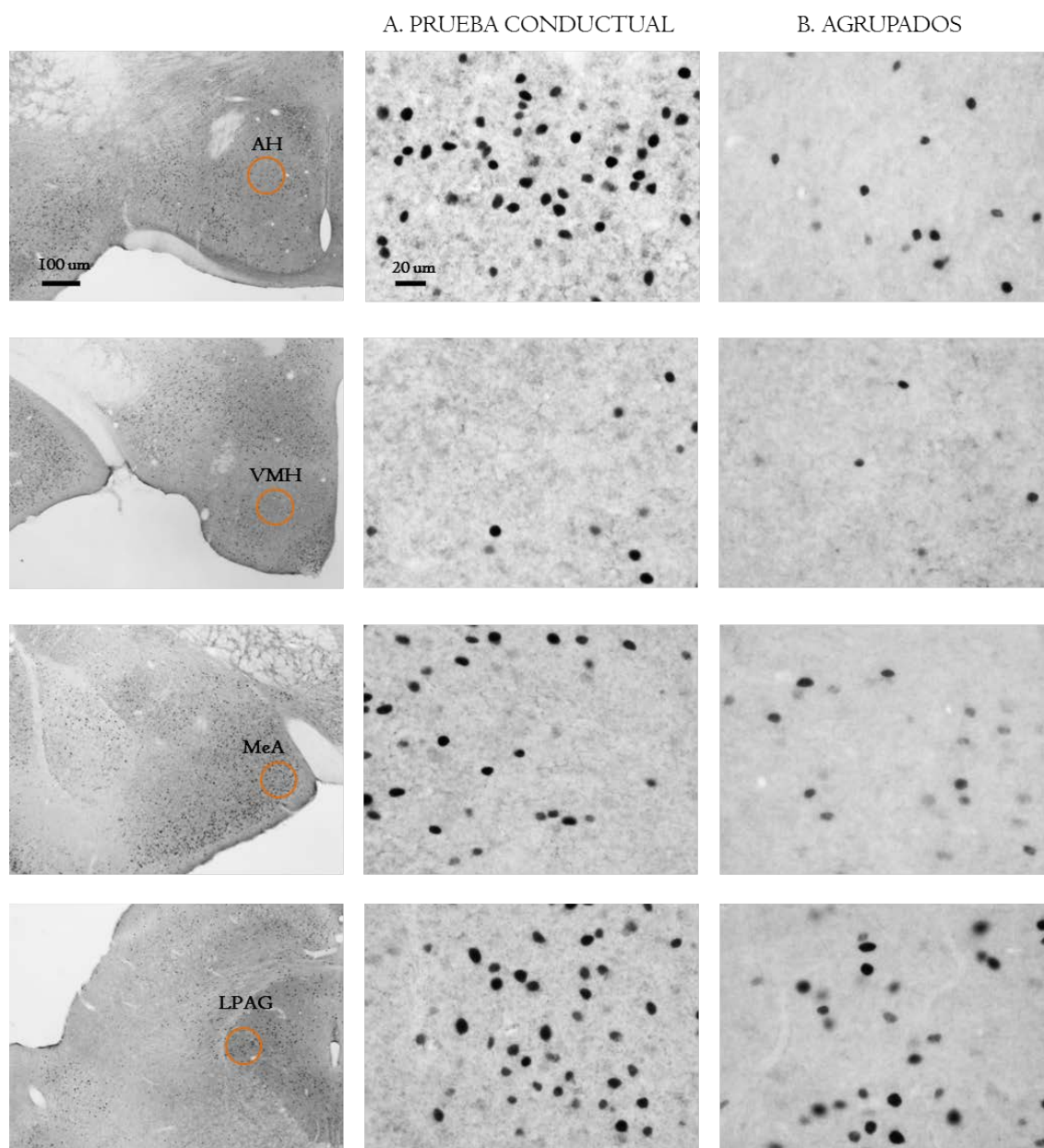


Figura 7.6.4. (continuación). Microfotografías que representan la activación c-Fos para las distintas estructuras cerebrales comparando los vehículos del grupo aislado con prueba conductual vs los vehículos que permanecieron agrupados. AH, núcleo hipotalámico anterior; VMH, núcleo hipotalámico ventromedial; MeA, amígdala medial; LPAG, sustancia gris periacueductal lateral.

Por otro lado, en el grupo de los animales que pasaron por el test conductual (tabla 7.6.2), el análisis de Kruskal-Wallis indicó que existían diferencias estadísticamente significativas en Cg ( $p < 0.023$ ), AH ( $p < 0.05$ ) y LPAG ( $p < 0.018$ ) y DLPAG ( $p < 0.000$ ). Cuando se realizó la prueba U de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles (salino y vehículo). Por otro lado, los datos revelaron que la administración de JNJI6259685 reducía de forma significativa el número de núcleos c-Fos en PrL (1 mg/kg agudo:  $p < 0.027$ ) y Cg (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.000$ , 0.5 mg/kg agudo:  $p < 0.045$ , 1 mg/kg agudo:  $p < 0.018$ ; 0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.047$ ); LSd (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.005$ , 0.5 mg/kg agudo:  $p < 0.021$ ; 0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.019$ , 1 mg/kg subcrónico:  $p < 0.022$ ); AH (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.017$ , 0.5 mg/kg agudo:  $p < 0.003$ , 1 mg/kg agudo:  $p < 0.017$ ; 0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.002$ , 1 mg/kg subcrónico:  $p < 0.026$ ); MeA (0.5 mg/kg agudo:  $p < 0.037$ ); VTA (0.25 mg/kg subcrónico:  $p < 0.033$ , 0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.028$ ); y, por último, PAG (0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.01$ ), LPAG (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.000$ , 0.5 mg/kg agudo:  $p < 0.012$ ; 0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.028$ , 1 mg/kg subcrónico:  $p < 0.005$ ) y DLPAG (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.026$ , 0.5 mg/kg agudo:  $p < 0.005$ , 1 mg/kg agudo:  $p < 0.031$ ; 1 mg/kg subcrónico:  $p < 0.000$ ), en comparación con el grupo vehículo (Fig. 7.6.5.a)

En cambio, en el grupo de animales que permanecieron agrupados (tabla 7.6.3), el análisis de Kruskal-Wallis indicó que existían diferencias estadísticamente significativas en PrL ( $p < 0.033$ ) y PVH ( $p < 0.046$ ). Cuando se realizó la prueba U de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles (salino y vehículo). Por otro lado, los datos revelaron que la administración de JNJI6259685 disminuía de manera significativa el número de núcleos c-Fos en PrL (0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.007$ ); BLA (0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.006$ ) y PAG (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.045$ ; 1 mg/kg subcrónico:  $p < 0.037$ ); mientras que aumentaba en PVN (0.25 mg/kg agudo:  $p < 0.028$ ; 0.25 mg/kg subcrónico:  $p < 0.05$ , 0.5 mg/kg subcrónico:  $p < 0.005$ , 1 mg/kg subcrónico:  $p < 0.041$ ), en comparación con el grupo vehículo (Fig. 7.6.5.b).

Tabla 7.6.2. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes estructuras cerebrales en animales con prueba conductual que reciben tratamiento agudo y subcrónico con JNJ16259685 (0,25- 1 mg/kg i. p.).

Estructuras cerebrales	EXPERIENCIA AGONÍSTICA							
	Dosis aguda de JNJ (mg/kg)			Dosis subcrónica de JNJ (mg/kg)				
	Salino	Vehículo	0,25	0,5	0,25	0,5	I	
Corteza prefrontal	prelímbrica	2500 (828-5086)	2528,57 (543-4600)	2114,29 (771-3857)	2257,14 (771-4571)	2085,71* (371-3971)	2285,71 (657-3828)	2228,57 (400-4114)
	infralímbica	2371,43 (1028-3914)	2200 (857-3571)	1942,86 (371-3257)	2142,86 (1371-4314)	1900 (714-4114)	1885,71 (686-3457)	2000 (657-4428)
	cingulada <sup>b</sup>	3542,86 (1943-5028)	3757,14 (1943-5000)	3000*** (1600-4971)	3328,57* (1886-5486)	3371,43* (2028-5428)	3457,14* (1514-5114)	3342,86 (943-5371)
Septum lateral	dorsal	1014,29 (286-2457)	1142,86 (314-2571)	657,14** (57-1886)	714,29* (28-2257)	885,71 (143-2057)	771,43* (86-2257)	714,29* (114-2314)
	ventral	1571,43 (400-3057)	1657,14 (714-27149)	1585,71 (628-2343)	1442,86 (686-2857)	1628,57 (714-2886)	1785,71 (971-26579)	1514,29 (600-4143)
Núcleos hipotalámicos	paraventricular	2428,57 (943-4428)	2228,57 (1143-3457)	2385,71 (943-3714)	2185,71 (314-3800)	2257,14 (543-3400)	2428,57 (1028-3800)	2100 (943-3886)
	anterior <sup>b</sup>	1042,86 (514-1714)	1028,57 (314-2686)	814,29* (200-1771)	771,43** (343-1686)	828,57* (200-1628)	900 (228-2428)	928,57* (171-2085)
	ventromedial	300 (28-1686)	242,86 (28-2600)	228,57 (28-1228)	185,71 (28-943)	171,43 (28-686)	271,43 (0-914)	171,43 (28-1171)
Amígdala	basolateral	685,71 (143-2028)	728,57 (171-1914)	628,57 (200-1914)	571,43 (171-2200)	571,43 (200-1171)	785,71 (57-1943)	500 (114-1943)
	medial	1185,71 (314-2257)	1100 (514-2171)	857,14 (314-2486)	800* (228-2057)	971,43 (0-1514)	1057,14 (285-2771)	857,14 (171-2371)
Área tegmental ventral	atv	285,71 (57-1143)	457,14 (0-1428)	228,57 (57-971)	300 (28-1457)	285,71 (0-1028)	171,43* (0-1143)	300 (0-1314)
	sgp	585,71 (200-1514)	642,86 (314-1771)	542,86 (257-1657)	557,14 (286-1600)	571,43 (228-1028)	671,43 (143-657)	500 (86-1800)
Sustancia gris periacueductal	lateral <sup>b</sup>	1171,43 (514-2143)	1157,14 (714-1828)	900*** (343-1514)	1000* (514-1771)	1014,29 (571-2428)	1085,71 (571-2171)	971,43** (400-2314)
	dorsolateral <sup>a</sup>	700 (57-2286)	542,86 (143-2771)	414,29* (86-1400)	371,43** (114-2971)	400* (171-4086)	528,57 (171-2600)	314,29*** (86-2371)

Prueba de Kruskal-Wallis: <sup>a</sup> p<0,0001; <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,05

Diferencias con el vehículo en la prueba U de Mann-Whitney: # p<0,0001; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05

Tabla 7.6.3. Cálculo de medianas (con rangos) del tiempo (en segundos) distribuidos en las diferentes estructuras cerebrales en animales que permanecieron agrupados con tratamiento agudo y subcrónico con JNJ16259685 (0,25-1 mg/kg i. p.).

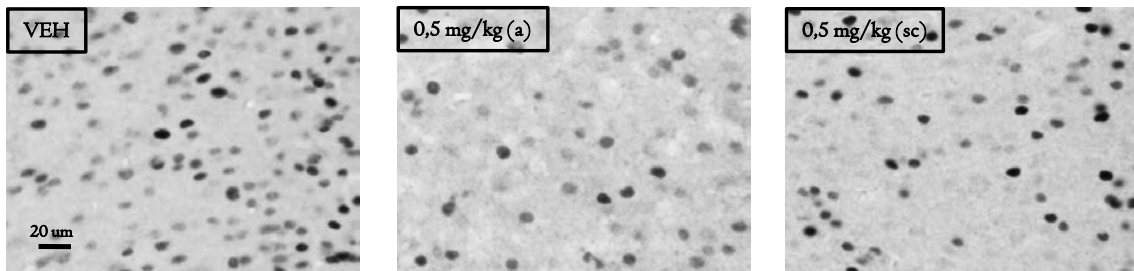
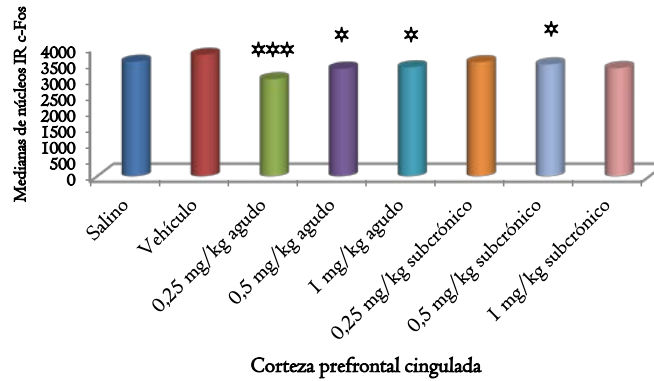
Estructuras cerebrales	Dosis aguda de JNJ (mg/kg)					Dosis subcrónica de JNJ (mg/kg)				
	Salino	Vehículo	0,25	0,5	I	0,25	0,5	0,5	I	I
Corteza prefrontal	prelímica <sup>b</sup>	2300 (657-3943)	2171,43 (686-3886)	2357,14 (457-5800)	2128,57 (457-5000)	2185,71 (343-5457)	2142,86 (428-4600)	<b>1628,57</b> <sup>**</sup> (171-4943)	2428,57 (628-4200)	
	infralímica	1457,14 (286-3200)	1800 (771-3228)	1485,71 (400-4943)	1400 (343-6514)	1800 (171-4343)	1357,14 (143-3514)	1571,43 (514-6686)	1671,43 (686-3657)	
	cingulada	2800 (457-5486)	3042,86 (114-5400)	2900 (1286-5914)	2642,86 (486-6228)	2814,29 (857-7314)	2685,71 (686-5857)	2428,57 (800-6857)	2800 (1057-4771)	
Septum lateral	dorsal	557,14 (57-2257)	642,86 (86-1971)	614,29 (86-2143)	557,14 (28-2543)	557,14 (57-2371)	585,71 (28-2686)	571,43 (57-2286)	628,57 (0-2114)	
	ventral	1200 (314-3486)	1257,14 (571-2257)	1200 (486-3143)	1128,57 (200-3828)	1257,14 (200-2628)	1257,14 (286-3228)	1157,14 (257-3114)	1228,57 (428-3228)	
	paraventricular	1371,43 (257-2771)	1614,29 (543-2771)	<b>1971,43</b> <sup>*</sup> (657-3771)	1571,43 (257-4114)	1714,29 (314-2971)	1814,29 (428-3857)	<b>2200</b> <sup>**</sup> (1086-3857)	<b>1942,86</b> <sup>*</sup> (857-3971)	
Núcleo hipotalámico	anterior	528,57 (143-2343)	557,14 (143-2571)	485,71 (86-2171)	428,57 (114-2971)	642,86 (86-2200)	614,29 (114-2628)	657,14 (200-4800)	542,86 (86-3086)	
	ventromedial	100 (0-2228)	114,29 (0-2657)	85,71 (0-3743)	85,71 (0-4314)	114,29 (0-3028)	142,86 (0-2000)	157,14 (0-4114)	85,71 (0-2771)	
	basolateral	485,71 (143-1914)	571,43 (143-2000)	485,71 (57-1943)	542,86 (143-3028)	542,86 (0-2086)	542,86 (57-2286)	<b>400</b> <sup>**</sup> (86-2371)	500 (114-2171)	
Amígdala	medial	457,14 (28-2086)	542,86 (28-1914)	328,57 (0-3086)	314,29 (28-3686)	371,43 (0-1943)	571,43 (0-2114)	371,43 (0-4200)	514,28 (28-2086)	
	atv	214,29 (0-2143)	242,86 (28-1314)	271,43 (28-1457)	400 (28-1771)	157,14 (57-1714)	200 (0-1228)	114,29 (28-1686)	114,29 (0-1428)	
	sgp	342,86 (28-1971)	571,43 (143-1886)	<b>357,14</b> <sup>*</sup> (86-1886)	285,71 (86-2000)	385,71 (114-2114)	385,71 (28-2400)	357,14 (114-2028)	<b>371,43</b> <sup>*</sup> (114-2000)	
Sustancia gris periacueductal	lateral	942,86 (371-2457)	942,86 (343-2057)	871,43 (428-3200)	857,14 (371-2743)	871,43 (343-2171)	957,14 (428-1971)	914,29 (371-2914)	942,86 (114-2257)	
	dorsolateral	457,14 (57-1628)	385,71 (86-1857)	257,14 (0-3286)	314,29 (0-3686)	414,29 (28-3486)	400 (86-3114)	414,29 (57-3686)	414,29 (57-1743)	

Prueba de Kruskal-Wallis: <sup>b</sup> p<0.01.

Diferencias con el vehículo en la prueba U de Mann-Whitney: <sup>\*\*</sup> p<0.01; <sup>\*</sup> p<0.05

## A. EXPERIENCIA AGONÍSTICA

a.1.



a.2.

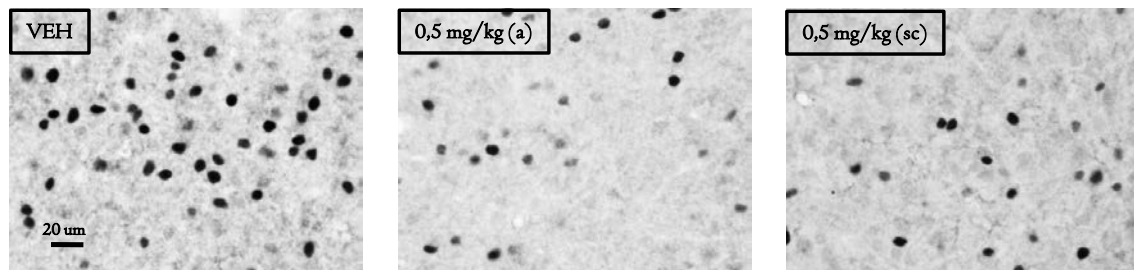
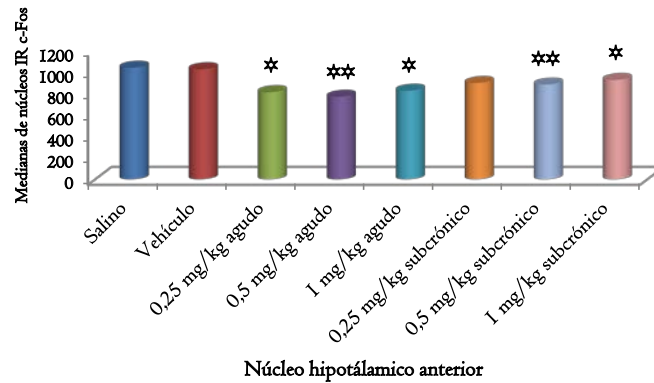


Figura 7.6.5.a. Medianas del número de núcleos inmunorreactivos c-Fos y microfotografías que representan la activación c-Fos comparando el grupo vehículo con las dosis intermedias, aguda y subcrónica, para la corteza cingulada (a.1.) y para el núcleo hipotálamico anterior (a.2.), en el grupo que permanecieron aislados y pasaron por la prueba conductual. U Man-Whitney: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

a.3.

