

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS



Universidad
Nacional
de Córdoba



Carrera de
Doctorado en
Neurociencias

Rol de los Neuroesteroides como moduladores del Sistema Serotoninérgico en un modelo de agresión en rata macho

Lic. María Belén Mulle Bernedo

Director: Dr. Ricardo J. Cabrera. Codirectora: Dra. Claudia Bregonzio.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED) Universidad de Mendoza
IMBECU - CONICET- Mendoza

Córdoba, Argentina

2021

Índice

Agradecimientos	8
Abreviaturas	9
Resumen	10
CAPÍTULO 1	13
Introducción	13
1. Agresión	13
1. 1. Consideraciones Generales	13
1. 2. Comportamientos agresivos en humanos	14
1. 2. 1. Tipos de Agresión Humana	14
1. 2. 1. 1. Impulsivas-reactivas	14
1. 2. 1. 2. Premeditadas o instrumentales	15
1. 2. 1. 3. Defensivas	16
1. 3. Comportamientos agresivos en no humanos	16
1. 3. 1. De acuerdo a la filogenia y ontogenia	16
1. 3. 2. De acuerdo a las condiciones distales y proximales	17
1. 4. Validación de los modelos de agresión en animales	18
1. 5. Prueba de residente-intruso	19
2. Neurobiología de la conducta agresiva	20
2. 1. Sistema Serotonérgico	20
2. 1. 1. Biosíntesis de 5-HT	21
2. 1. 2. Núcleos del Rafe	21
2. 1. 3. Receptores de 5-HT	22
2. 1. 3. Anatomía del Bulbo olfatorio	25
2. 3. Hipótesis de la deficiencia serotonérgica en la conducta agresiva	26
2. 3. 1. Modelo de agresión por disminución de la concentración de 5-HT	27
2. 4. Sistema GABAérgico	28
2. 4. 1. Inervación GABAérgica en el BO	31
3. Neuroesteroides	32

3. 1. Biosíntesis de neuroesteroides en el encéfalo de mamíferos	34
3. 2. Allopregnanolona	35
3. 2. 1. Biosíntesis de Allopregnanolona en el encéfalo de mamíferos	36
3. 2. 2. Allopregnanolona y Sistema Serotonérgico	37
3. 2. 3. Allopregnanolona y Sistema GABAérgico	37
4. Objetivo General	38
4. 1. Objetivos Específicos	38
4. 1. 1. Validar el modelo de agresión en ratas macho Sprague Dawley	38
4. 1. 2. Evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y génicos de Allo	39
4. 1. 3. Evaluar los efectos de Allo sobre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y Serotonérgico	39
CAPÍTULO 2	40
Materiales y Métodos	40
1. Consideraciones Éticas	40
2. Animales de experimentación	40
3. Drogas	40
4. Procedimientos Experimentales Generales	41
4. 1. Inhibición de la enzima TPH por pCPA	41
4. 2. Procedimiento quirúrgico: Implantación de cánula en el tercer ventrículo cerebral	41
4. 3. Administración de las drogas experimentales en el tercer ventrículo	43
4. 4. Test residente versus intruso	43
4. 4. 1. Conductas evaluadas en el test RI.	45
4. 5. Eutanasia	47
4. 6. Localización del implante en el tercer ventrículo cerebral.	47
4. 7. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	47
4. 8. Determinación de la concentración 5-HT y 5-HIAA	48
4. 9. Extracción de ARN total, retro-transcripción y PCR en tiempo real	49
5. Análisis estadístico	50
6. Diseños experimentales por objetivos específicos	51

6. 1. Validar el modelo de agresión en ratas macho Sprague Dawley	51
6. 1. a. "Evaluar los patrones de agresividad en ratas macho en el test RI, posterior a la inhibición de la enzima TPH por pCPA"	51
6. 1. a. 1. Grupos Experimentales	54
6. 1. b. "Evaluar y correlacionar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO con la conducta agresiva"	54
6. 1. b. 1. Grupos Experimentales	54
6. 1. c. "Determinar la expresión del ARNm de TPH2 en el BO, posterior a la administración del inhibidor enzimático pCPA"	55
6. 1. c. 1. Grupos Experimentales	55
6. 2. Evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y génicos de Allo	55
6. 2. a. "Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de Allo"	55
6. 2. a. 1. Grupos Experimentales	56
6. 2. b. "Evaluar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO, posterior a la administración de Allo"	57
6. 2. b. 1. Grupos Experimentales	57
6. 2. c. "Determinar la expresión del ARNm de TPH2; GABAA α 1 y GABAA δ en el BO, posterior a la administración de Allo"	57
6. 2. c. 1. Grupos Experimentales	58
6. 3. Evaluar los efectos de Allo sobre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y Serotoninérgico	58
6. 3. a. "Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de un antagonistas y un agonistas específicos de GABAA y 5-HT"	58
6. 3. a. 1. Grupos Experimentales GABAérgicos	59
6. 3. a. 2. Grupos Experimentales Serotoninérgicos	60
CAPÍTULO 3	61
Resultados	61
1. 1. Validar el modelo de agresión en ratas macho Sprague Dawley	61
1. 1. a. "Evaluar los patrones de agresividad en ratas macho en el test RI, posterior a la inhibición de la enzima TPH por pCPA"	61
1. 1. b. "Evaluar y correlacionar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO con la conducta agresiva"	64

1. 1. c. "Determinar la expresión del ARNm de TPH2 en el BO, posterior a la administración del inhibidor enzimático pCPA"	66
1. 2. Conclusiones Parciales	67
2. 1. Evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y génicos de Allo	67
2. 1. a. "Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de Allo"	67
2. 1. b. "Evaluar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO, posterior a la administración de Allo"	71
2. 1. c. "Determinar la expresión del ARNm de TPH2; GABAA α 1 y GABAA δ en el BO, posterior a la administración de Allo"	72
2. 2. Conclusiones Parciales	73
3. 1. Evaluar los efectos de Allo sobre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y Serotoninérgico	74
3. 1. a. "Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de un antagonistas y un agonistas específicos de GABAA y 5-HT"	74
3. 1. a. 1. Sistema GABAérgico	74
3. 1. a. 2. Sistema Serotoninérgico	78
3. 2. Conclusiones Parciales	81
CAPÍTULO 4	82
Discusión	82
CAPÍTULO 5	90
Conclusiones	90
CAPÍTULO 6	92
Bibliografía	92
Anexo 1	108

Agradecimientos

Agradezco profundamente:

Al personal y autoridades del INBIOMED, Universidad de Mendoza, IMBECU, CONICET, Facultad de Ciencias - Universidad de Valpariso, Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo y Carrera del Doctorado en Neurociencias - Universidad Nacional de Córdoba, por brindarme el apoyo y las herramientas necesarias para realizar el presente trabajo de tesis.

A mis directores, los Dres. Cabrera y Bregonzio, por acompañarme y potenciar mis competencias. Al Dr. Ramón Sotomayor, por permitirme desarrollar parte de los objetivos bajo su acompañamiento. A la Dra. Fiorela Campoverde Arbocco, por su generosa ayuda en las técnicas génicas utilizadas. A los miembros del comité asesor, Dras. Abate y Cambiasso, por cada uno de sus honestos y cuidadosos aportes en el transcurso del trabajo.

A mis padres que me dieron la vida y me han seguido alentando a avanzar en cada paso, que me acompañaron en cada momento, compartiendo cada uno de mis preocupaciones o logros, sin ellos no habría encontrado la fortaleza y tenacidad para seguir. A mi hermano que cada día escuchó palabras y afirmaciones “extrañas” en el living de la casa, en las caminatas o momento recreativos, él fue la cotidianeidad y monotonía; el detalle y heroísmo para transitar cada momento.

A mis amigos, en particular a Lucia, Viviana, Vic y Sthefano que me acompañaron: por cada terraza, sala, aula, patio y viaje que me mantuvo en la tarea. Ellos compartieron los momentos sin sentido, silenciosos, extraños o/y divertidos. A Anto, por ser el Kiko de mi Kako. A Gabriel, que en silencio y a la distancia me ayudó a ver el camino.