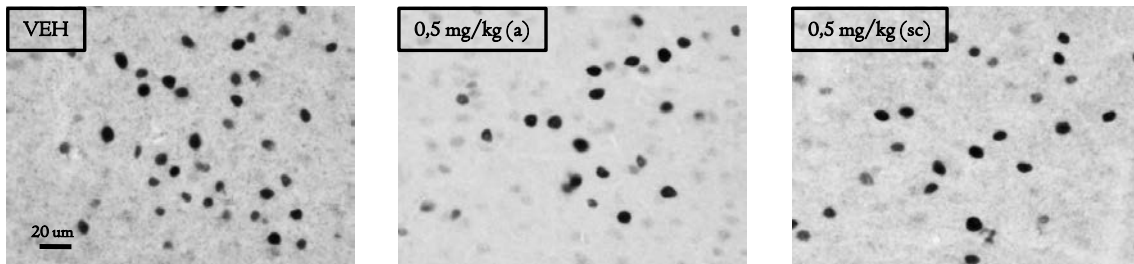
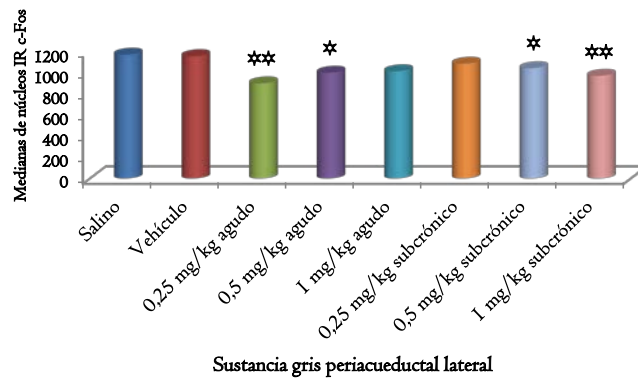


Figura 7.6.5.a. (continuación). Medianas del número de núcleos inmunorreactivos c-Fos y microfotografías que representan la activación c-Fos comparando el grupo vehículo con las dosis intermedias, aguda y subcrónica, para la sustancia gris periaqueductal lateral (a.3.) en el grupo que permanecieron aislados y pasaron por la prueba conductual. U Man-Whitney: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

## B. AGRUPADOS

b.1.

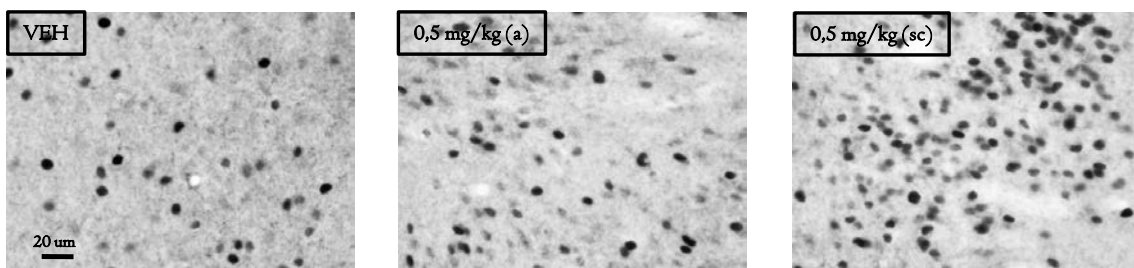
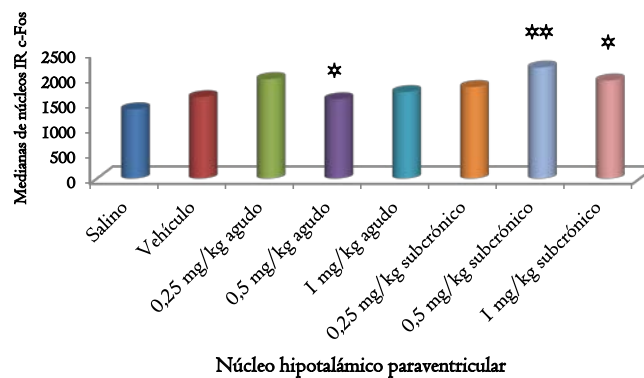


Figura 7.6.5.b. Medianas del número de núcleos inmunorreactivos c-Fos y microfotografías que representan la activación c-Fos comparando el grupo vehículo con las dosis intermedias, aguda y subcrónica, para el núcleo hipotalámico paraventricular (b.1.) en el grupo que permanecieron agrupados y que, por tanto, no pasaron por la prueba conductual. U Man-Whitney: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

#### 7.6.4. Discusión breve

En el presente estudio, se ha observado que la administración aguda y subcrónica de JNJI6259685 (0.5 y 1 mg/kg) reduce de forma significativa las conductas ofensivas de amenaza y ataque. Además esta reducción va acompañada de un aumento de exploración no social. Estos resultados son muy similares a los que se obtuvieron en el experimento I, replicándose así los efectos antiagresivos producidos por el fármaco. No obstante, con la dosis más baja (0.25 mg/kg), aunque se observa una disminución de la conducta agresiva, no es estadísticamente significativa. Una explicación posible podría estar relacionada con la cantidad de DMSO utilizado (Cavas, Beltran y Navarro, 2005), ya que en el primer experimento la dilución se hizo al 10% mientras que en este último se redujo al 5%. Así, el DMSO que se utiliza generalmente como solvente universal, también puede potenciar el efecto de la sustancia que disuelve, produciéndose una actividad sinérgica (Parcell, 2002; Jacob y de la Torre, 2009). Asimismo, la conducta de escarbar, a diferencia del experimento I, tampoco se ve afectada. Esto podría deberse a un efecto del diseño experimental, ya que en esta ocasión los animales fueron manipulados durante 7 días, mientras que en el primer experimento se les cogió e inyectó en un único día. Por otro lado, la conducta de cuidado corporal se ha visto disminuida de manera significativa con todas las dosis del tratamiento subcrónico, mientras que con el tratamiento agudo no ha sido afectada. Cabe destacar que en el experimento anterior, esta categoría conductual se veía igualmente afectada pero con dosis mayores (2, 4 y 8 mg/kg), por lo que se podría inferir que se produce un efecto acumulativo del fármaco. No obstante, y al margen de estas diferencias comentadas, la administración subcrónica de JNJI6259685 no desarrolla un efecto de tolerancia, demostrando el compuesto un robusto efecto antiagresivo mantenido en el tiempo.

La reducción de la conducta agresiva fue acompañada por una disminución de activación c-Fos en la corteza cingulada, septum lateral dorsal, núcleo hipotalámico anterior y sustancia gris periacueductal lateral y dorsolateral. Estas estructuras cerebrales participan en la regulación de la conducta agonística (Davis y Marler, 2004; Delviller, De Vries y Ferris, 2000; Gammie y Nelson, 2001; Halász, Liposits, Meelis, Kruk y Haller, 2002; Haller et al., 2006; Hansen y Gammie, 2005; Kollack-Walker y Newman, 1995; Konoshenko et al., 2013; Pan et al., 2010; Potegal, Blau y Glusman, 1981).

La corteza cingulada parece estar relacionada con la toma de decisión de atacar. Hansen y Gammie (2005) encontraron altos niveles de activación en ratones hembras lactantes enfrentadas



a un macho intruso, utilizando un modelo de agresión maternal. Estos resultados están en consonancia con los nuestros. En nuestra investigación, los resultados muestran un aumento significativo de activación en esta estructura cuando comparamos los aislados/experiencia agonística vs animales agrupados; además, esta activación es inhibida cuando se administra JNJI6259685. Igualmente, Haller et al. (2006) encontraron un aumento de activación en esta región provocada por el encuentro agonístico, siendo mayor en los ratones SAL (de corta latencia de ataque; SALs, del inglés *short attack latency mice*) que en los LALs (de larga latencia de ataque; LALs, de sus siglas en inglés “*long attack latency mice*”), aunque estas diferencias son fundamentalmente dependientes de cepa. Del mismo modo, Hálasz et al., (2002) observaron una fuerte activación c-Fos en la ratas respondientes, es decir aquellas que atacaban tras ser expuestas a estimulación eléctrica el área hipotalámica de ataque (HAA, del inglés *hypothalamis attack area*). Por el contrario, Pan et al. (2010), quienes examinaron el diferente patrón de activación c-Fos en hamsters, distinguiendo al animal dominante del subordinado durante el encuentro agonístico, no encontraron diferencias sobre la activación de la corteza cingulada entre los distintos grupos (control, dominante y subordinado), sugiriendo un circuito neuronal específico de especie.

La activación del septum lateral está relacionada con el control de la agresión. Potegal et al. (1981) encontraron que la agresión ofensiva era inhibida por estimulación eléctrica del septum. Hálasz et al. (2002) observaron activación de esta área tras la estimulación eléctrica del HAA y Haller et al. (2006) describieron una activación significativa de esta área tras el encuentro agonístico en los ratones LAL, pero no en los SALs. Por su parte, Davis y Marler (2004), quienes estudiaron el nivel de agresividad de las hembras a lo largo de todo el ciclo estral, encontraron un incremento de la expresión c-Fos en ratones hembras expuestas a congéneres intrusas comparadas con las hembras control, pero observaron que el aumento de c-Fos en LSv se daba sólo en las hembras más agresivas (período diestro). En esta misma línea, se encuentran los trabajos de diferentes autores, como Kollack-Walker y Newman (1995) quienes evidenciaron activación del LSv tras el encuentro agonístico, o Hasen y Gammie (2005) cuyos resultados mostraron altos niveles de IR c-Fos en el LSv en las ratas hembras vírgenes expuestas a machos intrusos. Por el contrario, Gammie y Nelson (2001) no observaron activación c-Fos en ratones hembras lactantes enfrentadas a machos intrusos; y en estudios con hamsters, Pan et al. (2010) tampoco encontraron activación del septum lateral. Nuestros resultados muestran un aumento significativo de activación c-Fos tanto en el LSv como en el LSd tras el encuentro agonístico. No obstante, la administración del fármaco disminuye esta activación en el LSd, sin producir ningún efecto significativo sobre el LSv.

En cuanto al AH, al igual que el LS, ha sido implicado en la regulación de la conducta agresiva. Kollack-Walker y Newman (1995) encontraron un incremento selectivo del número de neuronas IR-Fos en el AH tras el encuentro agonístico. Igualmente, Haller et al. (2006) observaron una fuerte activación c-Fos en esta región, tanto en los ratones SAL como en los LALs. Aunque, existen otros estudios en los que no se observa un efecto significativo en el AH después del encuentro agonístico (Davis y Marler, 2004; Deville et al., 2000). Por otro lado, Pan et al. (2010) observaron que el aumento de densidad de las células IR c-Fos se daba en los hamsters subordinados, en consonancia con resultados previos que correlacionaba el aumento de c-Fos con la conducta defensiva en diferentes roedores (Matsuda et al., 1996; Olivier, Olivier-Aardema y Wiepkema, 1983). En la presente investigación, los resultados ponen en evidencia una fuerte activación de núcleos IR c-Fos en el AH en los animales que realizan la prueba conductual, siendo esta activación disminuida significativamente con la administración de JNJI6259685.

Finalmente, PAG es una de las principales regiones responsables de la expresión de la agresión. Kollack-Walker y Newman (1995) encontraron aumento significativo de activación en esta región, en concreto en PAG dorsal, en los hamsters expuestos a una interacción agonística. Del mismo modo, Haller et al. (2006) observaron cambios significativos específicos de subregiones y de la cepa. Así, describieron un aumento de activación de PAG dorsomedial, lateral y ventrolateral en los ratones SAL, mientras que la activación de DLPAG se daba en los ratones LAL. Por su parte, Hasen y Gammie (2005) registraron activación del LPAG en ratones hembras no lactantes (vírgenes) enfrentadas a un macho intruso. Y por otro lado, Hålasz et al. (2002) observaron que la estimulación *per se* del HAA inducía activación c-Fos en esta área en ratas. En nuestra investigación, hemos observado que se produce un aumento significativo de núcleos c-Fos en LPAG cuando comparamos los ratones aislados/prueba conductual vs agrupados, siendo esta activación disminuida significativamente tras la administración de JNJI6259685. Además, el fármaco inhibe de manera significativa la activación c-Fos en DLPAG en el grupo de ratones con experiencia agonística.

Un patrón diferente de expresión c-Fos se observó en los animales que permanecieron agrupados y que, por tanto, no pasaron por el encuentro agonístico. Así, se produjo un aumento de activación neuronal fundamentalmente en el núcleo hipotalámico paraventricular tras la administración de JNJI6259685. La activación de esta estructura no es específica de la conducta agresiva y está mayormente involucrado en respuesta al estrés y regulación de miedo (Hålasz et

al., 2002; Konoshenko et al., 2013). Lo que concuerda con nuestros resultados, ya que se produce un aumento significativo de núcleos IR c-Fos en los animales que pasan por la prueba conductual sin producirse ningún efecto significativo del compuesto.

Para terminar, y centrándonos en las comparaciones de los grupos vehículos de ambas condiciones experimentales (agonísticos vs agrupados), además de lo comentado en los párrafos anteriores, esto es, aumento significativo de actividad c-Fos en los animales que pasaron por el encuentro agonístico en estructuras como la corteza prefrontal medial, SL, núcleos hipotálamicos y PAG, también se observaron cambios en MeA, la cual debe ser necesaria para la expresión de la conducta agresiva, aunque no es crucial en el control del nivel de agresión que el individuo exhibe (Davis y Marler, 2004). En este sentido, Kollack-Walker y Newman (1995) postularon que el aumento de actividad neuronal debía estar relacionado con el aumento de arousal más que con la agresión. Asimismo, Pan et al (2010) encontraron niveles similares de aumento de expresión c-Fos tanto en los animales subordinados como en los dominantes. Igualmente, nuestros resultados muestran un aumento significativo de activación en esta región tras el encuentro agonístico, sin que el fármaco produzca ningún efecto.

Así pues, se puede concluir que el tratamiento agudo con JNJI6259685 produce una robusta acción antiagresiva y, además, no se desarrolla tolerancia a los efectos antiagresivos tras el tratamiento subcrónico con el fármaco. Por otro lado, la experiencia agonística produce un patrón específico de activación c-Fos cerebral y el bloqueo de los receptores mGluI por la administración de JNJI6259685 modifica esta expresión de núcleos c-Fos en áreas corticolímbicas que participan en la conducta agresiva. Por tanto, estos resultados confirman la implicación del receptor mGluI en la modulación de la agresión.

---

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

---

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de la implicación de los receptores metabotrópicos de glutamato sobre la conducta agresiva en ratones macho, utilizando un modelo de agresión inducida por aislamiento. Este modelo ha sido ampliamente empleado en el estudio de la psicofarmacología de la agresión, permitiendo poner de manifiesto la implicación de otros sistemas de neurotransmisión en la conducta agresiva. En trabajos previos se ha sugerido una implicación del sistema glutamatérgico sobre la agresión (véase apartado 4 “Glutamato y agresión”), pero con muy escasos estudios que evaluaran el papel que juegan sus receptores metabotrópicos (mGlu) en la modulación de la conducta agresiva.

A continuación, se muestra un cuadro-resumen con los principales resultados conductuales obtenidos tras la administración de los distintos ligandos de los receptores metabotrópicos del glutamato sobre la conducta agresiva.

Tabla 8.I. Cuadro-resumen de los resultados principales de conducta obtenidos en nuestra investigación.

GRUPO	SUBTIPO	LIGANDO	DOSIS	RESULTADOS PRINCIPALES	CONCLUSIONES
GRUPO I	mGlu1	JNJ16259685 (antagonista)	0.125 - 8 mg/kg	1- Disminución de conductas ofensivas (amenaza y ataque) y escarbar. 2- Aumento de exploración no social. 3- Sin inmovilidad.	I- Potente efecto antiagresivo con todas las dosis.
GRUPO II	mGlu2/3	LY354740 (agonista)	4 - 16 mg/kg	1- Disminución de conductas ofensivas y escarbar (12 y 16 mg/kg) 2- Aumento de exploración a distancia (12 mg/kg). 3- Sin inmovilidad.	I- Acción antiagresiva (12 y 16 mg/kg).
GRUPO III	mGlu7	AMN082 (agonista)	0.5 - 4 mg/kg	1- Disminución de conductas ofensivas y escarbar (4 mg/kg). 2- Aumento de conductas exploratorias (expl. a distancia y expl. no social) (4 mg/kg). 3- Sin inmovilidad.	I- Acción antiagresiva (4 mg/kg).
	mGlu8	(S)-3,4-DCPG (agonista)	2.5 - 10 mg/kg	I- Sin significaciones estadísticas en ninguna categoría conductual.	I- No está implicado en la modulación de la agresión.
		(RS)-3,4-DCPG (antagonista mixto AMPA y agonista mGlu8)	5 - 20 mg/kg	I- Sin significaciones estadísticas en ninguna categoría conductual.	I- No está implicado en la modulación de la agresión.

Como puede observarse, los receptores del grupo I están implicados en la regulación de la agresión. Así, como hemos visto en el experimento I, el compuesto JNJ16259685, un

antagonista selectivo del receptor mGluI, produce un potente efecto antiagresivo, sin afectación de la motilidad. Estos resultados fueron similares a los que obtuvieron Navarro et al. (2006), quienes encontraron que el MPEP, un antagonista selectivo del receptor mGlu5, reducía las conductas de amenaza y ataque con todas las dosis utilizadas (5-25 mg/kg) en el mismo modelo de agresión en ratones machos. No obstante, el efecto de este último estaba acompañado por una acción ansiolítica, ya que también se apreciaba un aumento de las conductas exploratorias (exploración no social e investigación social). De hecho, numerosos estudios han constatado una implicación de los receptores mGlu5 en la modulación de la ansiedad, así como en otros trastornos (Bird et al., 2014; Inta et al., 2013; Lapidus, Soleimani y Murrough, 2013; Newel y Matosin, 2014; Pitsikas, 2014). Por el contrario, el receptor mGluI ha sido menos investigado, si bien recientemente se ha observado, en un estudio preliminar, que la administración aguda de 0.5 mg/kg de JNJI6259685 consigue reducir de forma significativa la agresión intensificada por instigación social en el modelo de agresión inducida por aislamiento (Martín-López et al., 2014), reforzando así la implicación del receptor mGluI en la agresión, descrita en este trabajo.