A mis compañeros y amigos del trabajo, en particular a Sebastian, que me acompañó y acompañará en los caminos que intento elegir en libertad, los recuerdos que a su lado generé los atesoro en los rincones de mi alma.-

Abreviaturas

3 α -HOR: 3 α -hidroxiesteroide óxido reductasa	GABA Δ δ : Subunidad δ del receptor
5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético	GABA Δ
5-HT: 5-hidroxitriptamina (Serotonina)	GABA Δ β : Receptor ácido γ -aminobutírico tipo B
5-HT Δ $1A$: Receptor de 5-hidroxitriptamina $1A$	GABA Δ c : Receptor ácido γ -aminobutírico tipo C.
5-HT Δ $1B$: Receptor de 5-hidroxitriptamina $1B$	HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
5-HT Δ $2A$: Receptor de 5-hidroxitriptamina $2A$	i.c.v.: Intracerebroventricular
5-HT Δ $2C$: Receptor de 5-hidroxitriptamina $2C$	i.p.: Intraperitoneal
5-HT Δ 3 : Receptor de 5-hidroxitriptamina 3	ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
5-HT Δ 4 : Receptor de 5-hidroxitriptamina 4	LAGR: Latencia de agresión
5-HT Δ 5 : Receptor de 5-hidroxitriptamina 5	LCR: Líquido cefalorraquídeo
5-HT Δ 6 : Receptor de 5-hidroxitriptamina 6	min:minutos
5-HT Δ 7 : Receptor de 5-hidroxitriptamina 7	M-MLV: Moloney del virus de la leucemia murina
5 α -DHP: 5 α -dihidroprogesterona	MR: Núcleos mediales del rafe
AGRE : Conductas de agresión	NR: Núcleos del Rafe
AA: Alta agresión	pCPA: para-Clorofenilalanina
AL: Actividad locomotora	CPF: Corteza Prefrontal
Allo: allopregnanolona	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
AMPC: Adenocín monofosfato cíclico	RI: residente-intruso
ANOVA I: Análisis de la varianza de una vía	RT: Retrotranscripción
ANOVA II: Análisis de la varianza de dos vías	SEM: Error estándar de la Media
BA: Baja agresión	SNC: Sistema Nervioso Central
Bic: Bicuculina	TPH: Triptófano Hidroxilasa
BO: Bulbo olfatorio	TPH1: Triptófano Hidroxilasa 1
BOA: Bulbo olfatorio accesorio	TPH2: Triptófano Hidroxilasa 2
BOP: Bulbo olfatorio principal	veh: Vehículo
CG: Capa glomerular	
CnS: Conductas no sociales	
CS: Conductas sociales	
DR: Núcleos dorsales del rafe	
DHEA: Dehidroepiandrosterona	
dNTP: Desoxinucleótido trifosfato.	
GABA: Ácido γ -amino butírico	
GABA Δ : Receptora ácido γ -aminobutírico tipo A	
GABA Δ α 1 : Subunidad α 1 del receptor	
GABA Δ	

Resumen

La conducta agresiva es un comportamiento abierto y complejo con la intención de infligir daño y/o realizarlo, o la amenaza de daño a otro individuo. Surge de la interacción social entre los miembros de una misma especie o entre diferentes especies y sus expresiones son diversas, de acuerdo a las necesidades vitales de los individuos. Para los roedores, la estructura con mayor relevancia al momento de establecer las interacciones sociales es el bulbo olfatorio (BO), una estructura que, curiosamente, ha sido dejada de lado al momento de estudiar la conducta agresiva. Describir los circuitos neuronales específicos y los procesos neurobiológicos responsables de generar las respuestas agresivas, no es tarea fácil. El sistema de neurotransmisión clásicamente asociado a la agresión es el serotonérgico y da origen a la hipótesis de deficiencia serotonérgica de la agresión. Este sistema inerva gran parte del encéfalo. La serotonina (5-HT) se produce mayoritariamente a nivel de los núcleos del rafe. Otro de los sistemas implicados en la conducta agresiva, es el sistema GABAérgico. A su vez, los esteroides neuroactivos modulan una amplia variedad de funciones fisiológicas y comportamentales. Allopregnenolona (Allo) se encuentra dentro de los esteroides neuroactivos más estudiados en la actualidad. Éste es un metabolito activo de progesterona que actúa como modulador alostérico del receptor GABA_A e influye en una amplia gama de fenómenos cognitivos, en respuesta al estrés y diferentes variantes comportamentales.

En este trabajo de tesis doctoral, se evaluaron los efectos de Allo i.c.v. en un modelo de ratas macho con rasgos de agresión territorial ofensiva; inducida por la depleción del sistema serotonérgico, por para-Clorofenilalanina (pCPA) i.p.. Para establecer la validez del modelo, en primera instancia, se ordenaron de menor a mayor grado cualitativo, las conductas agresivas presentes en la especie y cepa y se evaluaron en una prueba residente-intruso (RI), tres y seis días posteriores a la administración i.p. de pCPA. Estos resultados permitieron establecer que seis días pos-pCPA, presentan el mayor grado de conducta agresiva, por lo que se lo seleccionó para la ejecución de la totalidad de las evaluaciones comportamentales;

pruebas neuroquímicas y genéticas desarrolladas en el bulbo olfatorio. Teniendo en cuenta la importancia del BO en las conductas de interacción social en ratas y la innervación serotoninérgica desde el rafe hacia dicha estructura, se evaluó tanto la concentración de 5-HT y su principal metabolito 5-HIAA, como la expresión de ARNm de la enzima de paso de síntesis cerebral de 5-HT, TPH2.

Con el objetivo de evaluar el rol modulador de Allo sobre esta conducta, se procedió al desarrollo de un protocolo quirúrgico estereotáxico para implantar una cánula fija en el tercer ventrículo cerebral, seis días previos a la administración de pCPA. Con este protocolo se evaluaron las conductas agresivas de los animales, seis días pos-pCPA en una prueba RI, y 30 min previos a la prueba se administró Allo (6 μ M) i.c.v. Posteriormente, se evaluaron en el BO las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA. Como Allo modula alostéricamente al receptor GABA_A y el BO posee una rica innervación GABAérgica, se evaluó la expresión de ARNm de las subunidades GABA_{A α 1}, GABA_{A δ} , en paralelo con TPH2.

Se evaluó también la participación de los sistemas de neurotransmisión serotoninérgicos y GABAérgicos. Para ello, se utilizó el protocolo de intervención quirúrgica para la implantación de una cánula en el tercer ventrículo cerebral. Se administraron un antagonista GABA_A y un agonista serotoninérgico en (el mismo protocolo de administración pCPA) realizando evaluaciones de la conducta agresiva en el paradigma de residente intruso.

Al analizar los resultados se observaron diferencias significativas en las conductas agresivas posteriores a la administración i.p. de pCPA y, a partir de las conductas cualitativamente más agresivas, se estableció el día para los estudios neuroquímicos y genéticos. Se observó disminución de la concentración de 5-HT y aumento del catabolismo serotoninérgico, sin modificación de la concentración del metabolito 5-HIAA, simultáneamente a un aumento de la expresión del ARNm de TPH2 en el BO.

Por otra parte, la administración de Allo i.c.v. produjo una disminución de la conducta agresiva en los animales con depleción, junto con un aumento de la concentración de 5-HT, 5-HIAA y del catabolismo serotoninérgico. Además,

disminuyó la expresión del ARNm de GABA_{Aα1}, sin modificación de la expresión del ARNm de GABA_{Aδ} en el BO.

El antagonismo del sistema GABAérgico y agonismo serotoninérgico nos permitió observar un aumento de la conducta agresiva en su expresión cuantitativa absoluta, pero una disminución de las conductas cualitativamente más agresivas.

Los resultados obtenidos nos ponen en evidencia la importancia adaptativa de la conducta agresiva en el contexto de territorialidad y nos permiten concluir que Allo posee un efecto modulador positivo sobre dicha conducta. Los mecanismos neurofisiológicos rápidos involucrados en esta conducta guardan una estrecha relación con el BO, la estructura de mayor importancia en el ingreso sensorial, reconocimiento del contexto y condición natural de individuo gregario. Finalmente, nuestros resultados evidencian fuertemente, que Allo podría ser beneficiosa para el tratamiento de diversas enfermedades psiquiátricas que poseen en sus signos más relevantes la agresión desadaptativa o patológica.

CAPÍTULO 1

Introducción

1. Agresión

1. 1. Consideraciones Generales

La agresión se define como un comportamiento abierto con la intención de infligir daño y/o realizarlo, o como la amenaza de daño a otro individuo (Bartholow, 2018). Es una conducta de carácter social que puede surgir entre miembros de distintas especies (interespecífica) o de la misma especie (intraespecífica) (Nelson y Trainor, 2007). En general, los conflictos surgen por el estatus social o por recursos limitados, como: las parejas, la comida y los territorios. Los comportamientos agresivos varían desde letales a sutiles y existen siempre que los intereses de dos o más individuos entran en conflicto (Lorenz, 1971; Svare, 1983). Es precisamente la interacción social la que decide qué individuo gana estatus o acceso al recurso en disputa, incluso en casos en los que una postura o gesto de sumisión de un individuo evite la pelea (Miczek et al., 2011). Existen reglas específicas en las especies y situaciones para regular la agresión. Estas pueden excederse en cantidad y cualidad, lo que transforma a la conducta en una respuesta desadaptativa. Esta forma desadaptativa de agresión en humanos suele intercambiarse con la palabra violencia. La Figura 1.1. muestra la taxonomía y diversidad de los comportamientos agresivos en humanos y no humanos.



Figura. 1. 1. Taxonomía de las conductas agresivas en humanos y no humanos.

1. 2. Comportamientos agresivos en humanos

En los humanos, las normas sociales establecen límites para determinar lo que se acepta como comportamientos agresivos normativos (de acuerdo a las normas culturales y/o jurídicas). Sin embargo, la variedad de comportamientos interpersonales anormales, clasificados como violentos, es un problema grave de salud social y mental (Ferris et al., 2008). A su vez, las personas agresivas tienen tasas más altas de enfermedades mentales en comparación con personas no agresivas (Manchia et al., 2017). Las enfermedades o trastornos psiquiátricos, que especifican el comportamiento agresivo en su descripción semiológica, incluyen: esquizofrenia, psicosis reactiva breve, trastorno de ansiedad, trastorno de adaptación, trastorno de control de los impulsos, trastorno de personalidad antisocial, trastorno por déficit de atención, trastornos del ánimo, trastorno de estrés postraumático, autismo y abuso de sustancias (Blair et al., 2006; Boles y Miotto, 2003; Manchia et al., 2017; Raine, 2002; Rydén et al., 2009; Viding et al., 2007; Volavka, 2013). Asimismo, la semiología de cada una de estas patologías presenta, en su complejidad, variadas expresiones del comportamiento agresivo.

La taxonomía de las conductas agresivas más utilizada y con mayor valor heurístico, que guía las líneas de investigación en humanos, se divide en dos: impulsivas-reativa y premeditadas o instrumentales (Siever, 2008), y ambas pueden desencadenar una forma de agresión patológica. A su vez, es importante agregar una tercera forma de agresión: la agresión defensiva. A partir de ellas, surgen las líneas de investigación básica, que informan los mecanismos neurobiológicos y neuroendócrinos subyacentes a las mismas.

1. 2. 1. Tipos de Agresión Humana

1. 2. 1. 1. Impulsivas-reativas

La forma de agresión impulsiva, a menudo, va acompañada de desinhibición e inestabilidad afectiva, pero no necesariamente de tendencias antisociales. Puede asociarse con lesiones neurológicas específicas que involucran

a los lóbulos temporales o frontales, con abuso de sustancias o con rasgos temperamentales y de personalidad (Boles y Miotto, 2003). A su vez, se manifiestan en eventos explosivos, descontrolados, acompañados de ira o miedo, caracterizados por altos niveles de excitación y, a veces, también, por ser autodirigidos.

El creciente cuerpo de datos empíricos documenta el vínculo de la agresión impulsiva con causas biológicas y ambientales, así como con factores de respuesta al tratamiento farmacológico o psicológico (Coccaro, 2010; Coccaro y Kavoussi, 2010). Existe una asociación entre la agresión impulsiva con anormalidades específicas de sistemas de neurotransmisores o de los sistemas hipotalámico y límbico (Archer, 2006; Stoff y Cairns, 2014). Entre los hallazgos más consistentes se destaca, por un lado, la reducción de la actividad serotoninérgica en personas con agresión impulsiva, manifestada por la disminución de la concentración de uno de los metabolitos de serotonina (5-HT), el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Brown et al., 1979; Linnoila et al., 1983), y, por otro, la dependencia de la actividad hormonal, más específicamente de testosterona y cortisol (van Honk, 2010).

1. 2. 1. 2. Premeditadas o instrumentales

La forma de agresión premeditada o instrumental se presenta en un contexto de comportamiento antisocial persistente. Estas personas son menos propensas a presentar inestabilidad afectiva y su comportamiento agresivo generalmente está orientado a un objetivo. El agresor inicia la conducta con la finalidad de lograr una meta, que no es necesariamente el daño físico de la víctima, aunque muchas veces redunde en daño (van Honk, 2010).

Las personas que manifiestan esta forma de agresión suelen presentar un nivel de excitación bajo, muestran baja frecuencia cardíaca y la conductancia de la piel es baja (Stoff y Cairns, 2014). Adicionalmente, está regulado por sistemas corticales superiores y es menos dependiente del sistema hipotalámico y límbico, que median la agresión impulsiva, y probablemente menos dependiente de hormonas que otros tipos de agresión (van Honk, 2010).

1. 2. 1. 3. Defensivas

La forma de agresión defensiva surge como respuesta a situaciones de hostilidad, ya sea por agresores con características impulsivas o premeditadas (Stoff y Cairns, 2014).

1. 3. Comportamientos agresivos en no humanos

Los comportamientos agresivos humanos y no humanos tienen algunas características comunes, pero la mayoría de las agresiones animales son menos complejas. Al estudiar la agresión en animales, es importante tener en cuenta la etología del comportamiento e incluir el desarrollo ontogenético y filogenético en la funcionalidad del individuo y la especie, respectivamente. Los etólogos han caracterizado la importancia adaptativa final de los patrones sobresalientes de los diferentes tipos de agresión y la relación costo/beneficio que representan (Lorenz, 1971; Marler, 1976; Tinbergen, 1968). Para ello, han examinado los orígenes ontogenéticos y filogenéticos del comportamiento y las causas distales y proximales que los originaron. De los orígenes y causas, deriva la división que se explica a continuación.

1. 3. 1. De acuerdo a la filogenia y ontogenia

1. 3. 1. 1. Adaptativa

Estos comportamientos ocurren cuando los individuos compiten por alimento, agua y otros recursos necesarios para la supervivencia y la reproducción; cuando defienden su territorio o descendencia, como en la agresión territorial y maternal, o en respuesta a la frustración o el miedo (Nelson y Trainor, 2007; Miczek et al., 2001). Por lo que, participar en una interacción de carácter agresivo, a menudo, es beneficiosa para el individuo y la especie. Las señales agresivas posturales y acciones propiamente dichas son utilizadas por el animal para alcanzar objetivos específicos o para defenderse de amenazas y ataques reales

(Miczek et al., 2002). Un ejemplo de ello, son los enfrentamientos para establecer las jerarquías de dominio en un territorio, que se establecen y mantienen a través de confrontaciones entre machos rivales (Brain y Benton, 1979; Miczek et al., 2001).

1. 3. 1. 2. Desadaptativa o Patológica

Los comportamientos agresivos desadaptativos tienen componentes, tanto cuantitativos como cualitativos, que exceden los niveles normativos de las especies (Haller y Kruk 2006; Nelson y Trainor, 2007; Takahashi y Miczek, 2014). Se caracterizan por ser provocados fácilmente, es decir, tienen umbral bajo y latencia corta; se presentan con alta tasa de ataques, generan daño en los tejidos corporales (generalmente están dirigido a partes vulnerables del cuerpo); no pueden identificar a un oponente de acuerdo con su naturaleza, sexo y ubicación; no logran finalizar los estallidos agresivos; no logran identificar las señales de apaciguamiento, y hay insensibilidad de las consecuencias a largo plazo (Miczek et al., 2004).

1. 3. 2. De acuerdo a las condiciones distales y proximales

1. 3. 2. 1. Ofensivo

Los comportamientos agresivos ofensivos son aquellos que se presentan en individuos no humanos que inician la conducta. Se observa en interacciones entre machos maduros y la mayoría de las investigaciones sobre la genética y neurobiología de la agresión estudian este tipo particular de agresión. En el caso de los roedores, el espectro de conductas está altamente estereotipado y ritualizado e incluye pisadas, persecuciones, falsas montas, trabas de ataque, ataques laterales y mordidas (Takahashi y Miczek, 2014). El ataque generalmente se dirige hacia áreas del cuerpo menos vulnerables como la espalda y los flancos del oponente (Blanchard et al., 2001).

1. 3. 2. 2. Defensiva

Los comportamientos defensivos se producen en respuesta a estímulos amenazantes o inductores de miedo y, a menudo, resultan en escapes (Blanchard et al., 2003; Brain y Benton, 1979). En el caso de los roedores macho, los comportamientos defensivos específicos incluyen escapes, inmovilizaciones, posturas defensivas y amenazas, que se producen en respuesta a ataques de depredadores o coespecíficos (Blanchard et al., 2003; Himmler, 2013).

1. 4. Validación de los modelos de agresión en animales

Debido a la presencia de signos agresivos en muchas patologías y su consiguiente relevancia clínica, el comportamiento agresivo en animales experimentales, en condiciones controladas de laboratorio, se evalúa inicialmente de acuerdo con los criterios establecidos desde hace mucho tiempo para todos los modelos animales de psicopatologías (McKinney, 1989).

Los modelos animales permiten homologar ciertas características de determinados comportamientos. En el caso de los comportamientos agresivos los modelos que logran un elevado nivel de validez responden a tres criterios:

- Validez de constructo: logran homología entre la preparación experimental y los signos del estado clínico en términos de origen filogenético y ontogenético.
- Validez de apariencia: logran los signos y conductas que pueden homologarse a nivel fenomenológico.
- Validez predictiva: logran respuesta a los tratamientos clínicamente establecidos basados en los mecanismos neurobiológicos claramente entendidos.

Además de estos criterios, necesitan ser evaluados en términos de estabilidad y reproducibilidad dentro y entre laboratorios.

Los modelos actuales de agresión se abstienen de afirmar homología y restringen el enfoque en ciertos signos y síntomas isomórficos (Nestler y Heyman, 2010). Sin embargo, en 2008 Ramsey y Van Honk han indicado que los estados neurobiológicos que desencadenan los encuentros agresivos son similares en humanos y no humanos y allí recae la importancia de utilizarlos y validarlos. En

este trabajo de tesis doctoral se utilizaron elementos que permitieron modelar agresión desadaptativa (o patológica) ofensiva, evaluada en un prueba residente-intruso (RI) de territorialidad.