Se ha hipotetizado que los antagonistas del receptor mGluI combinan un efecto de estimulación en el sistema GABAérgico con un efecto inhibitorio en la actividad del receptor NMDA (Lesage y Steckler, 2010; Palucha y Pilc, 2007). Los antagonistas del receptor mGluI tienen la capacidad de incrementar la liberación de GABA y de atenuar la función del receptor NMDA en numerosas estructuras cerebrales. Además, los receptores mGluI se expresan en regiones del cerebro claves en la regulación de la agresión, como el hipotálamo, PAG y amígdala. Los receptores mGluI se localizan principalmente a nivel postsináptico, y cuando colocalizan con los receptores NMDA, los receptores del grupo I pueden modular la actividad de estos canales iónicos dependientes de voltaje (Sherman, 2014). De este modo, ha sido documentado que la activación farmacológica de los receptores mGluI facilitan las respuestas NMDA en las neuronas corticales, en la región CA3 del hipocampo y en el tálamo. En línea con estos resultados, los antagonistas de los receptores mGluI han demostrado bloquear las respuestas mediadas por el receptor NMDA en cultivos corticales y en el tálamo de ratas anestesiadas. La activación del receptor mGluI por DHPG, en presencia del antagonista MPEP del receptor mGlu5, induce la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA, mientras que el antagonista no competitivo CPCCOEt del receptor mGluI lo bloquea. Esta reducción de la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA mediada por los antagonistas del receptor mGluI ha sido incluso documentada en la corteza tras un evento isquémico, lo que sugiere que la activación del receptor mGluI facilita la expresión de las

subunidades NR2A y NR2B. Por otro lado, la activación de los receptores del grupo I reduce la transmisión sináptica GABAérgica en el hipocampo, SGP y estriado, a través de la inhibición de los receptores NMDA. Por lo tanto, la notable acción antiagresiva observada podría deberse a la interacción de estos dos sistemas, GABA y Glu, aunque no se puede descartar la implicación de otros sistemas de neurotransmisión relacionados con la conducta agresiva, como el sistema serotoninérgico (Nelson y Chiavegatto, 2001; Takahashi y Miczek, 2013), y por ende, de este último con otros, produciéndose así interacciones dinámicas (Miczek et al., 2007).

Una vez establecida la relación entre el grupo I de los mGluRs y la conducta agresiva, se continuó el estudio con el grupo III de los mGluRs. El receptor mGlu7 ha sido propuesto como uno de los más importantes por su implicación en los diferentes trastornos del estado del ánimo, debido a su amplia distribución en el SNC y a su localización en regiones cerebrales relevantes como la amígdala, hipocampo o hipotálamo (Kinoshita et al., 1998). Es de destacar que los mGluR7 se encuentran localizados exclusivamente cerca o dentro de la zona activa de los terminales presinápticos de las neuronas glutamatérgicas, lo que sugiere que el receptor mGlu7 es un autorreceptor con un papel específico en la regulación de la liberación de glutamato en las sinapsis (Glaum y Miller, 1997). Además, estos receptores se localizan en las interneuronas presinápticas GABAérgicas actuando como heteroreceptores (Cartmell y Schoep, 2000), lo que debe contribuir de manera significativa al modo en el que potenciales agentes farmacoterapéuticos que actúan sobre mGlu7 deben modular la neurotransmisión. Asimismo, el receptor mGlu7 posee baja afinidad para el glutamato (Mercier y Lodge, 2014; Schoepp, Jane y Monn, 1999) lo que indica que sólo estará involucrado en situaciones donde las concentraciones de glutamato extracelulares sean elevadas (Sukoff Rizzo et al., 2011).

En el experimento 2, analizamos el efecto del AMN082, un modulador alostérico positivo del receptor mGlu7, sobre la conducta agonística. Los resultados evidenciaron que las dosis más altas utilizadas (4 y 8 mg/kg) poseían actividad antiagresiva. No obstante, la dosis mayor tuvo que ser descartada porque se asociaba a unos efectos colaterales no deseados que impedían analizar la conducta agresiva en sí misma, ya que provocaba una potente inmovilidad. Este efecto inespecífico y la consecuente afectación del sistema motor ya había sido documentado con anterioridad (Palucha et al., 2007; Salling, Faccidomo y Hodge, 2008), aunque con dosis más altas (10 y 17 mg/kg, respectivamente). Por otro lado, con la dosis de 4 mg/kg se observó una acción antiagresiva, mientras que las dosis más bajas no produjeron ningún efecto. Una posible explicación de estos resultados puede estar en relación con la actividad constitutiva que presenta el receptor mGlu7 (Kammermeier, 2015), dando lugar a una sobreactivación del

receptor de modo que las dosis más bajas producen internalización (Pelkey Yuan, Lavezzari, Roche, y McBain, 2007), mientras que las más altas dan lugar a una exacerbación de los efectos. Otra posible explicación podría tener que ver con el tiempo transcurrido desde que se aplicó el tratamiento hasta que tuvo lugar el encuentro agonístico (1 h en nuestro experimento). Así, se ha demostrado que AMN082 alcanza su pico máximo de concentración a los 30 min. y a partir de ahí comienza a descender su concentración tanto en el cerebro como en el plasma sanguíneo (Sukoff Rizzo et al., 2011).. Por otro lado, Sukoff Rizzo et al. (2011) demostraron que después de la administración periférica este compuesto se metaboliza rápidamente dando lugar a un metabolito principal (Met-I) que presenta afinidad hacia múltiples transportadores de monoaminas (SERT, DAT y NET). Además, mientras que el compuesto original transcurrido 1 hora se encuentra reducido a niveles modestos, su metabolito Met-I continúa aumentando en el cerebro.

La activación del receptor mGlu7 es responsable, al menos parcialmente, de la regulación de la liberación de glutamato y GABA (Cartmell y Schoepp, 2000; Mercier y Lodge, 2014), por lo que se puede suponer que el mecanismo del efecto antiagresivo debe estar relacionado con la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica y/o GABAérgica. Estudios previos ha aportado evidencia de la existencia de autorreceptores presinápticos mGlu7 que controlan la liberación de glutamato en el SNC (Millán et al., 2002a, b; Martín et al., 2008, 2010). Por su parte, Summa et al. (2013) han constatado que los terminales GABAérgicos del hipocampo de ratón poseen heteroreceptores mGlu7, cuya activación con AMN082 inhibe la exocitosis de GABA, siendo esta inhibición específica. Por otro lado, Navarro, Burón y Martín-López (2004) demostraron que L-655,708, agonista parcial inverso del receptor GABAA- $\alpha 5$ , que se encuentra localizado en el hipocampo (entre otras estructuras), reducía la conducta agresiva, aunque de manera inespecífica ya que se observaron igualmente efectos ansiogénicos. Además, en otras investigaciones realizadas para evaluar la participación del lugar de reconocimiento para benzodiazepinas del receptor GABA-A en la agresión, se observó que en animales seleccionados por manifestar un mayor grado de agresión se producía una reducción significativa de los lugares de unión para 3H-Ro-15-1788 (flumazenilo) en corteza cerebral, hipotálamo e hipocampo, al compararlos con ratones que exhibían grados más bajos de agresión (Roeling, Kruk, Schuurmans y Veening, 1993). Por tanto, la estimulación GABAérgica del hipocampo participa en la reducción de la conducta agresiva, y teniendo en cuenta que el AMN082 inhibe la liberación de GABA en esta estructura podríamos descartar la posible influencia del sistema GABAérgico en la



actividad antiagresiva observada. En todo caso, los efectos de GABA sobre la agresión podrían depender de la región considerada (Takahashi y Miczek, 2014).

La activación de los receptores mGlu también debe estar relacionada con la regulación de otros neurotransmisores, como aquellos que están asociados tradicionalmente con la conducta agresiva, por ejemplo la serotonina (5-HT). De hecho, Pałucha-Poniewiera, Branski, Lenda y Pilc (2010) han demostrado que el sistema serotoninérgico está involucrado en el mecanismo de acción del AMN082, mientras que el sistema noradrenérgico no parece estar implicado. Además, mostraron que un inhibidor del transportador de 5-HT combinado con AMN082 (ambos usados a dosis bajas y no efectivas) inducía un efecto antidepresivo, mientras que un inhibidor del transportador de noradrenalina no inducía cambios. En este sentido, los tratamientos con antidepresivos que incrementan los niveles extracelulares de NE mediante la inhibición de NET se han estudiado extensamente por sus efectos sobre la conducta agresiva, aunque existe una amplia variabilidad entre los estudios sin observarse resultados claros. Por otro lado, ratones KO para el transportador SERT mostraban una reducción a largo plazo de la conducta agresiva, incrementando la síntesis de 5-HT y la reducción del almacenamiento de 5-HT.

La posible implicación del receptor mGlu7 en la modulación de la conducta agresiva entre machos ha sido confirmada recientemente. Así, Masugi-Tokita et al., (2015) encontraron una marcada reducción de la agresión entre machos en animales KO para el receptor mGlu7, utilizando el paradigma de residente-intruso. Además, estos animales presentaban alteraciones en otras conductas sociales, incluida la conducta sexual hacia machos intrusos. Por otro lado, realizaron una prueba de capacidad olfativa (ya que el olfato es crítico para las conductas sociales en roedores) y observaron que los ratones KO mGlu7 no mostraban interés hacia el olor de la orina de machos. Descubrieron que existía una importante reducción de actividad neuronal (mediante el marcador c-Fos) en el lecho de la estría terminal (BNST). Asimismo, reprodujeron al completo el fenotipo de estos ratones mediante la administración intra-BNST del antagonista no competitivo del receptor mGlu7 MPMPIP. Por tanto, concluyeron que el receptor mGlu7 debe actuar como un potenciador de la actividad neuronal en el BNST y que es muy importante para la agresión entre machos.

Tras el estudio del receptor mGlu7 sobre la conducta agonística pasamos a analizar la posible implicación del receptor mGlu8, utilizando en primer lugar un agonista selectivo del receptor, (S)-3,4-DCEG (experimento 3). Los resultados mostraron que ninguna de las dosis utilizadas produjo efecto alguno.

Los estudios farmacológicos de este grupo de receptores (y en general del grupo III) son limitados porque se carece casi por completo de herramientas farmacológicas biodisponibles y selectivas. No obstante, los estudios conductuales de los receptores del grupo III se han basado comúnmente en la administración central de compuestos o en la observación de la conducta de los animales *KO* (Mercier y Lodge, 2014). Curiosamente, los compuestos que actuaban sobre otros mGluRs y tuvieron efectos ansiolíticos (Pitsikas, 2014) también fueron efectivos para inhibir la conducta agresiva (como por ejemplo AMN082 o LY354740). Por el contrario, el ligando (S)-3,4-DCPG, que actúa sobre el receptor mGlu8, no ejercen ningún efecto sobre la conducta agresiva, así como tampoco sobre la ansiedad (Stachowicz, Kłak, Pilc y Chojnacka-Wojcik, 2005). No obstante, la relación de los receptores mGlu8 con la ansiedad está ampliamente documentada (Fendt et al., 2013; Mercier y Lodge, 2014).

Por otro lado, Summa et al. (2013) comprobaron que el agonista del grupo III (L)-AP4, pero no el agonista selectivo de mGluR8 (S)-3,4-DCPG, mimetizaba los efectos de AMN082, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que el agonista (S)-3,4-DCPG no produjo ningún efecto sobre la conducta agresiva, mientras que AMN082 sí. Habría que comprobar, no obstante, qué efecto provoca el compuesto (L)-AP4 sobre la agresión. Por otra parte, se podría especular que el agonista del receptor mGlu8 actúa como agonista inverso del receptor mGlu7 (Kammermeier, 2015), al tiempo que ejerce de agonista de su correspondiente receptor, de modo que cualquier indicio de actividad antiagresiva quedaría anulado. Por último, añadir que los receptores mGlu8 situados en PAG modulan a la inversa la liberación de glutamato y GABA. De manera particular, facilitan la liberación de glutamato mientras que inhiben la liberación de GABA (Marabese et al., 2005).

De todas formas, se ha demostrado recientemente que bajas concentraciones micromolares de (S)-3,4-DCPG activa también los receptores mGlu2, por lo que no parece ser un compuesto tan selectivo como se consideraba originariamente (Mercier et al., 2013).

Finalmente, para completar el estudio del receptor mGlu8 decidimos evaluar un compuesto con acción doble, esto es, un antagonista mixto del receptor AMPA y agonista del receptor mGlu8, (RS)-3,4-DCPG (experimento 4). Como vimos en el apartado 4 del bloque teórico, los receptores AMPA están involucrados en la regulación de la conducta agresiva; en concreto, el antagonismo de este receptor da lugar a una inhibición de la agresión. Se ha observado que los receptores mGlu7 y mGlu8 ejercen papeles opuestos (Marabese et al., 2007; Palucha y Pilc, 2007), lo que podría dar sentido a nuestros resultados ya que, asumiendo que la

activación del receptor mGlu7 inhibe la conducta agresiva, la posible acción proagresiva que debería tener lugar a través de la activación del receptor mGlu8 quedaría anulada mediante el antagonismo del receptor AMPA, no observándose por tanto ninguna acción sobre la agresión. De todas formas, en el experimento anterior tampoco se apreció una acción proagresiva. Esta falta de efectividad del receptor mGlu8, en comparación con el receptor mGlu7, se ha observado también en otras investigaciones (Broadstock, Austin, Betts, y Duty, 2012).

Tras analizar la implicación de los receptores metabotrópicos del grupo III sobre la conducta agresiva, el siguiente paso fue comprobar si los receptores del grupo II estaban involucrados en su regulación (experimento 5). Como es bien sabido, la activación de los receptores presinápticos mGlu2 con moduladores alostéricos negativos de los receptores mGlu2/3 regula la liberación de glutamato, dando como resultado una retroalimentación que previene la excesiva liberación de glutamato (Anwill, 1999; Lundstrom, Bissantz y Beck, 2011; Scanziani, Salin, Vogt, Malenka y Nicoll, 1997; Celanire et al., 2015). Los receptores presinápticos mGlu2/3 también modulan la liberación de otros neurotransmisores (Cartmell y Schoepp, 2000), y los receptores postsinápticos pueden regular la excitabilidad neuronal a través de la modulación de las funciones de los canales iónicos (Anwill, 1999).

Los agonistas ortostéricos de los receptores mGlu2/3, LY354740 y LY379268, han sido ampliamente estudiados. En un experimento preliminar se constató la posible implicación de este grupo de receptores (Navarro et al., 2009), por lo que se intentamos confirmar esta implicación usando otro compuesto de características estructurales similares. A diferencia de los resultados obtenidos con LY379268, nuestros resultados mostraron una acción antiagresiva específica con LY354740. La razón de estas diferencias entre ambos compuestos puede estar relacionada con diferencias sutiles de la selectividad del receptor mGlu2 *versus* mGlu3. Estudios *in vitro* funcionales y de unión de ligandos han mostrado que LY354740 tiene de 2 a 6 veces mayor selectividad sobre mGlu2 que sobre mGlu3, mientras que LY379268 posee aproximadamente la misma actividad en ambos tipos de receptores (Cartmell, et al., 1999; Monn et al., 1999). De hecho, está claramente demostrado que estos dos ligandos, a pesar de estar muy relacionados estructuralmente, tienen propiedades farmacológicas diferentes (Menezes et al., 2013). Un mecanismo a través del cual esta clase de compuestos puede actuar es a través de la modulación negativa de la señalización dependiente del receptor serotoninérgico 2A (5-HT<sub>2A</sub>R). Así, 5-HT<sub>2A</sub>R y mGlu2 forman complejos heteroméricos, donde la activación de mGlu2 atenúa la señalización mediante 5-HT<sub>2A</sub>R. De hecho, se ha demostrado que LY354740 tiene la capacidad de disminuir la expresión de c-Fos inducida por DOI (agonista del receptor 5-

HT) en la corteza prelímbica (PrL) e infralímbica (IL). Además, se ha constatado la actividad antiagresiva de otro agonista del receptor mGlu2/3, el ligando MGS0028, siendo probable que 5-HT<sub>2A</sub>R esté involucrado en estos efectos antiagresivos observados (Ago et al., 2012).

Por otro lado, la activación de los receptores del grupo II disminuye el aumento excesivo de dopamina y glutamato (Kim et al., 2005). Así, los receptores mGlu2/3 controlan la liberación de glutamato (Glu) y de dopamina (DA) en estructuras mesocorticolímbicas y se reduce la liberación de Glu desde los terminales presinápticos actuando como autoreceptores. En cuanto a la liberación de DA, la activación del receptor mGlu2 ejerce efectos paradójicos. Esta relación entre Glu y DA es compleja, ya que las neuronas DA del mesencéfalo se activan directamente por Glu y se inhiben indirectamente por los efectos del Glu sobre las neuronas GABAérgicas (Lin, Lane y Tsai, 2012). De hecho, los compuestos LY354740 y LY379268 actúan como agonistas y antagonistas dopaminérgicos, respectivamente, lo que sugiere que estos ligandos poseen propiedades de agonistas parciales (Seeman, Caruso y Lasaga, 2008).

Asimismo, interacciones con el sistema GABAérgico deben contribuir a los efectos antiagresivos de los agonistas mGlu2/3, ya que este grupo de receptores se encuentran localizados principalmente en estructuras ricas en receptores GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 2, y numerosos estudios han implicado al receptor de GABA-A en la modulación de la conducta agresiva (Martín-Lopez y Navarro, 2009).

Por otra parte, en un estudio se ha puesto de manifiesto que LY354740 disminuía el incremento de los niveles de noradrenalina (NE) y dopamina (DA) relacionados con el estrés en la corteza prefrontal (PFC) de rata, lo que sugiere que sus efectos deben ser debidos, al menos en parte, al bloqueo del aumento de catecolaminas en las estructuras del cerebro relacionadas con el estrés (Palucha y Pilc, 2007). De hecho, en la conducta agresiva se observa un aumento de dopamina así como de noradrenalina (véase apartado 3. “Neurobiología de la agresión”). Igualmente, los receptores mGlu2/3 modulan negativamente el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, que se conoce que está sobreactivado en trastornos relacionados con el estrés (Chaki et al., 2012).

En cuanto a la regulación de mGlu2/3 sobre otros canales iónicos, existen estudios preclínicos que sugieren que los agonistas de los receptores mGlu2/3 disminuyen los efectos conductuales de los antagonistas NMDA (Chaki, 2010; Fell et al., 2012). El mejor ejemplo de esta aproximación farmacológica, que se ha probado en modelos clínicos y preclínicos, implica al ligando LY354740. En roedores, los agonistas de los receptores mGlu2/3 normalizan el

incremento excesivo de glutamato tras el tratamiento con antagonistas NMDA (Moghaddam, 2004). Y, teniendo en cuenta que los antagonistas NMDA (como PCP) provocan un aumento de la conducta agresiva, cabe esperar que el tratamiento con LY354740 disminuya esta conducta.