1. 5. Prueba de residente-intruso

La cuantificación rigurosa de los comportamientos agresivos es un requisito esencial para identificar los mecanismos neurobiológicos y neuroendócrinos subyacentes. La prueba de comportamiento más comúnmente utilizada para cuantificar las conductas agresivas manifiestas en roedores es el RI (Koolhaas et al., 2013; Miczek et al., 2013). La prueba permite evaluar las conductas agresivas en toda su amplitud. El residente se coloca en una caja que le permite familiarizarse con el ambiente, o sea, su territorio. Luego, se coloca un intruso desconocido en la caja, de la misma especie, cepa y sexo que el residente. El ingreso del intruso generalmente provoca que el residente inicie el olfateo ano-genital, de lo que resulta la detección de feromonas no volátiles por parte del residente. Dependiendo de la especie o cepa, las amenazas agresivas, como los sonajeros de cola (un ruido que se origina de los chasquidos de la cola del residente), las vocalizaciones o las persecuciones, pueden preceder a los comportamientos agresivos (Nelson y Chiavegatto, 2001). En ratas y ratones, los ataques generalmente se dirigen hacia los flancos que tienen la piel gruesa para evitar heridas. Cada aparición de estos elementos de comportamiento se puede medir en términos de frecuencia, inicio y terminación, durante la prueba en vivo y/o en registros de video.

En muchos casos, los andrógenos promueven un comportamiento agresivo en el RI (Lima y Spinelli de Oliveira, 2014; Vandenberg, 1971) o se secretan en respuesta a una agresión (Marler et al., 2005). En estas condiciones, los residentes generalmente reducen la agresión en respuesta al intruso que adopta posturas sumisas. Prueba de esto, es cuando ratas adrenalectomizadas se evalúan como residentes y las posturas sumisas por parte del intruso son ignoradas, lo que resulta en una agresión intensificada (Haller et al., 2001).

El paradigma RI puede proporcionar, entonces, importante información sobre los mecanismos que determinan la agresión en múltiples contextos.

2. Neurobiología de la conducta agresiva

Para explicar y comprender los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la conducta agresiva, es necesario recordar que la misma es una conducta social. (Nelson y Trainor, 2007). A su vez, el rol de los circuitos neuronales de áreas específicas relacionadas y sistemas de neurotransmisión y neuroendócrinos de regulación de la agresión adaptativa, principalmente dentro de la especie, son la base para dilucidar qué mecanismos subyacen a las formas de agresión desadaptativa o patológica (Miczek et al., 2013). Es importante evaluar y comprender dónde se originan los comportamientos agresivos, así como los posibles mecanismos que los desencadenan. Si bien, múltiples sistemas de neurotransmisión y neuromodulación están implicados, dos sistemas se destacan: el serotoninérgico y GABAérgico.

2.1. Sistema Serotoninérgico

La 5-HT es un neurotransmisor de señalización protagonista en diversas funciones conductuales y fisiológicas. Entre ellas se encuentra el estado de ánimo, aprendizaje, memoria, comportamiento sexual, respuestas al estrés, sueño, termorregulación, ingesta de alimento y agresión (Berger et al., 2009; Buhot et al., 2000; Strüder y Weicker, 2001; Mittal et al., 2017). La inervación de 5-HT en el encéfalo es difusa y está ampliamente arborizada, lo que indica que la 5-HT puede modificar a un gran número de neuronas de un modo paracrino. El papel particular que juega la 5-HT en el comportamiento agresivo se ha estudiado en una amplia variedad de especies, incluida la humana (Kravitz y Huber, 2003; Miczek et al., 2004; Takahashi et al., 2011; Niederkofler et al., 2016). Para fundamentar dicho papel, en primera instancia, describiremos la biosíntesis, el núcleo en el que se sintetiza y las principales proyecciones a los núcleos asociados.

2. 1. 1. Biosíntesis de 5-HT

La naturaleza de la síntesis de 5-HT en el cerebro ofrece una forma única de alterar la función serotoninérgica, tanto en animales como en humanos. La 5-HT se sintetiza a partir de L-triptófano mediante una reacción enzimática de dos pasos. La enzima de paso triptófano hidroxilasa (TPH) requiere oxígeno molecular y tetrahidrobiopterina como cosustrato. El producto de la reacción, 5-hidroxi-L-triptófano, se convierte en 5-HT por la L-aminoácido descarboxilasa aromática (Mosienko et al., 2015) (Ver Figura 1. 2). La TPH es la enzima limitante de la síntesis de 5-HT y es importante destacar sus dos isoformas de paso, TPH1 y TPH2, que son codificadas por dos genes independientes. Mientras que la isoforma TPH1, en términos generales, es periférica, la TPH2 es cerebral y hasta ahora su expresión se encuentra mayormente descripta en las neuronas del complejo del rafe (Walther et al., 2003; Pelosi et al., 2015). Por lo que, esta isoforma es responsable de la síntesis de 5-HT cerebral.

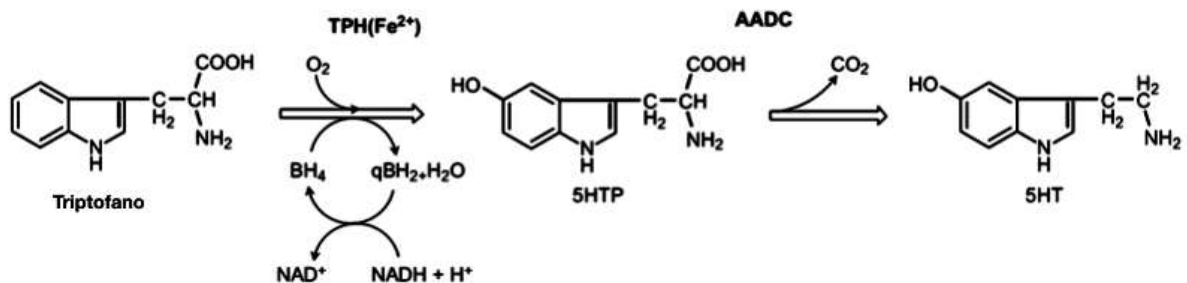


Figura. 1. 2. **Biosíntesis de 5-HT.** 5-HT (serotonina). TPH (Triptófano hidroxilasa). BH4 (tetrahidrobiopterina). 5-HTP (5-hidroxi-L-triptófano). AADC (L-aminoácido descarboxilasa aromática). (Traducido de Müller y Jacobs, 2010).

2. 1. 2. Núcleos del Rafe

El sistema de 5-HT cerebral se origina en los núcleos del rafe (NR) ubicado en el tronco encefálico de los mamíferos, donde las neuronas serotoninérgicas se agrupan en nueve núcleos numerados, de B1 a B9, en un eje rostrocaudal (Lesch y Waider; 2012). La porción caudal se proyecta principalmente hacia la médula

espinal y el cerebelo y comprende los núcleos denominados: rafe *pallidus* (B1), rafe *obscurus* (B2) y rafe *magnus* (B3). Estos están involucrados en la actividad motora, el control del dolor y la regulación del sistema nervioso autónomo. La porción rostral del rafe comprende el núcleo lineal caudal, el núcleo dorsal del rafe (DR) (B6, B7) y el núcleo medial del rafe (MR) (B9, B8 y B5). Estos grupos de neuronas serotoninérgicas se proyectan principalmente en el cerebro anterior, donde inervan prácticamente todo el cerebro: corteza cerebral, amígdala, hipocampo, ganglios basales, tálamo, hipotálamo y bulbo olfatorio (BO) (Lesch y Waider, 2012; Muzerelle et al., 2016; Puig Velasco, 2004) (ver Figura 1. 3).

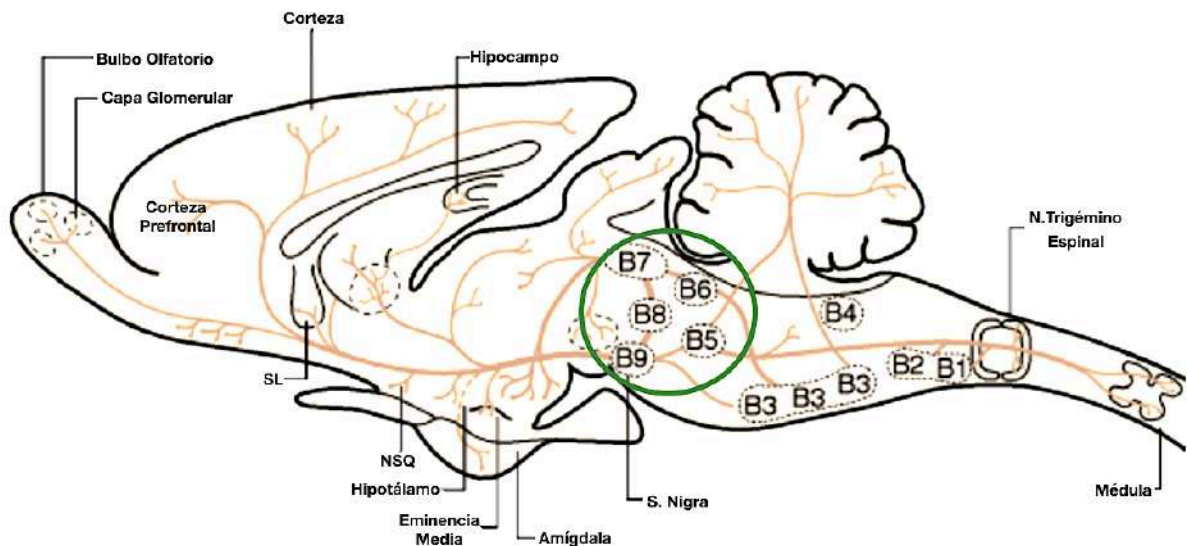


Figura. 1. 3. Representación esquemática de un corte sagital del cerebro de ratona. Muestra la localización de los núcleos serotoninérgicos y las principales proyecciones de los mismos. En el círculo verde, pueden verse los núcleos del núcleo DR y MR (Modificado de Puig Velasco, 2004).

2. 1. 3. Receptores de 5-HT

Los diversos efectos de la 5-HT están mediados por los receptores de 5-HT. La liberación de 5-HT en la hendidura sináptica, posterior a la despolarización neuronal, tiene destinos en receptores de membrana postsinápticos y presinápticos (Hoyer et al., 2002; Müller y Jacobs, 2010). Además, la unión de la 5-HT al

autorreceptor actúa como una retroalimentación negativa contra una mayor liberación de 5-HT en la hendidura sináptica (McDevitt, 2011). La clasificación aceptada reconoce 7 subtipos de receptores, desde el 5-HT₁ hasta el 5-HT₇ (David y Gardier, 2016; Hoyer et al., 2002). Gran parte de los receptores exhiben heterogeneidad y de acuerdo a ella son divididos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, etc.). Seis de estos receptores forman parte de la superfamilia de receptores metabotrópicos formados por 7 dominios transmembrana y acoplados a proteínas G. Mientras que 5-HT₁ y 5-HT₅, son inhibitorios (acoplados a G_i/G_o y disminuyen los niveles de AMPc); 5-HT₄ y 5-HT₇, son excitatorios (acoplados a G_s y aumentan la actividad de AMPc). Por otro lado, 5-HT₂ incrementa IP₃ y diacilglicerol, lo que resulta en la liberación intracelular de Ca²⁺. El receptor 5-HT₃ es único, ya que pertenece a la familia de receptores ionotrópicos e implica un canal de cationes dependiente de ligando, similar a los receptores GABA_A, GABA_C y N-metil-D-aspartico (David y Gardier, 2016; Kandel, 2001) (ver Figura 1. 4.).

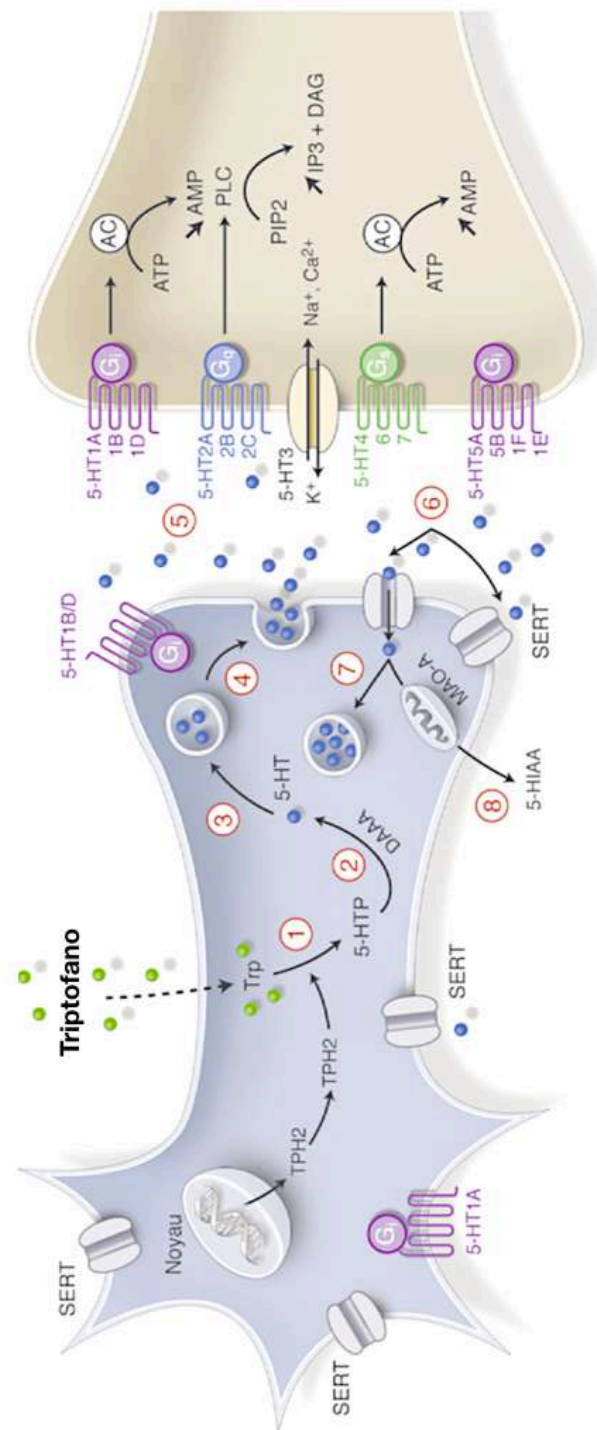


Figura. 1. 4. **Representación de la síntesis de 5-HT y sus receptores.** El triptófano, se transforma en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) (1) a partir de triptófano hidroxilasa (TPH1/2). El aminoácido aromático descarboxilasa (DAAA) transforma el 5-HTP en 5-HT (2). El 5-HT luego se almacena en vesículas usando un transportador vesicular, el transportador vesicular de monoamina tipo 2 (VMAT)(3). Liberación de 5-HT Ca^{2+} dependiente (4). Luego, 5-HT actúa sobre uno de los diferentes subtipos de receptores serotonérgicos (5). La mayoría del 5-HT liberado se vuelve a capturar utilizando el transportador serotonérgico (SERT) (6). La 5-HT recapturada vuelve a las vesículas por la MAO-A (7), se degrada a 5-HIAA (7). (Traducido de David y Gardier, 2016).

2. 1. 3. Anatomía del Bulbo olfatorio

El BO es una importante estructura de inervación serotoninérgica (Huang et al., 2017; McLean y Shipley, 1987; Steinfeld et al., 2015). Para los roedores, el olfato es la principal fuente de información sensorial y regula los comportamientos sociales (Steinfeld et al., 2015). Existen dos estructuras funcionales en el BO, el bulbo olfatorio principal (BOP) y el bulbo olfatorio accesorio (BOA). El BOP recibe toda la información odorífera y el BOA recibe información feromonal, o sea, la información que permite la interacción social (Cansler, 2017; Dulac y Torello, 2003). Los roedores macho marcan a través de la orina su territorio. La orina contiene las proteínas urinarias principales que activan los quimiorreceptores para las feromonas de las neuronas sensoriales del órgano vomeronasal que envían sus axones al BOA (Chamero et al., 2007). Por lo tanto, para el residente, el BO es el primer núcleo para evaluar la calidad del oponente.

El BO, a su vez, está organizado en 5 capas: la capa glomerular (CG), la capa plexiforme externa, la capa de células mitrales, la capa plexiforme interna y la capa de las células glomerulares. Las interneuronas presentes en estas capas están involucradas en funciones únicas (Fukunaga et al.; 2012; Linster y Fontanini, 2014). Se ha descrito una inervación serotoninérgica densa, particularmente en la CG (Crespo et al., 2013). Como el primer procesamiento complejo de señales olfativas ocurre en las CG, la neuromodulación serotoninérgica de esta capa tiene un efecto potencialmente importante sobre dichas funciones. Por ejemplo, la activación de los receptores 5-HT_{2C} en la CG puede excitar las interneuronas locales (Hardy et al., 2005; Petzold et al., 2009) inhibiendo, a su vez, las terminales nerviosas olfativas, lo que indica que las entradas serotoninérgicas en el CG pueden tener efecto sobre las señales olfativas de entrada del roedor (Petzold et al., 2009).

Los estudios de rastreo retrógrado muestran que tanto el DR como el MR proporcionan entradas serotoninérgicas al BO. En las neuronas de salida primaria del BOP y BOA, las células mitrales pueden responder a 5-HT a través de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{1A/B}, respectivamente. La activación de 5-HT_{2A} (receptores acoplados a G_q/G₁₁) provoca la excitación directa de las células

mitrales en el BOP, mientras que la activación de 5-HT_{1A/B} (receptores acoplados a G_o/G_i) inhibe a las células mitrales en el BOA. La misma subclase de receptor serotoninérgico, 5-HT_{2C}, se encuentra en interneuronas en ambos sistemas, pero asociada a diferentes interneuronas: en el BOP células periglomerulares de axón corto y en el BOA células glomerulares. Existen, por tanto, diversos tipos de circuitos que podría coordinar los comportamientos de interacción social en el BO, entre ellos el agresivo, en respuesta a la disponibilidad de 5-HT (Huang et al., 2017; Petzold et al., 2009).