Por último, los antagonistas de los receptores mGlu2/3 estimulan el receptor AMPA e incrementan la vía de señalización mTOR. El bloqueo de los receptores mGlu2/3 aumenta la transmisión de los receptores AMPA, presumiblemente a través del incremento de la liberación de glutamato por el bloqueo de los autoreceptores presinápticos. La estimulación del receptor AMPA debe incrementar la señalización mTOR a través de un aumento de la señalización de los BDNF, lo que resulta en un incremento de la densidad de las espinas y de la formación sináptica. Además, el bloqueo de los receptores mGlu2/3, a través de la estimulación del receptor AMPA, incrementa la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens medial y la transmisión serotoninérgica en la corteza prefrontal medial (PFCm) (Chaki et al., 2012). Por tanto, tomando esta explicación a la inversa, tendremos que la activación de mGlu2/3 disminuye la transmisión de los receptores AMPA (e inhibirá su cascada de transducción de señales) lo que dará lugar a una disminución de la conducta agresiva, también a través de la disminución de DA y 5-HT. Es más, Araki et al., (2014) mostraron que el antagonista del receptor AMPA NBQX, en ratones criados en aislamiento, disminuía el incremento de DA y 5-HT en la corteza prefrontal, actuando del mismo modo que los agonistas del receptor mGlu2/3 (Araki et al., 2013). Asimismo, NBQX inhibía la conducta agresiva (Araki et al., 2014).

En conjunto, los resultados obtenidos en la serie de experimentos realizados con diferentes ligandos de receptores mGlu indicaban una mayor y más clara implicación del receptor mGluI en la modulación de la conducta agonística. Por tanto, decidimos ampliar el estudio de este receptor de manera que, en primer lugar, además de replicar los resultados obtenidos en nuestro primer experimento, intentamos comprobar si el efecto antiagresivo observado tras la administración aguda de JNJI6259685 se mantenía tras un tratamiento subcrónico. En segundo lugar, queríamos evidenciar qué estructuras participarían en esta modulación de la agresión, así como el efecto que produciría el fármaco, utilizando para ello el análisis de la expresión de c-Fos, comparándolo a su vez con animales que permanecieron agrupados. En resumen, podemos destacar los siguientes resultados: 1- JNJI6259685 posee efectivamente una alta actividad antiagresiva, y lo más importante, este efecto antiagresivo no se ve alterado a lo largo del tiempo, es decir, no se desarrolla tolerancia a la acción antiagresiva del fármaco. 2- En cuanto al estudio de c-Fos, los animales que realizaron la prueba conductual muestran un aumento de activación en

áreas relacionadas con la modulación de la agresión, y además JNJI6259685 disminuye esta activación en algunas regiones.

En relación con la acción antiagresiva observada con el fármaco, es de destacar la ausencia de tolerancia y la consistencia de resultados en todos los parámetros estudiados con la dosis intermedia (0.5 mg/kg). Todo esto convierte a JNJI6259685 en un potencial compuesto para el tratamiento específico de la agresión, y además señala al receptor mGluI como una futura diana para el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas.

Con respecto a los resultados de c-Fos, cuando se han comparado los animales controles vehículos de ambas condiciones experimentales (aislados/conducta vs agrupados/sin prueba conductual), se ha puesto de manifiesto que se producía un aumento de activación en la corteza prefrontal medial (PFCm), en concreto en las regiones infralímbica (IL) y cingulada (Cg), en los animales aislados con experiencia agonística, siendo esta activación inhibida por JNJI6259685 en Cg. La corteza prefrontal (PFC) está implicada en el control inhibitorio de conductas emocionales, incluidas la agresión y la violencia (Davidson, Putnam y Larson, 2000; Nelson y Trainor, 2007). Envía proyecciones glutamatérgicas a numerosas estructuras del cerebro que están relacionadas con la agresión, como el hipotálamo, amígdala y PAG (Gabbott, Warner, Jays, Salway y Busby, 2005; Hoover y Vertes, 2011; Vertes, 2004). Los encuentros agresivos inducen la expresión c-Fos en la PFCm en rata y ratón (Hálasz, Tóth, Kalló, Liposits y Haller, 2006; Haller et al., 2006; Wall, Fischer y Bland, 2012; Wang et al., 2011). Así, la PFC parece que ejerce un papel inhibitorio en la conducta agresiva, con el fin de mantenerlo en un nivel típico de especie (adaptativo) y prevenirlo de alcanzar un nivel desadaptativo.

Además, el encuentro agonístico presenta una secuencia de conductas que sigue un patrón temporal donde el animal muestra por un cierto periodo de tiempo los episodios agresivos seguidos por un periodo de descanso en el que el animal exhibe conductas exploratorias no agresivas (Miczek, Weerts, Tornatzky, DeBold y Vatne, 1992). Es dentro de este patrón donde la PFCm suprime la probabilidad de la aparición de las conductas agresivas, pero no afecta a la terminación de los episodios agresivos (Takahashi, et al, 2015).

Por otro lado, las proyecciones de las regiones ventrales de PFCm, prelímbica (PrL) e infralímbica (IL), se distribuyen de manera muy diferenciadas a través del cerebro. Así, entre los principales sitios de proyección de IL se encuentran el septum lateral (LS), la amígdala medial (MeA) o los núcleos hipotalámicos. Este patrón de proyecciones es consistente con el papel de IL en el control de la actividad visceral/autonómica, mientras que PL proyecta hacia otras regiones

que cumplen funciones límbicas-cognitivas (Vertes, 2004). Curiosamente, nuestros resultados ponen de manifiesto una activación significativa en IL, así como sobre estructuras en las que proyecta, en tanto que no se produce ningún efecto sobre PrL ni sus proyecciones.

Finalmente, se ha demostrado que la expresión de los genes de expresión inmediata en PFC es alterada en función de dos tipos de estresores (agudo *versus* crónico), observándose una sobrerregulación en respuesta al estrés agudo, mientras que se produce un decremento de esta expresión tras la exposición a un estrés crónico (Levine et al., 2007). Por tanto, se puede considerar la exposición al encuentro agonístico como un estrés agudo.

La siguiente estructura analizada fue el septum lateral (LS). Se produjo un aumento significativo de activación en esta estructura (tanto en LSd como en LSv), y JNJI6259685 disminuyó esta activación en SLd. Se ha hipotetizado que la (sub-)región LSv participa en un circuito neuronal que media el “arousal” en respuesta a señales sociales relevantes (Kollack-Walker y Newman, 1995). Es más, se considera que debe estar involucrada de forma más general en la mediación de cambios naturales en la agresión, como el aumento de “arousal” a menudo observado después de que los individuos ganen una interacción agonística (Davis y Marler, 2004). Incluso, se piensa que debe jugar un papel integrativo y/o modulador de una variedad de conductas (Hasen y Gammie, 2005). En este sentido, nuestros resultados están en consonancia con estas consideraciones, y sugieren que el subnúcleo LSd está implicado de una manera más específica en la conducta agresiva.

En cuanto a los núcleos hipotalámicos, se observó una fuerte activación en los tres núcleos estudiados (PVN, AH, VMH), siendo suprimida esta activación en el AH tras la administración de JNJI6259685. El AH recibe aferencias desde el LS y la amígdala. Muchas estructuras que reciben proyecciones desde AH también envían proyecciones hacia AH (véase capítulo 3, apartado 3.2.I. “Hipotálamo”). Estas vías parecen ser recíprocas, sugiriendo que el AH es el centro de una red de conexiones que implica numerosas partes del cerebro, entre las que se encuentra: LS, amígdala, núcleos hipotalámicos y PAG (Davis y Maller, 2004; Delville et al., 2000). De hecho, Haller et al. (2006) observaron una fuerte activación en esta región tanto en los encuentros agonísticos como en las interacciones sociales (utilizando un modelo de contacto sensorial). Kollack-Walker y Newman (1995) sugirieron que la activación neuronal de estas estructuras no estaba necesariamente asociada con la conducta de respuestas agresivas o subordinadas. Además, observaron que estas regiones se activaban igualmente tras interacciones sexuales, por lo que sugirieron que el aumento de actividad neuronal debía estar relacionado con

el aumento de “arousal” más que con la agresión. Por otro lado, Davis y Marler (2004) no encontraron un efecto significativo en el AH (aunque estaba cerca de la significación estadística), y sólo observaron una correlación positiva con la categoría de “oler” en las hembras diestras. Así, justifican este resultado basándose en la hipótesis de Deville et al. (2000), quienes proponen que el AH debe ser el centro del circuito neuronal de la agresión en los hamsters, y que es particularmente importante para la conducta de “flank marking”, una señal social olfativa característica de esta especie. De hecho, estos autores no encontraron ningún cambio en la actividad de esta región después del encuentro agonístico en comparación con los controles, presumiblemente porque los animales controles eran expuestos a unos bloques de madera que habían sido tratados con olores de congéneres. Quizás lo que se refleja es la implicación de AH en el procesamiento de la información olfativa. Y esto da sentido a nuestros resultados ya que los receptores mGluI se encuentran ampliamente expresados en el bulbo olfatorio, y la activación c-Fos observada tras el encuentro agonístico en AH es suprimida tras la aplicación del antagonista mGluI.

La siguiente estructura a analizar fue la amígdala, en concreto BLA y MeA. Cuando se compararon los grupos vehículos de las diferentes condiciones experimentales, no se observó ningún tipo de cambio en BLA, mientras que MeA fue fuertemente activada tras el encuentro agonístico, en los animales que realizan la prueba conductual. MeA juega un papel central en la generación de respuestas emocionales innatas hacia señales químicas (LeDoux, 2012). La información olfativa es enviada directamente desde el bulbo olfatorio accesorio hacia MeA, y de aquí es transmitida hacia las regiones hipotalámicas que controlan las conductas defensivas y reproductivas. Concretamente, en el nivel posterior existe una clara segregación funcional entre el núcleo dorsal y el núcleo ventral, estando el primero involucrado en las conductas reproductivas y el último en las conductas defensivas (Choi et al., 2005; Meredith y Westberry, 2004). Es precisamente el núcleo posteroventral el estudiado en nuestra investigación. Keshavarzi, Sullivan, Ianno y Sah (2014) han demostrado que esta región contiene poblaciones heterogéneas de neuronas GABAérgicas y no GABAérgicas. Así, han mostrado que aproximadamente el 70% de las neuronas en la MePV no son GABAérgicas, siendo probablemente células glutamatérgicas y concluyen que aunque no es una estructura cortical, contiene neuronas similares que pueden ser divididas en dos poblaciones celulares (tipo I y tipo II), las cuales proyectan hacia el hipotálamo. Asimismo, el núcleo hipotalámico ha sido implicado en las conductas sociales de reproducción y de defensa. Estudios recientes muestran que las neuronas implicadas en estas diferentes conductas se pueden encontrar en la misma región dentro del VMH (Lin et al., 2011). Es interesante saber



que aquellas que están involucradas en la lucha se encuentran suprimidas durante el apareamiento, lo que sugiere una activación diferenciada de las vías aferentes durante estas conductas. Hay que hacer notar que esta última región mencionada también se encuentra activada en nuestro estudio.

En general, y teniendo en cuenta que nuestra investigación se basa en un modelo de agresión impulsiva/afectiva, nuestros resultados comentados previamente, vienen a ser respaldados con un estudio reciente (Tugdoli et al., 2015) en el que se analizaron numerosas estructuras cerebrales en un modelo animal de agresión predatoria, de manera que las diferentes regiones son activadas dependiendo del tipo de agresión manifestada. En concreto, estos autores encontraron que se producía un aumento de activación en BLA y núcleos hipotalámicos laterales (LH), mientras que no observaron activación en otras regiones cerebrales igualmente relacionadas con la agresión, como son, PFCm, LS o hipotálamo mediobasal. Así, en contraste con LH, el hipotálamo medio basal es excitado por agresión afectiva en interacciones de residente-intruso. Además, PVN (región involucrada en respuestas de estrés) no fue activado en el modelo predatorio, lo que concuerda con la baja emocionalidad de este tipo de agresión. Por otro lado, el HAA recibe *inputs* desde la amígdala, área que juega un papel en el control de la agresión (aunque es específica de los distintos subnúcleos). Sus resultados pusieron de manifiesto una fuerte activación de la CeA y BLA en las ratas asesinas, mientras que no se observó activación en la MeA (por el contrario, sí se constató activación en los animales controles). En cuanto a PAG, HAA manda proyecciones hacia PAG, que controla las conductas y funciones autonómicas durante los conflictos agresivos (Siegel et al., 1999). Esta región del cerebro está organizada en columnas, las cuales están implicadas de manera diferencial en el control de la conducta. En gatos, la estimulación de las columnas ventrales (PAG lateral y PAG ventrolateral) induce ataques predatorios, mientras que las columnas dorsales (PAG dorsomedial y PAG dorsolateral) están implicadas en respuestas defensivas (Bandelr y Shipley, 1994; Behbehani, 1995; Brutus, Shaikh y Siegel, 1985; Haller et al., 2016; Shaikh, et al., 1986, 1993). En este sentido nuestros resultados pusieron de manifiesto que se producía una fuerte activación en LPAG y JNJI6259685 disminuía de manera significativa tanto la activación en LPAG como en DLPAG, lo que confirma en cualquier caso la actividad antiagresiva del fármaco.

Por último, y en referencia a VTA, se conoce su implicación en la conducta agresiva (Fuxjager et al, 2010). Además, es bien sabido que recibe una amplia inervación glutamatérgica (Takahashi et al., 2014). Algunas neuronas del VTA establecen sinapsis glutamatérgicas en neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas. Estos estudios indican que las neuronas VTA VGluT2 se ocupan de la neurotransmisión glutamatérgica local, por lo que cabe la posibilidad

que las neuronas glutamatérgicas jueguen un papel en la regulación de la actividad neuronal VTA (Morales y Root, 2014). No obstante, no observamos ningún cambio en esta región.

---

## 9. CONCLUSIONES

---

1. El tratamiento agudo con JNJI6259685, un antagonista selectivo de los receptores mGluI, produce un potente efecto antiagresivo (reducción de las conductas de amenaza y ataque), con un amplio rango de dosis (0.125-8 mg/kg), y sin afectación de la conducta motora. Estos resultados apuntan a una clara implicación del receptor mGluI en la modulación de la conducta agresiva.
2. El tratamiento con AMN082, un ligando selectivo de los receptores mGlu7, reduce la conducta agresiva tan solo con la dosis de 4 mg/kg, sin una disminución de la motilidad. Las dosis inferiores (0.5, 1 y 2 mg/kg) no provocaron ninguna modificación conductual, mientras que la dosis más alta (8 mg/kg) tuvo que ser descartada por los severos efectos motores producidos. Estos resultados sugieren que el receptor mGlu7 podría estar involucrado en la regulación de la agresión (en un rango muy limitado de dosis), siendo necesarios estudios adicionales para confirmar esta posible implicación.
3. El tratamiento con diferentes ligandos que actúan sobre el receptor mGlu8, (S)-3,4-DCPG (2.5-10 mg/kg) y (RS)-3,4-DCPG (5-20 mg/kg), no afecta a la conducta agresiva, ni al resto de conductas analizadas. Por lo tanto, con las dosis empleadas en este estudio, no hemos podido constatar ninguna relación entre este subtipo de receptor y la conducta agresiva. Igualmente, la administración del (RS)-3,4-DCPG, antagonista de los receptores AMPA y agonista de los receptores mGlu8, tampoco modificó el repertorio conductual de los ratones.
4. El tratamiento con LY354740, un ligando selectivo de los receptores mGlu2/3 redujo la conducta agresiva (con las dosis de 12 y 16 mg/kg), sugiriendo una posible implicación de estos receptores en la regulación de la agresión, aunque también con un margen estrecho de dosis.
5. Tras el tratamiento subcrónico con JNJI6259685 (0.5 y 1 mg/kg, 7 días), no se desarrolla tolerancia al efecto antiagresivo observado tras la administración aguda del fármaco, lo que refuerza la implicación del receptor mGluI en la regulación de la agresión.
6. La administración aguda de JNJI6259685 reduce la activación c-Fos observada en aquellas estructuras relacionadas con la agresión que habían sido activadas tras el encuentro agonístico (corteza cingulada, septum lateral dorsal, hipotálamo anterior y

sustancia gris periacueductal lateral), manteniéndose esta disminución tras el tratamiento subcrónico. Estos datos confirman los resultados obtenidos en el análisis conductual y, por tanto, subrayan el papel receptor mGluI en la modulación de la conducta agresiva.

---

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Adamczyk, A., Mejias, R., Takamiya, K., Yocum, J., Krasnova, I., Calderon, J., Cadet, J. L., Haganir, R., Pletnikov, M. y Wang, T. (2012). GluA3-deficiency in mice is associated with increased social and aggressive behavior and elevated dopamine striatum. *Behavioural Brain Research*, *229(1)*, 265-272.
- Adell, A., Celada, P., Abellan, M. T. y Artigas F. (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Research Reviews*, *39*, 154-180.
- Ago, Y., Araki, R., Yano, K., Kawasaki, T., Chaki, S., Nakazato, A., Onoe, H., Hashimoto, H., Baba, A., Takuma, K. y Matsuda, T. (2012). The selective metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist MGS0028 reverses isolation rearing-induced abnormal behaviors in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, *118(2)*, 295-298.
- Ago, Y., Araki, R., Tanaka, T., Sasaga, A., Nishiyama, S., Takuma, K. y Matsuda, T. (2013). Role of social encounter-induced activation of prefrontal serotonergic systems in the abnormal behaviours of isolation-reared mice. *Neuropsychopharmacology*, *38*, 1535-1547.
- Anggono, V. y Haganir, R. L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, *22(3)*, 461-469.
- Anstrom, K. K., Miczek, K. A y Budygin EA (2009) Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience*, *161*, 3-12.
- Anwil, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews*, *29*, 83-120.
- Araki, R., Ago, Y., Hasebe, S., Nishiyama, S., Tanaka, T., Oka, S., Takuma, K y Matsuda, T. (2014). Involvement of prefrontal AMPA receptors in encounter stimulation-induced hyperactivity in isolation-reared mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *9*, 1-11.
- Audet, M. C., Goulet, S. y Doré, F. Y. (2009). Impaired social motivation and increased aggression in rats subchronically exposed to phencyclidine. *Physiology and Behavior*, *96*, 394-398.
- Azmitia, E. C. y Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *179*, 641-667.
- Bäckström, P., y Hyytiä, P. (2005). Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG. *European Journal of Pharmacology*, *528*, 110-118.
- Bandler, R. y Shipley, M. T. (1994). Columnar organization in the midbrain periaque-ductal gray: modules for emotional expression? *Trends in Neurosciences*, *17*, 379-389.

- Bannai, M., Fish, E. W., Faccidomo, S. y Miczek, K. A. (2007). Anti-aggressive effects of agonists at 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the dorsal raphe nucleus of mice. *Psychopharmacology*, *193*, 295-304.
- Bean, N. J. y Wysocki, C. J. (1989). Vomeronasal organ removal and female mouse aggression: The role of experience. *Physiology & Behavior*, *45*, 875-882.
- Bedrosian, T. A y Nelson, R. J. (2014). Nitric Oxide and Serotonin Interactions in Aggression. *Currents Topics in Behavioral Neuroscience*, *17*, 131-142.
- Behbehani, M. M. (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*, *46*, 575-605.
- Bell, R. y Hepper, P. G. (1987). Catecholamines and aggression in animals. *Behavioral Brain Research*, *23*, 1-21.
- Belozertsseva, I. V. y Bespalov, A. Y. (1999). Effects of NMDA receptor channel blockade on aggression in isolated male mice. *Aggressive Behavior*, *25*, 381-396.
- Bespalov, A. Y., van Gaalen, M. M., Sukhotina, I., A., Wicke, K., Mezler, M., Schoemaker, H. y Gross, G. (2008). Behavioral characterization of the mGlu group II/III receptor antagonist, LY-341495, in animal models of anxiety and depression. *European Journal of Pharmacology*, *592*, 96-102.
- Bird, M. K., Lohmannb, P., West, B., Brown, R. M., Kirchhoffa, J., Raymond, C. R. y Lawrence, A. J. (2014). The mGlu5 receptor regulates extinction of cocaine-driven behaviours. *Drug and Alcohol Dependence*, *137*, 83-89.
- Blanchard, R. J. y Blanchard, D. C. (1977). Aggressive behavior in the rat. *Behavioral Biology*, *21*, 197-224.
- Blanchard, R. J., O'Donnell y Blanchard D. V. (1979). Attack and defensive behaviors in the albino mouse. *Aggressive Behavior*, *5*, 341-352.
- Bleich, S., Römer, K. y Kornhuber, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *18*, S33-S40.
- Bond, A. J., Curran, H. V., Bruce, M. S., O'Sullivan, G. y Shine, P. (1995). Behavioural aggression in panic disorder after 8 weeks' treatment with alprazolam. *Journal of Affective Disorders*, *35*, 117-123.
- Bouwknicht, J. A., Hijzen, T. H., van der Gugten, J., Maes, R. A. A., Hen, R. y Olivier, B. (2001). Absence of 5-HT<sub>1B</sub> receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT<sub>1B</sub> knockout mice. *Biological Psychiatry*, *49*(7), 557-568.
- Bowie, D. (2012). Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, *590*.1, 49-61.



- Bradley, S. R., Uslaner, J. M., Flick, R. B., Lee, A., Groover, K. M. y Hutson, P. H. (2012). The mGluR7 allosteric agonist AMN082 produces antidepressant-like effects by modulating glutamatergic signaling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *101*, 35-40.
- Bradley, S. J. y Challis, J. (2012). G protein-coupled receptor signalling in astrocytes in health and disease: A focus on metabotropic glutamate receptors. *Biochemical Pharmacology*, *84*, 249-259.
- Brain P. F., Benton, D., Childs, G. y Parmigiani, S. (1981). The effect of the type of opponent in test murine aggression. *Behavioural Processes*, *6*, 319-327.
- Brain, P. F., McAllister, K. H. y Walmsey, S. (1989). Drug effects on social behaviour: methods in ethopharmacology. En: Boulton, A.A., Baker, G.B., Greenshaws, A.J. (eds). *Neuromethods*. Humana Press, New Jersey, 687-739.
- Brain, P. F., Kusumorini, N. y Benton, D. (1991). "Anxiety" in laboratory rodents: A brief review of some recent behavioural developments. *Behavioural Processes*, *25*, 70-80.
- Brennan, P. A. y Keverne, E. B. (2004). Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones. *Current Biology*, *14*, R81-R89.
- Bridges, R. J. y Esslinger, C. S. (2005). The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacology and Therapeutics*, *107*, 271-285.
- Broadstock, M., Austin, P. J., Betts, M. J. y Duty, S. (2012). Antiparkinsonian potential of targeting group III metabotropic glutamate receptor subtypes in the rodent substantia nigra pars reticulata. *British Journal of Pharmacology*, *165(4b)*, 1034-1045.
- Brodkin, E. S., Goforth, S. A., Keene, A. H., Fossella, J. A. y Silver, M. (2002). Identification of quantitative trait loci that affect aggressive behavior in mice. *Journal of Neuroscience*, *22*, 1165-1170.
- Brody J. F., DeFeudis P. A. y DeFeudis F.V. (1969). Effects of micro-injections of glutamate into the hypothalamus on attack and flight behaviour in cats. *Nature*, *224*, 13-30.
- Broman, J., Hassel, B., Rinvik, E. y Ottersen, O. P. (2000). Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (O. P. Ottersen and J. Storm-Mathisen, editors), pp. 1-44. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Brutus, M., Shaikh, M. B. y Siegel, A. (1985). Differential control of hypothalamically elicited flight behavior by the midbrain periaqueductal gray in the cat. *Behavioral Brain Research*, *17*, 235-244.

- Byrnes, K. R., Loane, D. J. y Faden, A. I. (2009). Metabotropic Glutamate Receptors as Targets for Multipotential Treatment of Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*, 6(1), 94-107.
- Cartmell, J., Monn, J. A. y Schoepp, D. D. (1999). The Metabotropic Glutamate 2/3 Receptor Agonists LY354740 and LY379268 Selectively Attenuate Phencyclidine versus d-Amphetamine Motor Behaviors in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291, 161-170.
- Cartmell, J. y Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 889-907.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J. C y De Maeyer, E. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 268, 1763-1766.
- Cavas, M., Beltrán, D. y Navarro, J. F. (2005) Behavioural effects of dimethyl sulfoxide (DMSO): changes in sleep architecture in rats. *Toxicology Letters*, 157(3), 221-232.
- Cavas, M., Scesa, G. y Navarro, J. F. (2013a). Effects of MPEP, a selective metabotropic glutamate mGlu5 ligand, on sleep and wakefulness in the rat. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 40, 18-25.
- Cavas, M., Scesa, G. y Navarro, J. F. (2013b). Positive allosteric modulation of mGlu7 receptors by AMN082 affects sleep and wakefulness in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(4), 756-763.
- Celanire, S. I., Sebhat, I., Wichmann, J., Mayer, S., Schann, S. y Gatti, S. (2015). Novel metabotropic glutamate receptor 2/3 antagonists and their therapeutic applications: a patent review (2005 - present). *Expert Opinion on Therapeutics Patent*, 25(1), 69-90.
- Chaki, S. (2010). Group II metabotropic glutamate receptor agonists as a potential drug for schizophrenia. *European Journal of Pharmacology*, 639, 59-66.
- Chaki, S., Ago, Y., Palucha-Paniewiera, A., Matrisciano, F. y Pilc, A. (2012). mGlu2/3 and mGlu5 receptors: Potential target for a novel antidepressant. *Neuropharmacology*, 66, 40-52.
- Chamero, P., Marton, T. F., Logan, D. W., Flanagan, K., Cruz, J. R., Saghatelian, A., Cravatt, B. F. y Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 450, 899-902.
- Chamero, P., Katsoulidou, V., Hendrix, P., Bufe, B., Roberts, R., Matsunami, H., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Zufall, F. y Leinders-Zufall, T. (2011). G protein Gao is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. *Proceedings of the National Academia of Science*, 108, 12898-12903.

- Charney, D. S., Heninger, G. R. y Redmond, D. E. (1983). Yohimbine induced anxiety and increased noradrenergic function in humans-effects of diazepam and clonidine. *Life Sciences*, *33*, 19-29.
- Chen, T. J. H., Blum, K., Mathews, D., Fisher, L., Schnautz, N., Braverman, E. R., Schoolfield, J., Downs, B. W. y Comings, D. E. (2005). Are dopaminergic genes involved in a predisposition to pathological aggression? Hypothesizing the importance of “super normal controls” in psychiatric-genetic research of complex behavioral disorders. *Medical Hypotheses*, *65*, 703-707.
- Cherek, D. R., Lane, S. D., Pietras, C. J., Sharon, J. y Steinberg, J. L. (2002). Acute effects of baclofen, a GABA<sub>B</sub> agonist, on laboratory measures of aggressive and escape responses of adult male parolees with and without a history of conduct disorder. *Psychopharmacology*, *164*, 160–167.
- Chiavegatto, S. I. y Nelson, R. J. (2003). Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Hormones & Behavior*, *44*(3), 233-41.
- Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W. y Anderson, D. J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, *46*, 647-660.
- Citrome, L. y Volavka, J. (1997a). Psychopharmacology of violence:part I: assessment and acute treatment. *Psychiatric Annals*, *27*, 691-695.
- Citrome, L. y Volavka, J. (1997b). Psychopharmacology of violence: part II: beyond the acute episode. *Psychiatric Annals*, *10*, 696-703.
- Clancy, A. N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R. A y Noble, E. P. (1984). Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *Journal of Neuroscience*, *4*, 2222–2229.
- Comai, S., Tau, M y Gobbi, G. (2012). The Psychopharmacology of Aggressive Behavior: A Translational Approach Part I: Neurobiology. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *32*(1), 83-94.
- Conn P. J., Lindsley C. W. y Jones C. K. (2009). Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia. *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*(1), 25-31.
- Couppis, M. H. y Kennedy, C. H. (2008). The rewarding effect of aggression is reduced by nucleus accumbens dopamine receptor antagonism in mice. *Psychopharmacology*, *197*, 449-456.
- Cryan, J. F. y Dev, K. K. (2008). The glutamatergic system as a potential therapeutic target for the treatment of anxiety disorders. En: R.J. Blanchard, D.C. Blanchard, G. Griebel and D. Nutt (eds.). *Handbook of Anxiety and Fear 17*, pp. 269-301.

- D'Antoni, S. I., Berretta, A., Bonaccorso, C. M., Bruno, V., Aronica, E., Nicoletti, F. y Catania, M. V. (2008). Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochemical Research*, *33*(12), 2436-2443.
- Dahlström, A. y Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, *20*, 398-399.
- Davidson, R. J., Putnam, K. M. y Larson, C. L. (2000). Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence. *Science*, *28*, 289(5479), 591-594.
- Davis, E. S. y Marler, C. A. (2004). c-Fos changes following an aggressive encounter in female California mice: a synthesis of behaviour, hormone changes and neural activity. *Neuroscience*, *127*, 611-624.
- de Almeida, R. M. M. y Lucion, A. (1994). Effects of intracerebroventricular administration of 5-HT receptor agonists on the maternal aggression of rats. *European Journal of Neuroscience*, *264*, 445-448.
- de Almeida, R. M. M. y Miczek, K. A. (2002). Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement ("frustration") in mice: inhibition by anpirtoline - a 5-HT1B receptor agonist. *Neuropsychopharmacology*, *27*, 171-181.
- de Almeida, R. M., Nikulina, E. M., Faccidomo, S., Fish, E. W. y Miczek, K. A. (2001). Zolmitriptan--a 5-HT1B/D agonist, alcohol, and aggression in mice. *Psychopharmacology*, *157*(2), 131-141.
- de Almeida, R. M. M., Rowlett, J. K., Cook, J. M., Yin, W. y Miczek, K. A. (2004). GABAA/alpha1 receptor agonists and antagonists: effects on species-typical and heightened aggressive behavior after alcohol self-administration in mice. *Psychopharmacology*, *172*, 255-263.
- de Almeida, R. M. M., Ferrari, P. F., Parmigiani, S. y Miczek, K. A. (2005). Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology*, *526*, 51-64.
- de Boer, S. F., Lesourd, M., Mocaer, E. y Koolhaas, J. M. (1999). Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via (5-hydroxytryptamine)1A receptors: a comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *288*, 1125-1133.
- de Boer, S. F., Lesourd, M., Mocaer, E. y Koolhaas, J. M. (2000). Somatodendritic 5-HT(1A) autoreceptors mediate the anti-aggressive actions of 5-HT(1A) receptor agonists in rats: an ethopharmacological study with S-15535, alnespirone, and WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*, *23*, 20-33.
- de Boer, S. F. y Koolhaas, J. M. (2005). 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *European Journal of Pharmacology*, *526*, 125-139.

- de Boer, S. F., Olivier, B., Veening, J. y Koolhaas, J. M. (2015). The neurobiology of offensive aggression: Revealing a modular view. *Physiology and Behavior* 146, 111–127.
- de Bruin, J. P., van Oyen, H. G y Van de Poll, N. (1983). Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. *Behavioral Brain Research*, 10, 209-232.
- De Groot, L., Olivier, B. y Westenberg, H. G. (2003). Role of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the regulation of extracellular serotonin and dopamine in the dorsal striatum of mice. *European Journal of Pharmacology*, 476, 71-77.
- Dekeyne, A., Brocco, M., Adhumeau, A., Gobert, A. y Millan, M. J. (2000). The selective serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> receptor ligand, SI5535, suppresses dialysate levels of 5-HT in the dorsal hippocampus of freely-moving rats and displays anxiolytic properties in the social interaction and Vogel paradigms: a comparison to other anxiolytic agents. *Psychopharmacology*, 152, 55-66.
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C. J., Ogawa, S., Zufall, F. y Mombaerts, P. (2002). Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature*, 419, 70-74.
- Delville, Y., De Vries, G. J. y Ferris, C. F. (2000). Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in Golden hamsters. *Brain, Behavior and Evolution*, 55, 53-76.
- Desjardins, C., Maruniak, J. A. y Bronson, F. H. (1973). Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. *Science*, 182, 939-941.
- Diano S., Naftolin F. y Horvath T. L. (1997). Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. *Endocrinology*, 138, 778-789.
- Dietch, J. T. y Jennings, R. K. (1988). Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. *Journal of Clinical Psychiatry*, 49, 184-188.
- Dingledine R., Borges, K., Bowie, D. y Trainor, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51, 7-61.
- Divito, C. B., y Underhill, S. M. (2014). Excitatory amino acid transporters: Roles in glutamatergic neurotransmission. *Neurochemistry International*, 73, 172-180.
- Dolenc, B., Dernovšek, M. Z., Sprah, L., Tavcar, R., Perugi, G. y Akiskal, H. S. (2015). Relationship between affective temperaments and aggression in euthymic patients with bipolar mood disorder and major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 174, 13-18.

Donaldson, Z. R. y Young, L. J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*, *322*, 900-904.

Donát, P., Krsiak, M. y Sulcova, A. (1994). The involvement of pheromones in offensive and defensive agonistic behaviour in laboratory mice. En: *Ethology and Psychopharmacology*, pp. 205-224 (S. J. Cooper y C. A. Hendrie, editors). Chichester: Wiley and Sons.

Dorfman, H. M., Meyer-Lindenberg, A. y Buckholz, J. W. (2014). Neurobiological Mechanisms for Impulsive-Aggression: The Role of MAOA. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, *17*, 297–313.

Dravolina, O., Zakharova E., Shekunova E., Zvartau, E., Danysz, W y Bepalov, A. (2007). mGluI receptor blockade attenuates cue- and nicotine-induced reinstatement of extinguished nicotine self-administration behavior in rats. *Neuropharmacology*, *52*(2), 263-269.

Ducic, I., Puia, G., Vicini, S. y Costa, E. (1993). Triazolam is more efficacious than diazepam in a broad spectrum of recombinant GABAA receptors. *European Journal of Pharmacology*, *244*, 29-35.

Dulac, C. y Torello, A. T. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*, 551-562.

Duncan, G. E., Moy, S.S., Perez, A., Eddy, D.M., Zinzow, W. M., Lieberman, J. A., Snouwaert, J. N. y Koller, B. H. (2004). Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behavioural Brain Research*, *153*, 507-519.

Duvoisin, R.M., Zhang, C., Pfankuch, T.F., O'Connor, H., Gayet-Primo, J., Quraishi, S., y Raber, J. (2005). Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. *European Journal of Neuroscience*, *22*, 425-436.

El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G. M., Descarries, L. y Trudeau, L. E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*, 204-216.

Eulenburg, V. y Gomez, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Research Reviews*, *63*, 103–112.

Faccidomo, S., Bannai, M. y Miczek, K. A. (2008). Escalated aggression after alcohol drinking in male mice: dorsal raphe and prefrontal cortex serotonin and 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology*, *33*, 2888-2899.

Fell, M. J., McKinzie, D. L., Monn, J. A. y Svensson, K. A. (2012). Group II metabotropic glutamate receptor agonists and positive allosteric modulators as novel treatments for schizophrenia. *Neuropharmacology*, *62*, 1473-1483.

- Fendt, M., Imobersteg, S., Peterlik, D., Chaperon, F., Mattes, C., Wittmann, C., Olpe, H. R., Mosbacher, J., Vranesic, I., van der Putten, H., McAllister, K. H., Flor, P. J. y Gee, C. E. (2013). Differential roles of mGlu(7) and mGlu(8) in amygdala-dependent behavior and physiology. *Neuropharmacology*, *72*, 215-23.
- Ferraguti, F. y Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell and Tissue Research*, *236*, 486-304.
- Ferraguti, F., Crepaldi, L. y Nicoletti, F. (2008). Metabotropic Glutamate I Receptor: Current Concepts and Perspectives. *Pharmacological Reviews*, *60*, 536-581.
- Ferrari, P. F., van Erp, A. M. M., Tornatzky, W. y Miczek, K. A. (2003). Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *European Journal of Neuroscience*, *17*, 371-378.
- Ferrari, P. F., Palanza, P., Parmigiani, S., de Almeida, R. M. y Miczek, K. A. (2005). Serotonin and aggressive behavior in rodents and nonhuman primates: predispositions and plasticity. *European Journal of Pharmacology*, *526(1-3)*, 259-273.
- File, S. E., Zharkovsky, A. y Gulati, K. (1991). Effects of baclofen and nitrendipine on ethanol withdrawal responses in the rat. *Neuropharmacology*, *30*, 183-190.
- Fish, E. W., Faccidomo, S., De Bold, J. F. y Miczek, K. A. (2001). Alcohol, allopregnanolone and aggression in mice. *Psychopharmacology*, *153*, 473-483.
- Fish, E. W., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2002). Aggressive behavior as a reinforcer in mice: activation by allopregnanolone. *Psychopharmacology*, *163*, 459-466.
- Fish, E. W., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2005). Escalated aggression as a reward: corticosterone and GABAA receptor positive modulators in mice. *Psychopharmacology*, *182*, 116-127.
- Fisher S. G., Ricci L. A. y Melloni R. H. (2007). Repeated anabolic/androgenic steroid exposure during adolescence alters phosphate-activated glutaminase and glutamate receptor I (GluRI) subunit immunoreactivity in Hamster brain: correlation with offensive aggression. *Behavioural Brain Research*, *180*, 77-85.
- Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H. D., Ng, L., Luk, D. C., Sheng, M., Stewart, C. L., Morgan, J. I., Connor, J. A. y Curran, T. (1994). Targeted disruption of NMDA receptor I gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*, *13*, 325-338.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, *42*, 1-11.
- Freneau, R. T. Jr., Voglmaier, S., Seal, R. P. y Edwards, R. H. (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles of glutamate. *Trends in Neuroscience*, *27*, 98-103.