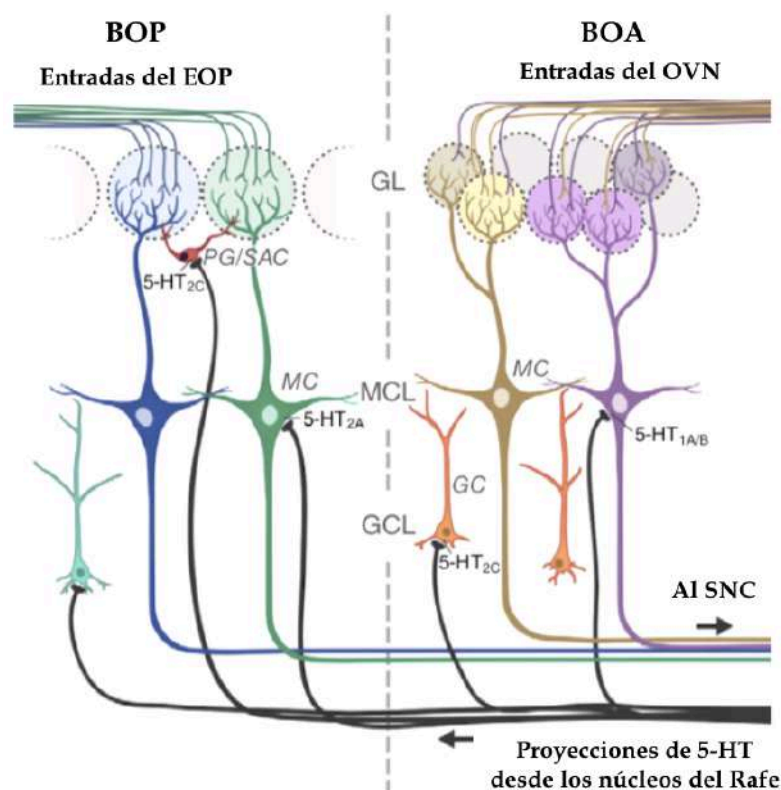


Figura 1. 5. Representación del BO y las proyecciones serotoninérgicas provenientes del rafe hacia el BOP y el BOA. En el dibujo: BOP (bulbo olfativo principal), EOP (epitelio olfativo principal), BOA (bulbo olfatorio accesorio), OVN (órgano vomeronasal), GL (capa glomerular), MCL (capa celular mitral), GCL (capa de células granulares), PG / SAC (células periglomerulares / axón corto), GC (célula glomerular). (Modificado de Huang, Thiebaud y Fadool; 2017).

2. 3. Hipótesis de la deficiencia serotoninérgica en la conducta agresiva

Clásicamente, se pensaba que los aumentos en 5-HT podían inhibir comportamientos agresivos. Esta relación inversa entre 5-HT y la agresión se ha

acuñado como la **"hipótesis de la deficiencia de 5-HT"** de la conducta de agresión. Esta hipótesis se basó en investigaciones que encontraron niveles reducidos de 5-HIAA en el LCR de personas excesivamente agresivas y violentas (Berman, 1997). La evidencia inicial en humanos, que relacionaba la agresión con la 5-HT, se originó en infantes de marina estadounidenses con antecedentes de comportamiento agresivo repetido (Brown et al., 1979).

En animales, la relación inversa entre los niveles bajos de 5-HT y el aumento de la agresión también se ha confirmado (Kohlert et al., 2012; Mongillo et al., 2014). La hipótesis, en modelos animales de agresión territorial, surge de estudios realizados en roedores, en los cuales la concentración de 5-HT a nivel cerebral se disminuye a través de sustancias neurotóxicas, como el 5,7-dihidroxitriptamina (Vergnes et al., 1988). Otros estudios en modelos de roedores aislados, han manifestado que la 5-HT podría tener una acción inhibitoria sobre el comportamiento agresivo. Estos resultados mostraron que los ratones agresivos aislados tenían un recambio más bajo de 5-HT y 5-HIAA en el cerebro, en comparación con roedores control alojados en grupo (Giacalone et al., 1968).

Estos resultados en conjunto, han conducido a la estrategia farmacológica para tratar a paciente que presentan rasgos agresivos, nivelando la concentración 5-HT con administración de inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS) o de agonistas serotoninérgicos (Butler et al., 2010; Coccaro et al., 1997; Manchia et al, 2017; Vartiainen et al., 1995). No obstante, al dirigir el foco hacia los modelos animales de agresión excesiva, que emulan la agresión patológica en humanos, nivelar la 5-HT no es suficiente por sí sola para ajustar las respuestas de estos comportamientos (Haller, 2014).

2. 3. 1. Modelo de agresión por disminución de la concentración de 5-HT

Los modelos animales de agresión son variados. Se generan a partir de aislamiento de los residentes, paradigmas de aprendizaje, administraciones de neurotóxicos en núcleos de producción monoaminérgicos o depleción farmacológica de monoaminas (Miczek et al. 2013). Específicamente, los modelos que se dirigen a generar agresión por manipulación del sistema serotoninérgico son

tres: neurotóxicos (por 5,7-dihidroxitriptamina) (Vergnes et al., 1988); quirúrgicos (por remoción del BO) (Kolunie Stern; 1995); o farmacológicos. Los dos primeros son irreversibles. En particular, en los estudios preclínicos, se ha utilizado una estrategia farmacológica para reducir las concentraciones de 5-HT por 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA o “éxtasis”; en dosis altas y en condiciones de temperatura ambiente adecuadas), para-Cloroanfetamina o para-Clorofenilalanina (pCPA). Esta última, pCPA, es un inhibidor enzimático irreversible de las 2 isoformas de TPH y se ha utilizado para reducir las concentraciones de 5-HT en el encéfalo (Hritcu et al., 2007; Jéquier et al., 1967; Koe y Weissman, 1966). La reducción máxima en la concentración es dos o tres días posterior a la administración de pCPA. A su vez, la reducción en la concentración es significativa aproximadamente por dos semanas (Jéquier et al., 1967; Vergnes et al., 1986). Desde la óptica conductual, la inhibición de TPH que produce disminución de 5-HT facilita y/o promueve niveles intensificados del comportamiento agresivo ofensivo en roedores, pero no defensivo en la prueba RI (Vergnes et al., 1986; Keele, 2001). A diferencia de otros modelos, es un proceso reversible y los niveles de 5-HT en el encéfalo se recuperan aproximadamente dos semanas después de la administración de pCPA (Vergnes et al., 1986).

2. 4. Sistema GABAérgico

El ácido γ -aminobutírico (GABA) junto con la glicina son los principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso central (SNC). Las neuronas productoras de GABA se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro y cumplen funciones como interneuronas formando circuitos locales. De esta forma, pueden modular la actividad de otros sistemas neuronales, ya sean excitatorios o inhibitorios. En el sistema GABAérgico se han descrito tres tipos de receptores: GABA_A, GABA_C (ionotrópicos) y GABA_B (metabotrópico). De éstos, GABA_A es un canal iónico de Cl⁻ dependiente de ligando. La unión de GABA a dicho receptor, en neuronas de individuos adultos, induce un potencial postsináptico inhibitorio que hiperpolariza la membrana circundante (Chisari et al., 2010).

La participación de GABA_A en el comportamiento agresivo tiene un antecedente por demás establecido (Mandel et al., 1981; Schwartz et al., 2009; Toth et al., 2012). Asimismo, el papel de GABA_A adquiere valor si se tiene en cuenta el rol modulador del receptor en los circuitos de neurotransmisión que subyacen a la conducta agresiva. Diversos estudios (Miczek et al., 2003; Puglisi-Allegra et al., 1981) muestran que existe una variedad de efectos sobre los comportamientos agresivos. Los efectos van desde la inhibición hasta la agresión desadaptativa o patológica, al agonizar o modular alostéricamente y positivamente al receptor GABA_A. Estos resultados son dependientes de la dosis o la estructura cerebral activada. Los moduladores y agonistas alostéricos positivos, como las benzodiazepinas, el alcohol, los barbitúricos y los esteroides neuroactivos, mejoran la respuesta inhibitoria del receptor GABA_A.

En las intervenciones clínicas, los moduladores y agonistas positivos de tipo GABA_A se han administrado para el tratamiento de la ansiedad, las convulsiones, la tensión muscular y los trastornos del sueño (Albrecht et al., 2014; Schüle et al., 2014). Sin embargo, se reportan efectos paradójicos. Por ejemplo, la administración aguda de benzodiazepinas puede aumentar la agresión en pacientes humanos, dependiendo de la dosis, el contexto y la historia del individuo (Albrecht et al., 2014). Otro ejemplo es el etanol, que actúa como modulador alostérico positivo de los receptores GABA_A y es una de las sustancias con mayor influencia en la violencia y la agresión humana (Fish et al., 2001; Miczek et al., 2002, 2004). Probablemente, estos efectos paradójicos se deban a la gran diversidad funcional mediada por este receptor.

GABA_A es un receptor pentamérico que comprende una combinación de cinco subunidades (Mehta y Ticku, 1999; Wu y Sun; 2015). Hay siete familias principales de subunidades del receptor (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π), y algunas familias tienen más isoformas (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3}). Las propiedades farmacológicas varían, dependiendo de la subunidad (Mehta y Ticku, 1999; Reddy; 2018; Wu y Sun; 2015). De la combinación de estas subunidades y las isoformas, surge una división funcional de los receptores GABA_A: sinápticos (fásicos) y extrasinápticos (tónicos). Mientras que los receptores sinápticos tienen una conformación $\alpha_{1;2;3;6}$, β , γ ; los extrasinápticos tienen una $\alpha_{4;5}$, β , δ (Locci y Pinna, 2017; Reddy, 2018). Las

benzodiazepinas, por ejemplo, se unen al sitio específico formado por las subunidades α y γ . Los receptores con las isoformas $\alpha_{1;2;3;5}$ son sensibles a benzodiazepinas, aunque los que contienen las isoformas α_4 y 6 no lo son. Curiosamente, los esteroides neuroactivos, afines a todas las posibles conformaciones del receptor $GABA_A$, exhiben una particular afinidad por los receptores $GABA_A$ con la subunidad δ presente en los receptores $GABA_A$ extrasinápticos, (Brown et al., 2002; Carver y Reddy, 2013; 2018; Meera et al., 2011; Stell et al., 2003) y, al parecer, tienen una función moduladora en la hiperpolarización presináptica y postsináptica (Carver y Reddy, 2013; Hosie et al., 2007).

En el 2006, Pinna et al. reportaron que 4 semanas de aislamiento en ratones macho, reducía las expresiones de las isoformas α_1 en el receptor $GABA_A$, comparado con machos alojados en grupos. En estos mismos sujetos se observó un aumento en los niveles ARNm que codifican las subunidades α_4 y 5 . Más de 4 semanas de aislamiento inducen un mayor grado de agresión en la mayoría de los ratones macho, ratas macho y hamsters hembra (Simler et al., 1983; Toth et al., 2012; Wise, 1974). Asimismo, los animales aislados mostraron una sensibilidad reducida a los moduladores alostéricos positivos del receptor $GABA_A$, como barbitúricos, esteroides neuroactivos y benzodiazepinas (Matsumoto et al., 2007; Pinna et al., 2004). Se ha postulado que la disminución en la función del receptor $GABA_A$ causada por el aislamiento, posiblemente, es el resultado de niveles reducidos de moduladores endógenos más potentes del receptor $GABA_A$: tal es el caso de allopregnanolona (Allo) y tetrahydrodeoxicorticosterona (3α , 5α -THDOC) (Belelli y Lambert, 2005; Nelson y Pinna, 2011; Pinna et al., 2008; Reddy, et al. 2018). Por otro lado, las benzodiazepinas y otros esteroides neuroactivos aumentan tanto la agresión entre machos, como la agresión materna en ratones y ratas (Gourley et al., 2005; Fish et al., 2014; Mos y Olivier, 1989). Es importante mencionar que, en otro estudio, Pinna et al., 2003 mostraron que el tratamiento con fluoxetina, un ISRS, evitó la disminución del nivel de Allo y redujo el comportamiento agresivo en ratones. Todo esto junto, permite pensar que la baja regulación de los receptores $GABA_A$ puede deberse a la concentración variable de

los NS (Reddy et al. 2018), ello podría estar implicado en un aumento o disminución en la escalada de la agresión.

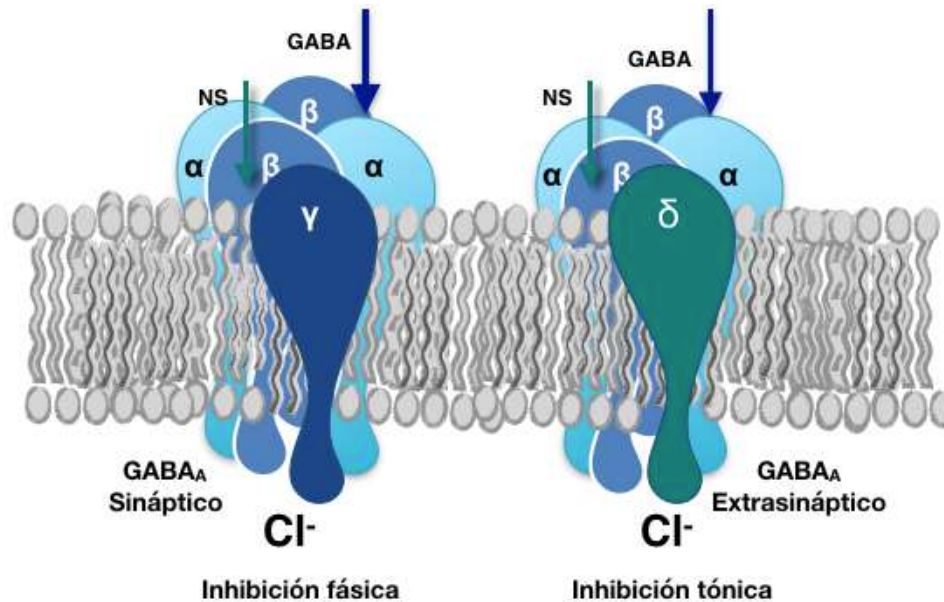


Figura 1.6. Esquematación del receptor GABA_A sináptico y extrasináptico. El receptor GABA_A es una proteína integral de membrana pentamérica compuesta de 2α, 2β, 1γ o δ de un conjunto de muchas isoformas. GABA se une en la hendidura entre α, β para permitir la corriente Cl⁻. Una variedad de neuromoduladores, incluidos los esteroides endógenos, entre otros Allo, se unen a sitios únicos en el receptor para aumentar la corriente activada por GABA. (Adaptado de Reddy, 2018).

2. 4. 1. Inervación GABAérgica en el BO

En el BO, las células periglomerulares y glomerulares usan GABA como neurotransmisor inhibitorio a través de sinapsis recíprocas con las células mitrales, que son sus neuronas de salida de segundo orden (Duchamp-Viret et al., 2000; Shao, Z et al., 2019). Variaciones en la concentración de GABA en el BO se asocian constantemente con cambios en la agresión. Las administraciones locales en el BO de GABA, en machos intactos, con una concentración endógena espontáneamente baja de GABA, suprimieron el comportamiento muricida de las ratas (Mandel et al., 1979). Del mismo modo, las inyecciones de agonistas (muscimol e isoguvacina) de GABA o la inhibición de la enzima glutamato descarboxilasa redujeron el comportamiento agresivo (Mandel et al., 1983).

Las manipulaciones farmacológicas no son la única forma de modificar la actividad GABAérgica en el BO y su relación con la agresión. El aislamiento social reduce la actividad de glutamato descarboxilasa y el contenido de GABA en el BO (Simler et al, 1983), y se asocia con un aumento de la agresión (Siegfried et al., 1981). El BO reciben inervación serotoninérgica y proyecta hacia el sistema límbico, más específicamente al hipocampo. Estas proyecciones diferenciales, desde el BO hacia el hipocampo, desempeñan un papel importantísimo en el reconocimiento olfativo (Lockmann et al., 2018). El sistema olfativo construye mapas de información sobre sustancias olfativas en el espacio neural. Las imágenes moleculares que llegan a niveles más altos en el cerebro tienen que compararse con las que ya están grabadas en la memoria. Esta comparación conduce a un reconocimiento de la entrada olfativa, como un olor que proviene de un extraño, lo que representa un peligro potencial que luego provoca un ataque. El hipocampo actúa como un comparador entre la imagen olfativa entrante de las señales olfativas percibidas y las acumuladas en la memoria (Lockmann et al., 2018). La capacidad de desencadenar un ataque se debe, en parte, a la eficiencia de la primera estructura que activa la vía de reconocimiento: el BO. Esta vinculación no deja de lado que la activación hipocampal pueda producir cambios en la corteza prefrontal (CPF), implicada en la regulación de los comportamientos agresivos y la desinhibición conductual, a través de la regulación glutamatérgica, serotoninérgica y GABAérgica (Sun et al., 2019).

3. Neuroesteroides

Las investigaciones de Hans Selye, en la década de 1940, demostraron los efectos de las hormonas sobre el SNC. Durante más de 40 años, se sostuvo que las glándulas gonadales, adrenales y placenta son las únicas capaces de producir hormonas esteroideas y que su actividad afectaba al SNC. En la década de los ochenta, los aportes y descubrimientos de Baulieu y sus colaboradores demostraron que las concentraciones de algunos esteroides son mayores en cerebro que en plasma y que los mismos se mantienen intactos luego de la ovariectomía y la adrenalectomía (Baulieu, 1991). Las variaciones de estos, a nivel

cerebral, no responden a los niveles de las hormonas esteroideas circulantes en plasma (Baulieu, 1991; Corpéchet et al., 1985; Maninger et al., 2009). Estos hallazgos llevaron a incluir a dichas moléculas en una nueva categoría dentro de las hormonas esteroideas denominadas neuroesteroides (NS). Esta nueva categoría incluye a todos los esteroides neuroactivos que son sintetizados *de novo* en el tejido nervioso, tanto a nivel del SNC como en el sistema nervioso periférico. Es importante realizar una aclaración conceptual en relación a dos conceptos que se usan con frecuencia de forma indistinta, NS y esteroide neuroactivo. Como menciona Robel y Baulieu (2014), el término neuroesteroide "se aplica a aquellos esteroides que se sintetizan en el sistema nervioso, ya sea *de novo* a partir del colesterol o de precursores de hormonas esteroideas como la progesterona que se acumulan en el sistema nervioso". Ahora bien, el concepto esteroide neuroactivo, acuñado por Paul y Purdy (1992), refiere a "cualquier esteroide natural o sintético que cambie rápidamente la excitabilidad de las neuronas a través de mecanismos no genómicos" (citado en Paul et al., 2020).