- Friedel, R. O. (2004). Dopamine dysfunction in borderline personality disorder: a hypothesis. *Neuropsychopharmacology*, *29*, 1029-1039.
- Fuxjager, M. J., Forbes-Lorman, R. M., Coss, D. J., Auger, C. J., Auger, A. P. y Marler, C. A. (2010). Winning territorial disputes selectively enhances androgen sensitivity in neural pathways related to motivation and social aggression. *Proceedings of the National Academic of Science*, *107*, 12393-12398.
- Gabbott P. L., Warner T. A., Jays P. R., Salway P. y Busby S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*, *492*, 145-177.
- Gammie, S. C. y Nelson, R. (2001). cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Research*, *898*, 232-241.
- Garmendia, L., Sánchez, J. R., Azpiroz, A., Brain, P. F. y Simón, V. M. (1992). Clozapine: strong antiaggressive effects with minimal motor impairment. *Physiology & Behavior*, *51(1)*, 51-54.
- Giacalone, E., Tansella, M., Valzelli, L. y Garattini, S. (1968). Brain serotonin metabolism in isolated aggressive mice. *Biochemical Pharmacology*, *17*, 1315-1327.
- Glaum, S. R. y Miller, R. J. (1997). Acute regulation of synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors, En: *The Metabotropic Glutamate Receptors* (Conn, P.J. y Patel, J., eds) pp. 147, Humana Press, Totowa, NJ.
- Gómez, M.C., Carrasco, M.C., y Redolat, R. (2008). Differential sensitivity to the effects of nicotine and bupropion in adolescent and adult male OF1 mice during social interaction tests. *Aggressive Behavior*, *34*, 369-379.
- Gogos, J. A., Morgan, M., Luine, V., Santha, M., Ogawa, S., Pfaff, D. y Karayiorgou, M. (1998). Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proceedings of the National Academia of Science*, *95*, 9991-9996.
- Gourley, S. L., DeBold, J. F., Yin, W., Cook, J. y Miczek, K. A. (2005) Benzodiazepines and heightened aggressive behavior in rats: reduction by GABAA/aI receptor antagonists. *Psychopharmacology*, *178*, 232-240.
- Gregory, K. J., Dong, E. N., Meiler, J. y Conn, P. F. (2011). Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: Structural insights and therapeutic potential. *Neuropharmacology*, *60*, 66-81.
- Gu, G., Lorrain, D. S., Wei, H., Cole, R. L., Zhang, X., Daggett, L. P., Schaffhauser, H. J., Bristow, L. J. y Lechner, S. M. (2008). Distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors in the rat forebrain: Implication in emotional responses and central disinhibition. *Brain Research*, *1197*, 47-62.
- Guillot, P. V. y Chapouthier, G. (1996). Olfaction, GABAergic neurotransmission in the olfactory bulb, and intermale aggression in mice: modulation by steroids. *Behavioral Genetics*, *26*, 497-504.



- Hall, R. C. y Zisook, S. (1981). Paradoxical reactions to benzodiazepines. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *11*, 99S-104S.
- Halláz, J., Liposits, Z., Meelis, W., Kruk, M. R. y Haller, J. (2002). Hypothalamic attack area-mediated activation of the forebrain in aggression. *Neuroreport* *13*(10), 1267-1270.
- Hallász J., Tóth M., Kalló I., Liposits Z. y Haller J. (2006). The activation of prefrontal cortical neurons in aggression—a double labeling study. *Behavioral Brain Research*, *175*(1), 166-175.
- Haller, J. (1995). Alpha-2 adrenoceptor blockade and the response to intruder aggression in Long-Evans rats. *Physiology & Behavior*, *58*(1), 101-106.
- Haller, J., Makara, G. B. y Kovacs, J. L. (1996b). The effect of alpha-3adrenoceptor blockers on aggressive behavior in mice: implications for the actions of adrenoceptor agents. *Psychopharmacology*, *126*, 345-350.
- Haller, J., Abrahám, I., Zelena, D., Juhász, G., Makara, G. B. y Kruk, M. R. (1998). Aggressive experience affects the sensitivity of neurons towards pharmacological treatment in the hypothalamic attack area. *Behavioral Pharmacology*, *9*(5-6), 469-75.
- Haller, J., Makara, G. B. y Kruk, M. R. (1998). Catecholaminergic involvement in the control of aggression: hormones, the peripheral sympathetic, and central noradrenergic systems. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *22*, 85-97.
- Haller, J., Bakos, N., Rodriguiz, R. M., Caron, M. G., Wetsel, W. C. y Liposits, Z. (2002). Behavioral responses to social stress in noradrenaline transporter knockout mice: effects on social behavior and depression. *Brain Research Bulletin*, *58*, 279-284.
- Haller, J. y Kruk, M. R. (2006). Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *30*, 292-303.
- Haller (2014). The glucocorticoid/aggression relationship in animals and humans: an analysis sensitive to behavioral characteristics, glucocorticoid secretion patterns, and neural mechanisms. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, *17*, 73-109.
- Haller, J., Tóth, M., Halasz, J. y De Boer, S. F. (2006). Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiology and Behavior*, *88*, 173-182.
- Haney, M., Noda, K., Kream, R. y Miczek, K. A. (1990). Regional serotonin and dopamine activity: sensitivity to amphetamine and aggressive behavior in mice. *Aggressive Behavior*, *16*, 259-270.

- Hansen N. S. y Gammie, S. C. (2005). Differential fos activation in virgin and lactating mice in response to an intruder. *Physiology and Behavior*, *84*, 681-695.
- Henneberger, C., Bard, L., King, C., Jennings, A., Rusakov, D. A. (2013). NMDA receptor activation: two targets for two co-agonists. *Neurochemical Research*, *38*(6), 1156-1162.
- Herrera, D. G. y Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, *50*, 83-107.
- Hinoi, E., Takarada, T., Ueshima, T., Tsuchihashi, Y. y Yoneda, Y. (2004). Glutamate signaling in peripheral tissues. *European Journal of Biochemistry*, *271*, 1-13.
- Holmes, A., Murphy, D. L. y Crawley, J. N. (2002). Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology*, *161*, 160-167.
- Holmes, A., Li, Q., Murphy, D. L., Gold, E. y Crawley, J. N. (2003). Abnormal anxiety-related behaviour in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes, Brain and Behavior*, *2*, 365-380.
- Holmes, A., Yang, R. J., Lesch, K. P., Crawley, J. N. y Murphy, D. L. (2003). Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT1A receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, *28*, 2077-2088.
- Hoover, W. B. y Vertes, R. P. (2011). Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *519*(18), 3766-3801.
- Hovelsø, N., Sotty, F., Montezinho, L. P., Pinheiro, P. S., Herrik, K. F. y Mørk, A. (2012). Therapeutic Potential of Metabotropic Glutamate Receptor Modulators. *Current Neuropharmacology*, *10*, 12-48.
- Hrabovszky E., Halasz J., Meelis W., Kruk M. R., Liposits Z. y Haller J. (2005). Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience*, *133*, 657-666.
- Hsu, S., Raine, L. y Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *29*, 577-580.
- Huertas, P., Martín-López, M., Burón, E. y Navarro, J. F. (2007). Efectos de la administración de (RS)-2-cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG) sobre la conducta agonística en ratones. *Psiquiatría Biológica*, *14*(6), 199-203.
- Ina, D., Vogt, M.A., Luonib, A., Filipovic, D., Lima-Ojeda, J.M., Pfeiffer, N., Gasparini, F., Riva, M.A. y Gass, P. (2013). Significant increase in anxiety during aging in mGlu5 receptor knockout mice. *Behavioural Brain Research*, *241*, 27- 31.

- Jacob S. W. y de la Torre J. C. (2009). Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacological Reports*, 61, 225-235.
- Jensen, A. A., Fahlke, C., Bjørn-Yoshimoto, W. E. y Bunch, L. (2015). Excitatory amino acid transporters: recent insights into molecular mechanisms, novel modes of modulation and new therapeutic possibilities. *Current Opinion in Pharmacology*, 20, 116–123.
- Johnson, D. E., Rollema, H., Schmidt, A. W. y McHarg, A. D. (2001). Serotonergic effects and extracellular brain levels of eletriptan, zolmitriptan and sumatriptan in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 425, 203-210.
- Kammermeier, P. J. (2015). Constitutive activity of metabotropic glutamate receptor 7. *Neuroscience* 16 (17), 1-7.
- Kelley, A. E. y Berridge, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience*, 22, 3306-3311.
- Kenny, P. J. y Markou, A. (2004). The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), 265-272.
- Keshavarzi, S., Sullivan, R. K., Ianno, D. J. y Sah P. (2014). Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *Journal of Neuroscience*, 34(26), 8699-8715.
- Keverne, E. B. (2002). Mammalian pheromones: from genes to behaviour. *Current Biology*, 12, R807-R809.
- Kew, James N. C. y Kemp, John A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179, 4-29.
- Kim, J., Austin, J., Tanabe, L., Creekmor, E. y Vezina, P. (2005). Activation of group II mGlu receptors blocks the enhanced drug taking induced by previous exposure to amphetamine. *European Journal of Neuroscience*, 21, 295-300.
- Kinoshita, A., Shigemoto, R., Ohishi, H., van der Putten, H., y Mizuno, N. (1998). Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, 393, 332-352.
- Klodzinska A., Chojnacka-Wojcik E., Palucha, A., Bransky, P., Popik, P y Pilc, A. (1999). Potential anti-anxiety, anti-addictive effects of LY 354740, a selective group II glutamate metabotropic receptors agonist in animal models. *Neuropharmacology*, 38, 1831-1840.
- Knobelman, D. A., Kung, H. F. y Lucki, I. (2000). Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 1111-1117.

- Kollack-Walker, S. y Newman, S. W. (1995). Mating and agonistic behaviour produce different patterns of fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience*, *66*(3), 721-736.
- Kollack-Walker, S., Watson, S. J. y Akil, H. (1997). Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. *The Journal of Neuroscience*, *17*, 8842-8855.
- Konoshenko, M. Yu., Timoshenko, T. V. y Plyusnina, I. Z. (2013). c-Fos activation and intermale aggression in rats selected for behaviour toward humans. *Behavioural Brain Research*, *237*, 106-106.
- Kotler, M., Barak, P., Cohen, H., Averbuch, I. E., Grinshpoon, A., Gritsenko, I., Nemanov, L. y Ebstein, R. P. (1999). Homicidal behavior in schizophrenia associated with a genetic polymorphism determining low catechol O-methyltransferase (COMT) activity. *American Journals of Medical Genetics*, *88*, 628-633.
- Kruk, M. R., Van der Poel, A. M., Meelis, W., Hermans, J., Mostert, P. G., Mos, J. y Lohman, A. H. (1983). Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. *Brain Research*, *260*, 61-79.
- Kudryavtseva, N.N., Bondar, N.P., y Alekseyenko, O.V. (2000). Behavioral correlates of learned aggression in male mice. *Aggressive Behavior*, *26*, 386-400.
- Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H. y Mishina, M. (1996). Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron*, *16*, 333-344.
- Lammers, J. H., Meelis, W., Kruk, M. R. y van der Poel, A. M. (1987). Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced grooming, digging and circling in the rat. *Brain Research*, *418*, 1-19.
- Lakhan, S. E., Caro, M. y Hadzimidichalis, N. (2013). NMDA receptor activity in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Psychiatry*, *4* (52), 1-7.
- Lapidus, K., Soleimani, L y Murrough, J. W. (2013). Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *9*, 1101-1112.
- Lavreysen, H., Nóbrega, S., Leysen, J. E., Langlois, X. y Lesage, A. (2004a). Metabotropic glutamate I receptor distribution and occupancy in the rat brain: a quantitative autoradiographic study using [<sup>3</sup>H]R214127. *Neuropharmacology*, *46*, 609-619.
- Lavreysen, H., Wouters, R., Bischoff, F., Nóbrega, S., Langlois, X., Blokland, S., Somers, M., Dillen, L. y Lesage, A. (2004b). JNJ16259685, a highly potent, selective and systemically active mGluI receptor antagonist. *Neuropharmacology*, *47*, 961-972.

- Lavreysen, H. y Dautzenberg, F. M. (2008). Therapeutic potential of group III metabotropic glutamate receptors. *Current Medicinal Chemistry*, *15*, 671-684.
- Lea, P. y Faden, A. (2006). Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 Antagonists MPEP and MTEP. *CNS Drugs Reviews*, *12*(2), 149-166.
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron*, *73*, 653-676.
- Lee, Y., Duman, R. S. y Marek, G. J. (2006). The mGlu2/3 receptor agonist LY354740 suppresses immobilization stress-induced increase in rat prefrontal cortical BDNF mRNA expression. *Neuroscience Letters*, *398*, 328-332.
- Le Grevès, P., Huang, W., Johansson, P., Thörnwall, M., Zhou, Q y Nyberg, F. (1997). Effects of an anabolic-androgenic steroid on the regulation of the NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs in brain regions of the male rat. *Neuroscience Letters*, *226*, 61-64.
- Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F. y Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proceedings of the National Academic of Sciences*, *99*, 6376-6381.
- Lerma, J. y Marques, J. M. (2013). Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron*, *80*, 292-311.
- Lesage A. y Steckler, T. (2010). Metabotropic glutamate mGluI receptor stimulation and blockade: therapeutic opportunities in psychiatric illness. *European Journal of Pharmacology*, *639*, 2-16.
- Lesch, K. P. y Merschdorf, U. (2000). Impulsivity, aggression, and serotonin: a molecular psychobiological perspective. *Behavioral Sciences and the Law*, *18*, 581-604.
- Levine, J. B., Youngs, R. M., McDonald, M. L., Chu, M., Leeder, A. D., Berthiaume, F. y Konradi, C. (2007). Isolation rearing and hyperlocomotion are associated with reduced immediate early gene expression levels in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, *145*, 45-55.
- Li, Y., Erzurumlu, R. S., Chen, C., Jhaveri, S. y Tonegawa, S. (1994). Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell*, *76*, 427-437.
- Li, X., Gardner, E. L. y Xi, Z. X. (2008). The metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) allosteric agonist AMN082 modulates nucleus accumbens GABA and glutamate, but not dopamine, in rats. *Neuropharmacology*, *54*, 542-551.
- Liebenauer, L. L. y Slotnick, B. M. (1996). Social organization and aggression in a group of olfactory bulbectomized male mice. *Physiology and Behaviour*, *60*, 403-409.

- Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P. y Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, *470*, 221–226.
- Lin C.-H., Lane, H.Y. y Tsai, G. E. (2012). Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *100*, 665-677.
- Linden, A. M., Bergeron, M., Baez, M., y Schoepp, D. D. (2003). Systemic administration of the potent mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG induces c-Fos in stress-related brain regions in wild-type, but not mGlu8 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, *45*, 473-483.
- Linden A-M y Schoepp D. D. (2006). Metabotropic glutamate receptor targets for neuropsychiatric disorders. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, *3(4)*, 507-517.
- Liu, X. H., Han, M., Zhu, J. X., Sun, N., Tang, J. S., Huo, F. Q., Li, J., Xu, F. Y. y Du, J. Q. (2012). Metabotropic glutamate subtype 7 and 8 receptors oppositely modulate cardiac nociception in the rat nucleus tractus solitarius. *Neuroscience*, *220*, 322-329.
- Lobbestael, J., Cima, M. y Lemmens, A. (2015). The relationship between personality disorder traits and reactive versus proactive motivation for aggression. *Psychiatry Research*, *229(1-2)*, 155-160.
- Luján-Miras, R. (2005). Receptores metabotrópicos de glutamato: nuevas dianas moleculares de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. *Revista de Neurología*, *40(1)*, 43-53.
- Lumley, L. A., Robinson, C. L., Slusher, B. S., Wozniak, K., Dawood, M. y Meyerhoff, J. L. (2004). Reduced isolation-induced aggressiveness in mice following NAALADase inhibition. *Psychopharmacology*, *171*, 375-381.
- Lundstrom, L., Bissantz, C. y Beck, J. (2011). Structural determinants of allosteric antagonism at metabotropic glutamate receptor 2: mechanistic studies with new potent negative allosteric modulators. *British Journal of Pharmacology*, *164(2b)*, 521-537.
- Mancke, F., Bertsch, K. y Herpertz, S. C. (2015). Gender differences in aggression of borderline personality disorder. *Borderline Personality Disorder and Emotion Dysregulation*, *2(7)*, 1-12.
- Manzaneque, J. M. y Navarro, J. F. (1999). Behavioral profile of amisulpride in agonistic encounters between male mice. *Aggressive Behavior*, *25(3)*, 225-232.
- Marabese, I., Rossi, F., Palazzo, E., de Novellis, V., Starowicz, K., Cristino, L., Vita, D., Gatta, L., Guida, F., Di Marzo, V., Rossi, F., y Maione, S. (2007). Periaqueductal gray metabotropic glutamate receptor subtype 7 and 8 mediate opposite effects on amino acid release, rostral ventromedial medulla cell activities, and thermal nociception. *Journal of Neurophysiology*, *98*, 43-53.

- Marek, G. J. (2004). Metabotropic glutamate 2/3 receptors as drugs targets. *Current Opinion in Pharmacology*, 4, 18-22.
- Marino, M. D., Bourdelat-Parks, B. N., Liles, L. C. y Weinschenker, D. (2005). Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice. *Behavioural Brain Research*, 161, 197-203.
- Márquez, J., Cardona, C., Campos-Sandoval, J. A., Peñalver, A., Tosina, M., Matés, J. M. y Martín-Rufián, M. (2013). Mammalian glutaminase isozymes in brain. *Metabolic Brain Disease*, 28, 133-137.
- Martín, R., Ladera, C., Bartolomé-Martín, D., Torres, M. y Sánchez-Prieto, J. (2008). The inhibition of release by mGlu7 receptors is independent of the Ca<sub>2</sub>p channel type but associated to GABAB and adenosine A1 receptors. *Neuropharmacology*, 55, 464-473.
- Martín, R., Durroux, D., Ciruela, F., Torres, M., Pin, J. P. y Sanchez-Prieto, J. (2010). The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocate Munc-13-I protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 17907-17917.
- Martin-Lopez, M. y Navarro, J. F. (2002). Antiaggressive effects of zolpidem and zopiclone in agonistic encounters between male mice. *Aggressive Behavior*, 28, 416-425.
- Martin-Lopez, M. y Navarro, J. F. (2009). Papel de las subunidades  $\alpha$  del receptor GABA-A en la regulación de la conducta agresiva. *Psiquiatría Biológica*, 16(4), 167-174.
- Martín-López, M., Perea, J. M., Morabet, L. y Navarro, J. F. (2008). Actualización del papel del enzima MAO-A en la regulación de la conducta agresiva. *Psiquiatría Biológica*, 15(5), 175-181.
- Martín-López, M., Infante, S., Cavas, M. y Navarro, J. F. (2014). Estudio de la instigación social en un modelos de agresión inducida por aislamiento: efectos de la administración de JNJ16259685, un antagonista de receptores mGlu1. *Universitas Psychological*, 13(3), 1027-1036.
- Masugi-Tokita, M., Flor, P. J. y Kawata, M. (2015). Metabotropic glutamate receptor subtype 7 in the bed nucleus of the stria terminalis is essential for intermale aggression. *Neuropsychopharmacology*, 1-10.
- Mathews, G. C. y Diamond, J. S. (2003). Neuronal glutamate uptake Contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *Journal of Neuroscience*, 23(6), 2040-2048.
- Matsuda, S., Peng, H., Yoshimura, H., Wen, T.C., Fukuda, T. y Sakanaka, M. (1996). Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. *Neuroscience Research*, 26, 157-170.
- McAllister, K. H. (1990). Ethological of the effects of MK-801 upon aggressive male mice; similarity to chlordiazepoxide. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37, 101-106.

- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the brain: Review of Physiology and Pathology. *Journal of Nutrition*, *130*, 1007S-1015S.
- Mendoza, D. L., Bravo, H. A. y Swanson, H. H. (1999). Antiaggressive and anxiolytic effects of gepirone in mice, and their attenuation by WAY 100635. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *62*, 499-509.
- Menezes, M. M., Santini, M. A., Benvenha, M. J., Marek, G. J., Merchant, K. M., Mikkelsen, J. D. y Svensson, K. A. (2013). The mGlu2/3 Receptor Agonists LY354740 and LY379268 Differentially Regulate Restraint-Stress-Induced Expression of c-Fos in Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience Journal*, 736439.
- Mercier, M. S, Lodge, D., Fang, G., Nicolas, C. S., Collett, V. J., Jane, D. E. Collingridge, G. L. y Bortolotto, Z. A. (2013). Characterisation of an mGlu8 receptor-selective agonist and antagonist in the lateral and medial perforant path inputs to the dentate gyrus. *Neuropharmacology*, *67*, 294-303.
- Mercier, M. S. y Lodge, D. (2014). Group III metabotropic glutamate receptors: pharmacology, physiology and therapeutic potential. *Neurochemical Research*, *39*(10), 1876-1894.
- Meredith, M. y Westberry, J. M. (2004). Distinctive responses in the medial amygdala to same species and different-species pheromones. *The Journal of Neuroscience*, *24*(25), 5719-5725 .
- Michelsen, K. A., Schmitz, C. y Steinbusch, H. W. M. (2007). The dorsal raphe nucleus—from silver stainings to a role in depression. *Brain Research Reviews*, *55*, 329-342.
- Miczek, K. A. y O'Donnell, J. M. (1978). Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology*, *57*, 47-55.
- Miczek, K. A., Weerts, E. M., Tornatzky, W., DeBold, J. F. y Vatne, T. M. (1992). Alcohol and "bursts" of aggressive behavior: ethological analysis of individual differences in rats. *Psychopharmacology*, *107*(4), 551-563.
- Miczek, K. A. y Hanney, M. (1994). Psychomotor stimulant effects of D-amphetamine, MDMA and PCP-aggressive and schedule-controlled behaviour in mice. *Psychopharmacology*, *115*, 358-365.
- Miczek, K. A., Haney, M., Tidey, J., Vivian, J. y Weerts, E. (1994). Neurochemistry and pharmacotherapeutic management of violence and aggression. Understanding and preventing violence: biobehavioral influences on violence. En: *Understanding and Preventing violence, Volume 2: Biobehavioral influences*. National Academy Press, pp. 244-514 (Reiss, A. J., Miczek, K. A., y Roth, J. A., editors). Washington, DC.
- Miczek, K. A., Hussain, S. y Faccidomo, S. (1998). Alcohol heightened aggression in mice: attenuation by 5-HT1A receptor agonists. *Psychopharmacology*, *139*, 160-168.



- Miczek, K. A., Mutschler, N. H., Van Erp, A. M. M., Blank, A. D. y McInerney, S. C. (1999). D-Amphetamine “cue” generalizes to social defeat stress: sensitization and role of accumbens dopamine. *Psychopharmacology*, *147*, 190-199.
- Miczek, K. A., Maxson, S. C., Fish, E. W. y Faccidomo, S. (2001). Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behavioral Brain Research*, *125*, 167-181.
- Miczek, K. A., Fish, E. W., De Bold, J. F. y de Almeida, R. M. M. (2002). Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and g-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology*, *163*, 434-458.
- Miczek, K. A., Faccidomo, S., de Almeida, R. M. M., Bannai, M., Fish, E. W. y Debold, J. F. (2004). Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1036*, 336-355.
- Miczek, K. A., de Almeida, R. M. M., Kravitz, E. A., Rissman, E. F., de Boer, S. F. y Raine, A. (2007). neurobiology of escalated aggression and violence. *Journal of Neuroscience*, *27*(44), 11803-11806.
- Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R. y Sánchez-Prieto, J. (2002). The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both  $[Ca^{2+}]_c$  and cAMP: evidence for a strong reduction of  $Ca^{2+}$  entry in single nerve terminals. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 14092-14101.
- Millán, C., Luján, R., Shigemoto, R. y Sánchez-Prieto, J. (2002). Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and  $Ca^{2+}$  channels in single nerve terminals. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 47796-47803.
- Mitsukawa, K., Yamamoto, R., Ofner, S., Nozulak, J., Pescott, O., Lukic, S., Stoehr, N., Mombereau, C., Kuhn, R., McAllister, K. H., van der Putten, H., Cryan, J. F., y Flor, P. J. (2005). A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: Activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *102*, 18712-18717.
- Moghaddam, B. (2004). Targeting metabotropic glutamate receptors for treatment of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology*, *174*, 39-44.
- Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. y Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, *98*, 427-436.
- Monn, J. A., Valli, M. J., Massey, S. M., Hansen, M. M., Kress, T. J., Wepsiec, J. P., Harkness, A. R., Grutsch, J. L., Wright, R. A., Johnson, B. G., Andis, S. L., Kingston, A., Tomlinson, R., Lewis, R., Griffey, K. R., Tizzano, J. P. y Schoepp, D. D. (1999). Synthesis, pharmacological characterization and molecular modeling of heterobicyclic amino

- acids related to LY354740: Identification of two new potent, selective and systemically active agonists for group II metabotropic glutamate receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *42*, 1027-1040.
- Moore, N. A., Rees, G. y Monn, J. A. (1999). Effects of the group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY354740 on schedule-controlled behaviour in rats. *Behavioural Pharmacology*, *10*, 319-325.
- Morales, M. y Root, D. H. (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, *282C*, 60-68.
- Morgan, J. I. y Curran, T. (1995). Immediate-early genes: ten years on. *Trends in Neurosciences*, *18*, 66-67.
- Morrison, T. R y Melloni, R. H. Jr. (2014). The role of serotonin, vasopressin, and serotonin/vasopressin interactions in aggressive behavior. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, *17*, 189-228.
- Mos, J., Olivier, B., Poth, M., Van Oorschot, R. y Van Aken, H. (1993). The effects of dorsal raphe administration of eltopazine, TFMPP and 8-OH-DPAT on resident intruder aggression in the rat. *European Journal of Pharmacology*, *238*, 411-415.
- Mugford, R.A. y Novell, N. M. (1970). Pheromones and their effect on aggression in mice. *Nature*, *226*, 967-968.
- Mustly, R. E. y Consroe, P. F. (1982). Phencyclidine produces aggressive behaviour in rapid eye movement sleep-deprived rats. *Life Sciences*, *30*, 1733-1738.
- Natarajan, D. y Caramaschi, D. (2010). Animal violence demystified. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*(9), 1-16.
- Navarro, J. F. y Manzaneque, E. (1996). Acute and suchronic effects of tiapride on isolation-induced aggression in males mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *58*(1), 255-259.
- Navarro, J. F. y Maldonado, E. (2004). Effects of acute, subchronic and intermittent MDMA (ecstasy) administration on agonistic interactions between male mice. *Aggressive Behavior*, *30*, 84-91.
- Navarro, J. F., Burón, E. y Martín-López, M. (2004). Behavioral profile of L-655,708, a selective ligand for benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the alpha-5 subunit, in social encounters between male mice. *Aggressive Behavior*, *30*, 319-25.
- Navarro, J. F., Rivera, A., Maldonado, E., Cavas, M. y de la Calle, A. (2004). Anxiogenic-like activity of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ("Ecstasy") in the social interaction test is accompanied by an increase of c-fos expression in mice amygdala. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. *28*(2), 249-254.

- Navarro, J. F., Postigo, D., Martín-López, M. y Burón, E. (2006). Antiaggressive effects of MPEP, a selective antagonist of mGlu5 receptor, in agonistic interactions between male mice. *European Journal of Pharmacology*, *551*, 67-70.
- Navarro, J. F., Buron, E. y Martin-Lopez, M. (2007). Antiaggressive effects of topiramate in agonistic encounters between male mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, *29*(3), 195-198.
- Navarro, J. F., Luque, M. J. y Martín-López, M (2009). Effects of L379268, a selective agonist of mGlu2/3 receptors, on isolation-induced aggression in male mice. *The Open Pharmacology Journal*, *3*, 17-20.
- Nedergaard, M., Takano, T. y Hansen, A. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature*, *3*, 748-755.
- Nelson, R. J. y Trainor, B. C. (2007). Neuronal mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 536-546.
- Nelson, R. J. y Chiavegatto, S. (2001). Molecular basis of aggression. *Trends of Neurosciences*, *24*(12), 713-719.
- Newell, K. A. y Matosin, N. (2014). Rethinking metabotropic glutamate receptor 5 pathological findings in psychiatric disorders: implications for the future of novel therapeutics. *BMC Psychiatry*, *14*(23), 1-6.
- Newhill, C. E., Eack, S. M. y Mulvey, E. P. (2009). Violent behavior in borderline personality. *Journal of Personality Disorders*, *23*, 541-54.
- Newman, E. L., Chu, A., Bahamón, B., Takahashi, A., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2012). NMDA receptor antagonism: escalation of aggressive behavior in alcohol-drinking mice. *Psychopharmacology*, *224*, 167-177.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B. y Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *100*, 656-664.
- Nicoletti, F.I., Battaglia, G., Storto, M., Ngomba, R. T., Iacovelli, L., Arcella, A., Gradini, R., Sale, P., Rampello, L., De Vita, T., Di Marco, R., Melchiorri, D. y Bruno, V. (2007). Metabotropic glutamate receptors: beyond the regulation of synaptic transmission. *Psychoneuroendocrinology*, *32*, Suppl 1, S40-S45.
- Nicoletti F., Bockaert, J., Collingridge, G. L., Conn, P. J., Ferraguti, F., Schoepp, D. D., Wroblewski, J. T. y Pin, J. P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*, *60*, 1017-1041.
- Niswender C. M. y Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*, 295-322.

- Ohishi, H., Akazawa, C., Shigemoto, R., Nakanishi, S., y Mizuno, N. (1995). Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 360, 555-570.
- Olivier, B., Olivier-Aardema, R. y Wiepkema, P. R. (1983). Effect of anterior hypothalamic and mammillary area lesions on territorial aggressive behaviour in male rats. *Behavioural Brain Research*, 9, 59-81.
- Olivier, B., Mos, J. y Miczek, K. A. (1991). Ethopharmacological studies of anxiolytics and aggression. *European Neuropsychopharmacology*, 1, 97-100.
- Olivier, B. y Young, L. J. (2002). Animal Models of Aggression. En K. L. Davis, D. Charney, J. T. Coyle y C. Nemeroff (eds). *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. American College of Neuropsychopharmacology.
- Olivier, B. (2004). Serotonin and aggression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1036, 382-392.
- Olivier, B. y van Oorschot, R. (2005). 5-HT1B receptors and aggression: a review. *European Journal of Pharmacology*, 526(1-3), 207-217.
- O'Shea, R. D. (2002). Roles and regulation of glutamate transporter in the central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29, 1019-1023.
- Oswald, R. E., Ahmed, A., Fenwick, M. K. y Loh, A. P. (2007). Structure of glutamate receptors. *Current Drug Targets*, 8(5), 573-582.
- Owssowska, K., Pietraszek, M., Wards, J. y Wolfarth, S. (2004). Potential antipsychotic and extrapyramidal effects of (RS)-3,4-dicarboxyphenylglycine ((RS)-3,4-DCPG), a mixed AMPA antagonist/mGluR8 agonist. *Polish Journal of Pharmacology*, 56, 295-304.
- Ozawa, S., Kayima, H. y Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian Central Nervous System. *Progress in Neurobiology*, 54, 581-618.
- Palazzo, E., Fu, Y., Ji, G., Maione, S., y Neugebauer, V. (2008). Group III mGluR7 and mGluR8 in the amygdala differentially modulate nocifensive and affective pain behaviors. *Neuropharmacology*, 55, 537-545.
- Palucha A., Branski P. y Pilc, A. (2004). Selective mGlu5 receptor antagonist MTEP attenuates naloxone-induced morphine withdrawal symptoms. *Polish Journal of Pharmacology*, 56(6), 863-866.
- Palucha, A., Klak, K., Branski, P., van der Putten H., Flor, P.J., y Pilc, A. (2007). Activation of the mGlu7 receptor elicits antidepressant-like effects in mice. *Psychopharmacology*, 194, 555-562.

- Pałucha, A. y Pilc, A. (2007). Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, *115*, 116-147.
- Pałucha-Poniewiera, A., Novák, K. y Pilc, A. (2009). Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, attenuates morphine-withdrawal symptoms after peripheral administration in mice. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*, 1454-1457.
- Pałucha-Poniewiera, A., Branski, P., Lenda, T. y Pilc, A. (2010). The antidepressant-like action of metabotropic glutamate 7 receptor agonist *N,N*-Bis(Diphenylmethyl)-1,2-Ethanediamine (AMN082) is serotonin-dependent. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *334*, 1066-1074.
- Parcell, S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Alternative Medicine Review*, *7*(1), 22-44.
- Pan, Y., Xu, L., Young, K. A., Wang, Z. y Zhang, Z. (2010). Agonistic encounters and brain activation in dominant and subordinate male greater long-tailed hamsters. *Hormones and Behavior*, *58*(3), 478-484.
- Panlilio, L. V. y Goldberg, S. (2007). Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction*, *102*, 1863-1870.
- Peyron, C., Petit, J. M., Rampon, C., Jouvet, M. y Luppi, P. H. (1998). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, *82*, 443-468.
- Pelkey, K. A., Yuan, X., Lavezzari, G., Roche, K. W. y McBain C. J. (2007). mGluR7 undergoes rapid internalization in response to activation by the allosteric agonist AMN082. *Neuropharmacology*, *52*(1), 108-117.
- Pilc, A., Chaki, S., Nowak, G. y Witkin, J. M. (2008). Mood disorders: regulation by metabotropic receptors. *Biochemical Pharmacology*, *75*, 997-1006.
- Pinna, G., Dong, E., Matsumoto, K., Costa, E. y Guidotti, A. (2003). In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*, 2035-2040.
- Pitsikas, N. (2014). The metabotropic glutamate receptors: Potential drug targets for the treatment of anxiety disorders? *European Journal of Pharmacology*, *723*, 181-184.
- Potegal, M., Blau, A. y Glusman, M. (1981). Inhibition of intraspecific aggression in male hamsters by septal stimulation. *Physiological Psychology*, *9*(2), 213-218.
- Puglisi-Allegra, S. y Cabib, S. (1990). Effects of defeat experiences on dopamine metabolism in different brain areas of the mouse. *Aggressive Behavior*, *16*, 271-284.

- Ramírez, J. M. (2006). Bioquímica de la agresión. *Psicopatología Clínica, Legal y Forense*, 5, 43-66.
- Redolat, R., Brain, P. F. y Simón, V. M. (1991). Sulpiride has an antiaggressive effect in mice without markedly depressing motor activity. *Neuropharmacology*, 30(1), 41-46.
- Reimer, R. J., Freneau, R. T., Bellocchio E. E. y Edwards, R. H. (2001). The essence of excitation. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 417-421.
- Ricci LA, Grimes JM, Knyshevski I, Melloni RH (2005) Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) immunoreactivity in hamster brain: correlation with offensive aggression. *Brain Research*, 1035, 131-138.
- Rodgers, R. J. y Depaulis, A. (1982). GABAergic influences on defensive fighting in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 17, 451-456.
- Rodriguiz, R. M., Chu, R., Caron, M. G. y Wetsel, W. C. (2004). Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. *Behavioural Brain Research*, 148, 185-198.
- Roeling, T. A., Kruk, M. R., Schuurmans, R., Veening, J. G. (1993). Behavioural responses of bicuculline methiodide injections into the ventral hypothalamus of freely moving, socially interacting rats. *Brain Research*, 615(1), 121-127.
- Rosenkranz, J. A. y Grace, A. A. (2002). Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 22, 324-337.
- Rowlett, J. K., Platt, D. M., Lelas, S., Atack, J. R. y Dawson, G. R. (2005). Different GABA(A) receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine like drugs in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 915-920.
- Rudissaar, R., Pruus, K., Skrebuhhova-Malmros, T., Allikmets, L. y Matto, V. (2000). Involvement of GABAergic neurotransmission in the neurobiology of the apomorphine-induced aggressive behavior paradigm, a model of psychotic behavior in rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 22, 637-640.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H y Mölher, H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gammaaminobutyric acid-A receptor subtypes. *Nature*, 401, 796-800.
- Rudolph, U., Crestani, F. y Mohler, H. (2001). GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 188-194.

- Sagar, S. M., Sharp, F. R. y Curran T. (1998). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, *240*(4857), 1328-31.
- Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kobilka, B. K. y Scheinin, M. (1998). Adrenergic alpha2c receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *The Journal of Neuroscience*, *18*, 3035-3042.
- Salling, M., Faccidomo, S. y Hodge C.W. (2008). Nonselective suppression of operant ethanol and sucrose self-administration by the mGluR7 positive allosteric modulator AMN082. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *91*, 14-20.
- Sandhu, K. V., Lang, D., Müller, B., Nullmeier, S., Yanagawa, Y., Schwegler, H. y Stork, O. (2014). Glutamic acid decarboxylase 67 haplodeficiency impairs social behavior in mice. *Genes Brain and Behavior*, *13*(4), 439-450.
- Santangelo, R. M., Acker, T. M., Zimmerman, S. S., Katzman, B. M., Strong, K. L., Traynelis, S. F. y Liotta, D. C. (2012). Novel NMDA receptor modulators: an update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *22*(11), 1337-1352.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T. y Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 11455-11458.
- Saudou, F., Amara, D. A., Dierich, A., Lemeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M. C. y Hen, R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science*, *265*, 1875-1878.
- Scanziani, M., Salin, P. A., Vogt, K. E., Malenka, R. C. y Nicoll, R. A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature*, *385*(6617), 630-634.
- Schlumberger, C., Schäfer, D., Barberi, C., More, L., Nagel, J., Pietraszek, M., Schmidt, W. J. y Danysz, W. (2009). Effects of a metabotropic glutamate receptor group II agonist LY354740 in animal models of positive schizophrenia symptoms and cognition. *Behavioural Pharmacology*, *20*, 56-66.
- Schoepp, D. D., Johnson, B. G., Wright, R. A., Salhoff, C. R., Mayne, N. G., Wu, S., Cockerham, S. L., Burnett, J. P., Belegaje, R., Bleakman, D. y Monn, J. A. (1997). LY354740 is a potent and highly selective group II metabotropic glutamate receptor agonist in cells expressing human glutamate receptors. *Neuropharmacology*, *36*(1), 1-11.
- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *299*, 12-20.
- Schoepp, D. D., Wright, R. A., Levine, L. R., Gaydos, B. y Potter, W. Z. (2003). LY354740, an mGlu2/3 receptor agonist as a novel approach to treat anxiety/stress. *Stress*, *6*, 189-197.

- Seeman, P., Caruso, C. y Lasaga, M. (2008). Dopamine partial agonist actions of the glutamate receptor agonists LY354740 and LY379268. *Synapse*, 62(2), 154-158.
- Seo, D., Patrick, C. J. y Kennealy, P. J. (2008). Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders. *Aggression and Violent Behavior*, 13, 383-395.
- Shaikh, M. B., Barrett, J. A. y Siegel, A. (1987). The pathways mediating affective defense and quiet biting attack behavior from the midbrain central gray of the cat: an autoradiographic study. *Brain Research*, 437, 9-25.
- Shaltiel, G., Maeng, S., Malkesman, O., Pearson, B., Schloesser, R. J., Tragonm, T., Rogawski, M., Gasior, M., Luckenbaugh, D., Chen, G. y Manji, H. K. (2008). Evidence for the involvement of the kainite receptor subunit GluR6 (GRIK2) in mediating behavioral displays related to behavioral symptoms of mania. *Molecular Psychiatry*, 13, 858-872.
- Sheng, M y Greenberg, M. E. (1990). Regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477-485.
- Sherman, S. M. (2014). The function of metabotropic glutamate receptors in thalamus and cortex. *The Neuroscientist*, 20(2), 136-149.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P. J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. y Mizuno, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 17, 7503-7522.
- Shigemoto, R. y Mizuno, N. (2000). Metabotropic glutamate receptors-immunocytochemical and in situ hybridization analyses. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol 18, Glutamate* (Otersen, O. P. y Storm-Mathisen, J., editors), pp 63-98, Elsevier Science, New York.
- Shigeri, Y., Sealb, R. P. y Shimamoto, K., (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research Reviews*, 45, 250-265.
- Shimizu, K., Kurosawa, N. y Seki, K. (2016). The role of the AMPA receptor and 5-HT3 receptor on aggressive behavior and depressive-like symptoms in chronic social isolation-reared mice. *Physiology and Behavior*, 153, 70-83.
- Shimshek, D. R., Bus, T., Grinevich, V., Single, F. N., Mack, V., Sprengel, R. y Seeburg, P. H. (2006). Impaired reproductive behaviour by lack of GluR-B containing AMPA receptors but not of NMDA receptors in hypothalamic and septal neurons. *Molecular Endocrinology*, 20, 219-231.
- Siegel, A., Roeling, T. A., Gregg, T. R. y Kruk, M. R. (1999). Neuropharmacology of brain-stimulation evoked aggression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23, 359-389.



- Siegel, A., Bhatt, S., Bhatt, R. y Zalcman, S. (2007). The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. *Current Neuropharmacology*, 5, 135-147.
- Siegl, S., Flor, P. J., y Fendt, M. (2008). Amygdaloid metabotropic glutamate receptor subtype 7 is involved in the acquisition of conditioned fear. *Neuroreport*, 19, 1147-1150.
- Siever, L. J. (2008). Neurobiology of aggression and violence. *American Journal of Psychiatry*, 165, 429-442.
- Spooren WI y Gasparini F. (2004). mGlu5 receptor antagonists: a novel class of anxiolytics? *Drug News and Perspectives*, 17(4), 251-257.
- Stachowicz, K., Brański, P., Klak, K., van der Putten, H., Cryan, J.F., Flor, P.J., y Andrzej, P. (2008). Selective activation of metabotropic G-protein-coupled glutamate 7 receptor elicits anxiolytic-like effects in mice by modulating GABAergic neurotransmission. *Behavioural Pharmacology*, 19, 597-603.
- Stachowicz, K., Klak, K., Pilc, A. y Chojnacka-Wojcik, E. (2005). Lack of the antianxiety-like effect of (S)-3,4-DCPG, an mGlu8 receptor agonist, after central administration in rats. *Pharmacology Reports*, 57, 856-860.
- Steckler, T., Oliveira, A. M., Van Dyck, Ch., van Craenendonck, H., Mateus, A. M., Langlois, X., Lesage, A. y Prickaerts, J. (2005a). Metabotropic glutamate receptor I blockade impairs acquisition and retention in a spatial Water maze task. *Behavioural Brain Research*, 164, 52-60.
- Steckler, T., Lavreysen, H., Oliveira, A. M., Aerts, N., van Craenendonck, H., Prickaerts, J., Megens, A. y Lesage, A. (2005b). Effects of mGluI receptor blockade on anxiety-related behaviour in the rat lick suppression test. *Psychopharmacology*, 179, 198-206.
- Steketee, J.D. y Kalivas, P.W. (2011). Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking. *Pharmacological Reviews*, 63 (2), 348-365.
- Stork, O., Ji, F. Y., Kaneko, K., Stork, S., Yoshinobu, Y., Moriya, T., Shibata, S. y Obata, K. (2000). Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Research*, 865, 45-58.
- Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C. y Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 295, 1493-1500.
- Sukhotina I. A. y Beshpalov A. Y. (2000). Effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and MRZ 2/579 on morphine withdrawal-facilitated aggression in mice. *Psychopharmacology*, 149, 345-50.

- Sukoff Rizzo, S. J., Leonard, S. K., Gilbert, A., Dollings, P., Smith, D. L., Zhang, M. Y., Di, L., Platt, B. J., Neal, S., Dwyer, J. M., Bender, C. N., Zhang, J., Lock, T., Kowal, D., Kramer, A., Randall, A., Huselton, C., Vishwanathan, K., Tse, S. Y., Butera, J., Ring, R. H., Rosenzweig-Lipson, S., Hughes, Z. A. y Dunlop, J. (2011). The metabotropic glutamate receptor 7 allosteric modulator AMN082: A monoaminergic agent in disguise? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338, 345-352.
- Summa, M., Di Prisco, S., Grilli M., Usai, C., Marchi, M. y Pittaluga, A. (2013). Presynaptic mGlu7 receptors control GABA release in mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 66, 215-224.
- Swann, A. C. (2003). Neuroreceptor mechanisms of aggression and its treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64, 26-35.
- Taber, M. T. y Fibiger, H. C. (1995). Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *Journal of Neuroscience*, 15, 3896-3904.
- Tachikawa, K. S., Yoshihara, Y. y Kuroda, K.O. (2013). Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. *Journal of Neuroscience*, 33(12), 5120-5126.
- Takahashi, A., Kwa, C., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2010a). GABAA receptors in the dorsal raphe nucleus of mice: escalation of aggression after alcohol consumption. *Psychopharmacology*, 211, 467-477.
- Takahashi, A., Shimamoto, A., Boyson, C. O., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2010b). GABAB receptor modulation of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus and escalation of aggression in mice. *The Journal of Neuroscience*, 30, 11771-11780.
- Takahashi, A., Quadros, I. M., de Almeida, R. M. M. y Miczek, K. A. (2011). Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology*, 213, 183-212.
- Takahashi, A., Schilit, A. N., Kim, J., DeBold, J. F., Koide, T. y Miczek, K. A. (2012). Behavioral characterization of escalated aggression induced by GABAB receptor activation in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology*, 224, 155-166.
- Takahashi, A., Quadros, I. M., de Almeida, R. M. M. y Miczek, K. A. (2013). Behavioral and pharmacogenetics of aggressive behavior. *Currents Topics in Behavioral Neuroscience*, 12, 73-138.
- Takahashi, A. y Miczek, K. A. (2014). Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 17, 3-44.
- Takahashi, A., Nagayasu, K., Nishitani, N., Kaneko, S. y Koide, T. (2014). Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLoS One*, 9(4), e94657.

- Takahashi, A., Lee, R. X., Iwasato, T., Itohara, S., Arima, H., Bettler, B., Miczek, K. A. y Koide, T. (2015). Glutamate input in the dorsal raphe nucleus as a determinant of escalated aggression in male mice. *Journal of Neuroscience*, *35*(16), 6452-6463.
- Takamori, S. (2006). VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neuroscience Research*, *55*, 343-351.
- Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P. y Tew, K. D. (2002). Glutamine and glutamate. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *56*, 446-457.
- Tidey, J. W. y Miczek, K. A. (1996). Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, *721*, 140-149.
- Tiihonen, J., Kuikka, J., Bergstrom, K., Hakola, P., Karhu, J., Ryyänänenn O. P. y Föhr, J. (1995). Altered striatal dopamine re-uptake site densities in habitually violent and non-violent alcoholics. *Nature Medicine*, *1*, 654-657.
- Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S y Menini, A. (2009). From pheromones to behavior. *Physiological Reviews*, *89*, 921-956.
- Tomas, N. K., Clayton, P. y Jane, D. E. (1997). Dicarboxyphenylglycines antagonize AMPA- but not kainite-induced depolarizations in neonatal rat motoneurons. *European Journal of Pharmacology*, *338*, 111-116.
- Tulogdi, A., Biro, L., Barsvari, B., Stankovic, M., Haller, J. y Toth, M. (2015). Neural mechanisms of predatory aggression in rats-implications for abnormal intraspecific aggression. *Behavioural Brain Research*, *283*, 108-115.
- van der Vegt, B. J., Lieuwes, N., van de Wall, E. H., Kato, K., Moya-Albiol, L., Martínez-Sanchis, S., de Boer, S. F. y Koolhaas, J. M. (2003). Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, *117*, 667-674.
- Vanderberg R. J. y Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiological Reviews*, *93*, 1621-1657.
- Van Erp, A. M. M. y Miczek, K. A. (2000). Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *Journal of Neuroscience*, *20*, 9320-9325.
- van Meer, P. y Raber, J. (2015). Mouse behavioral analysis in systems biology. *Biochemical Journal*, *389*(3), 593-160.
- Vekovischeva, O. Y., Aitta-Aho, T., Echenko, O., Kankaanpaa, A., Seppala, T., Honkanen, A., Sprengel, R. y Korpi, E. R. (2004). Reduced aggression in AMPA-type glutamate receptor GluR-A subunit-deficient mice. *Genes, Brain and Behavior*, *3*, 253-265.

- Vekovischeva, O. Y., Aitta-Aho, T., Verbitskaya, E., Sandnabba, K. y Korpi, E. R. (2007). Acute effects of AMPA-type glutamate receptor antagonists on intermale social behaviour in two mouse lines bidirectionally selected for offensive aggression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *87*, 241-249.
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, *51*, 32-58.
- Vezina P. y Leyton, M. (2009). Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*, *56*, 160-168.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. y Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, *63*, S191-203.
- Vinson P. G. y Conn, P. J. (2012). Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets for schizophrenia. *Neuropharmacology*, *62*, 1461-1472.
- Volavka, J. (2013). Violence in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatria Danubina*, *25(1)*, 24-33.
- Volavka, J. (2014). Comorbid personality disorders and violent behavior in psychotic patients. *Psychiatric Quarterly*, *85(1)*, 65-78.
- Wall, V. L., Fischer, E. K. y Bland, S. T. (2012). Isolation rearing attenuates social interaction-induced expression of immediate early gene protein products in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Physiology & Behavior*, *107(3)*, 440-450.
- Wang, F., Zhu, J., Zhu, H., Zhang, Q., Lin, Z. y Hu, H. (2011). Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. *Science*, *334*, 693-697.
- Weerts, E., Miller, L., Hood, K. y Miczek, K. (1992). Increased GABAA dependent chloride uptake in mice selectively bred for low aggressive behavior. *Psychopharmacology*, *108*, 196-204.
- Wieronska, J.M. y Pile, A., (2009). Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs. *Neurochemistry International*, *55*, 85-97.
- Wilmot, C. A., Vanderwende, C. y Spoerlein, M. T. (1987). The effects of phencyclidine on fighting in differentially housed mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *28*, 341-346.
- Wischhof, L., Hollensteiner, K.J. y Koch, M. (2011). Impulsive behavior in rats induced by intracortical DOI infusions is antagonized by co-administration of an mGlu2/3 receptor agonist. *Behavioural Pharmacology*, *22(8)*, 805-813.

Woolley, M. L., Pemberton, D. J., Bate, S., Corti, C. y Jones D. N. (2008). The mGlu2 but not the mGlu3 receptor mediates the actions of the mGluR2/3 agonist, LY379268, in mouse models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology*, *196*(3), 431-440.

Wright, R. A., Johnson, B. G., Zhang, C., Salhoff, C., Kingston, A. E., Calligaro, D. O., Monna, J. A., Schoepp, D. D. y Marek, G. J. (2013). CNS distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors: Transgenic mice and [<sup>3</sup>H]LY459477 autoradiography. *Neuropharmacology*, *66*, 89-98.

Zhao, X., Sun, L., Jia H, Meng, Q., Wu, S., Li, N. y He, S. (2009) Isolation rearing induces social and emotional function abnormalities and alters glutamate and neurodevelopment-related gene expression in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*, 1173-1177.

Zhou, Q. y Sheng, M. (2013). NMDA receptors in nervous system disease. *Neuropharmacology*, *74*, 69-75.

---

## II. APÉNDICE

---

**II.1. LISTA DE ABREVIATURAS.**

- AH:** núcleo hipotalámico anterior.
- ALLO:** allopregnanolona.
- AMPA:** receptor ionotrópico de glutamato AMPA.
- BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro.
- BLA:** amígdala basolateral.
- BNST:** lecho de la estría terminal.
- CeA:** amígdala central.
- Cg:** corteza cingulada.
- DA:** dopamina.
- DAT:** transportador de dopamina.
- DLPAG:** sustancia gris periacueductal dorsolateral.
- DRN:** núcleo dorsal del rafe.
- EAAT:** transportador de aminoácidos excitatorios.
- Glu:** glutamato.
- HAA:** área hipotalámica de ataque.
- iGluR:** receptor ionotrópico de glutamato.
- IHA:** área hipotalámica intermedia.
- iGlu:** ionotrópico de glutamato.
- IL:** corteza infralímbica.
- i. p.:** intraperitoneal.
- ISRS:** inhibidor de la recaptación de serotonina.
- KO:** knockout.
- LH:** núcleo hipotalámico lateral.
- LPAG:** sustancia gris periacueductal lateral.
- LS:** septum lateral.
- LSd:** septum lateral dorsal.
- LSv:** septum lateral ventral.
- mGlu:** metabotrópico de glutamato.
- mGluR:** receptor metabotrópico de glutamato
- MAO:** monoamina oxidasa.
- MeA:** amígdala medial.
- MePV:** amígdala medial posteroventral.
- NAc:** núcleo accumbens.
- NE:** norepinefrina.
- NET:** transportador de norepinefrina.
- NLOT:** núcleo del tracto olfatorio.
- NMDAR:** receptor ionotrópico de glutamato NMDA.
- OFC:** corteza orbitofrontal.
- PAG:** sustancia gris periacueductal.
- PFC:** corteza prefrontal.
- PFCm:** corteza prefrontal medial.
- PMD:** núcleo premamilar dorsal.
- PrL:** corteza prelímbica.
- PVN:** núcleo hipotalámico paraventricular.
- SERT:** transportador de serotonina.
- SNC:** sistema nervioso central.
- TH:** tiroxina hidroxilasa.

**VGLUT:** transportador vesicular glutamatérgico.

**VMH:** núcleo hipotalámico ventromedial.

**VNO:** órgano vomeronasal.

**VTa:** área tegmental ventral.

**5-HT:** serotonina.



## II.2. PROTOCOLOS PARA LOS ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

### II.2.1. Tampones para inmunohistoquímica

#### ❖ Tampón fosfato (PB) 0.4M pH 7.4

Dihidrógenofosfato sódico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I.06346, Merck) .....	13.8 g
Hidrógenofosfato disódico $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (I.06580, Merck) .....	53.4 g
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada .....	hasta 1000 ml

Disolver, ajustar pH 7,4 y enrasar.

#### ❖ Tampón fosfato salino (PBS) 0.1M pH 7.4

Cloruro sódico (NaCl) (I3I659, Panreac) .....	9 g
PB 0.4M, pH 7,4 .....	250 ml
$\text{H}_2\text{O}$ destilada .....	hasta 1000 ml

Disolver, ajustar pH 7,4 y enrasar.

#### ❖ Paraformaldehído 4% en PB 0,1M, pH 7,4

Paraformaldehído $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (I.04005, Merck) .....	4 g
PB 0.2M, pH 7,4 .....	50 ml
$\text{H}_2\text{O}$ destilada .....	50 ml

1. Disolver 4 g de paraformaldehído en 25 ml de agua destilada previamente calentada a 60 °C, añadir unas gotas de NaOH para su completa disolución.
2. Filtrar y completar con agua destilada hasta 50 ml y dejar enfriar.

### II.2.2. Solución crioprotectora

#### ❖ Sacarosa al 30% con azida sódica al 0,02%

Sacarosa $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (I3I62I, Panreac) .....	30 g
Azida sódica .....	20 $\mu\text{l}$

PBS 0.1M, Ph 7.4 ..... hasta 100 ml

### II.2.3. Portaobjetos gelatinizados

#### ❖ Solución de gelatina

Gelatina oro (251336, Panreac)..... 1 g

Alumbre de cromo  $KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  (141284, Panreac) ..... 0,1 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... 200ml

1. Disolver la gelatina en agua desionizada calentada a 60 °C.
2. Añadir el alumbre de cromo y diluir.
3. Filtrar la solución.

#### ❖ Gelatinizado de los portaobjetos

1. Desengrasar los portaobjetos en una mezcla de alcohol absoluto, durante al menos un día.
2. Secar los portaobjetos.
3. Sumergirlos en la solución de gelatina, preparada minutos antes. Se darán dos pases de 10 segundos cada uno.
4. Dejar secar en la estufa de 37 °C durante 24 horas.