Por otra parte, ya que los vertebrados no mamíferos como los peces, los anfibios y las aves también sintetizan NS (Diotel et al., 2011; Krentzel y Remage-Healey, 2015; London y Clayton, 2010; Schlinger y London, 2006; Tsutsui et al., 2006), se puede afirmar que la neuroesteroidogénesis es un fenómeno conservado en los vertebrados (Schlinger y Remage-Healey 2012). Por lo tanto, desde la evolución temprana de los vertebrados, los NS han podido actuar como neuromoduladores de los antepasados evolutivos (Pediaditakis et al., 2015).

Los NS y los esteroides neuroactivos han sido ampliamente estudiados durante las últimas cuatro décadas y entre sus principales funciones se encuentran: la proliferación, diferenciación, actividad y supervivencia de las células nerviosas; el control de numerosos procesos metabólicos y neuroendócrinos, tales como la ingesta de comida, la temperatura corporal, la presión sanguínea, la pubertad y la etapa reproductiva, y los procesos conductuales, como la actividad de locomoción, conducta sexual, ansiedad, aprendizaje y memoria, impulsividad y agresión, entre otros (Asensio, et al., 2018; Casas et al, 2011; Escudero et al., 2019; Sanchez et al., 2013).

Un gran número de investigaciones se han desarrollado con intención de explicar los variados mecanismos moduladores moleculares y celulares que subyacen a la acción de los NS y los esteroides neuroactivos. Estas han logrado aclarar sus mecanismos de acción sobre fenómenos fisiológicos, como la pubertad (Giuliani et al., 2011; 2013), o fenómenos patológicos, como la depresión (Schüle et al., 2014), enfermedad de Parkinson (Casas et al., 2011) y Alzheimer (Irwin et al. 2015; Wang et al., 2007).

3. 1. Biosíntesis de neuroesteroides en el encéfalo de mamíferos

El sistema nervioso expresa todas las enzimas necesarias para la biosíntesis de esteroides. La síntesis *de novo* de los NS es llevada a cabo, tanto por las neuronas (Gottfried-Blackmore et al., 2008; Zorumski et al., 2019), como por las neuroglías (Gottfried-Blackmore et al., 2008; Saijo y Glass, 2011). Los astrocitos producen pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, testosterona, estradiol y estrona (Zwain y Yen, 1999). Los oligodendrocitos sintetizan pregnenolona, progesterona y androstenediona (Gago et al., 2001; Zwain y Yen, 1999). La microglía puede metabolizar los andrógenos y los estrógenos y convertir la DHEA en 5-androstene-3 beta, 17 beta-diol, pero carece de las enzimas para la síntesis de progesterona y DHEA (Gottfried-Blackmore et al., 2008; Saijo y Glass, 2011). Las neuronas pueden producir pregnenolona, DHEA, androstenediona y estrógenos (Zwain y Yen, 1999). Es importante destacar que la capacidad esteroidogénica de estos tipos de células, se ha examinado principalmente en células purificadas o *in vitro* en cultivos celulares (Gottfried-Blackmore et al., 2008; Zwain y Yen, 1999). A su vez, se han descrito y localizado las enzimas que participan en la síntesis de NS en distintas regiones cerebrales (Agís-Balboa et al., 2006).

La producción de NS (Figura 1. 7) comienza a partir del colesterol. El colesterol es transferido a las mitocondrias y requiere de la acción limitante de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) y transportadores de 18 kDa (TSPO) de producción de esteroides (Rone et al., 2009). El colesterol proviene de fuentes periféricas y es ingresado en la célula a través del receptor periférico

tipo benzodiazepinas, o bien de la lipoproteína de baja densidad (“low density lipoprotein”, LDL) en las células del sistema nervioso (Compagnone y Mellon, 2000).

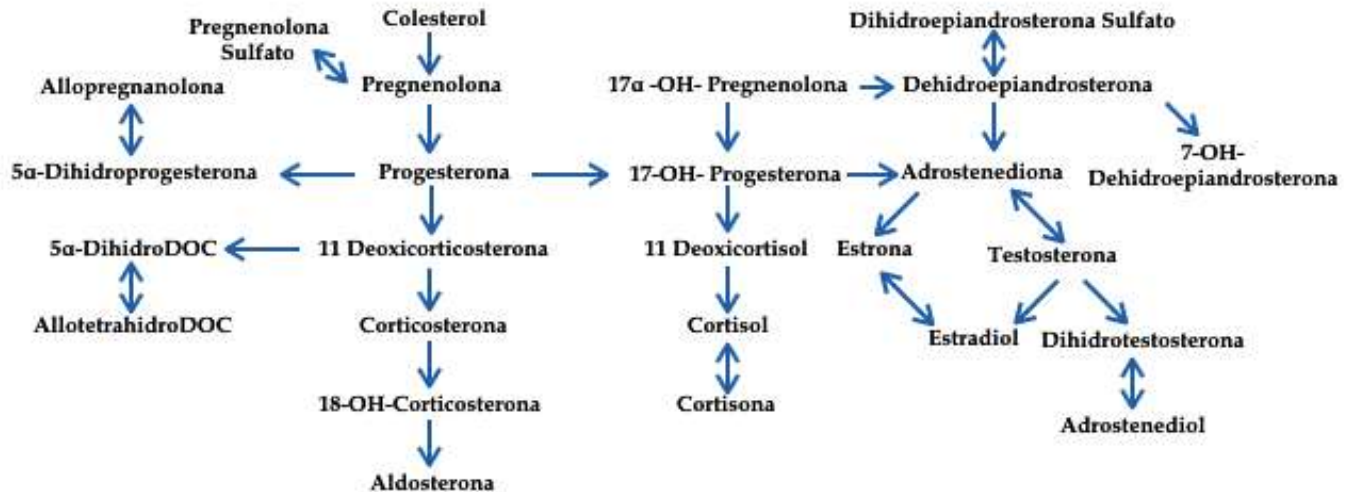


Figura 1. 7. Esquema de la biosíntesis de los neuroesteroides en el encéfalo de vertebrados. (Adaptado de Escudero, 2014).

3. 2. Allopregnanolona

Allo es el principal metabolito activo de progesterona y es uno de los NS más ampliamente estudiados (Figura 1. 8). En el año 2019, el análogo sintético de Allo, brexanolona, fue aprobada por la *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para el tratamiento de depresión posparto, bajo el nombre comercial Zulresso™ (Paul et al., 2020; Powell et al., 2020).

Muchos trabajos involucran a Allo con diferentes procesos fisiológicos y adaptativos. Es sabido que Allo ejerce un efecto ansiolítico y que media su acción por la unión alostérica con el receptor GABA_A, en donde demuestra ser 20-200 veces más potente que las benzodiazepinas (Weir et al., 2004; Powell et al., 2020). Se ha demostrado que la acción de Allo sobre este receptor cumple un importante rol en los mecanismos de acción de ciertos antipsicóticos (Ugale et al., 2004). Además, Allo posee un efecto neuroprotector y neuroregenerador sobre diferentes

patologías (Wang et al., 2007). Por otra parte, Allo influye sobre una amplia gama de comportamientos: sexual, social, afectivo y cognitivo (Frye et al., 2008 y 2011). Por ejemplo, para que se produzca un apareamiento exitoso, se deben atenuar los comportamientos agresivos y defensivos que normalmente exhiben las roedores hembra hacia los roedores macho. La frecuencia de los comportamientos agresivos mostrados por las ratas en proestro, que tienen concentraciones de Allo endógena altas en el área tegmental ventral del cerebro medio, disminuye comparada a ratas en diestro (Frye, 2006). Además, como otros compuestos que ejercen efectos agonistas en los receptores GABA_A, tiene efectos bifásicos en los comportamientos agresivos. El aislamiento social por más de 30 días reduce drásticamente los niveles de Allo y aumenta el comportamiento agresivo de los ratones aislados hacia un intruso en su jaula doméstica (Matsumoto et al., 2007). La fluoxetina revierte la disminución de la concentración de Allo y, en consecuencia, se normalizan las interacciones sociales (Pinna et al., 2003).

Otros experimentos vinculan aún más la agresión en los roedores macho con Allo. La administración i.p. de Allo, en dosis moderadas, aumenta la agresión fuera de los niveles adaptativos de la especie (Fish et al., 2001). Sin embargo, altas concentraciones de Allo disminuyen el comportamiento agresivo y producen sedación de ratones (Miczek et al., 2003). El mecanismo por el cual Allo ejerce sus acciones en distintos comportamientos agresivos, aún se desconoce.

3. 2. 1. Biosíntesis de Allopregnanolona en el encéfalo de mamíferos

Allo es sintetizada a partir de la 5 α -dihidroprogesterona (5 α -DHP), catolizada por la enzima 3 α -hidroxiesteroide óxido reductasa (3 α -HSOR). La 3 α -HOR es una enzima microsomal de la familia de las aldo-keto-reductasas que cataliza la reacción reversible de la 5 α -DHP a Allo. Esta enzima, se codificó por múltiples ADNc que generan 4 isoformas funcionales conocidas hasta el momento en humanos (Penning et al., 2003), mientras que en rata sólo se conoce una isoforma (Pawlowski et al., 1991). En los mamíferos, la presencia de ARNm y/o proteína de 3 α -HOR se ha descrito en varias regiones del cerebro. Las principales

enzimas necesarias para la síntesis de Allo están presentes en células nerviosas y de la glía en diferentes estructuras cerebrales (Cook et al., 2014; Yilmaz et al., 2019).

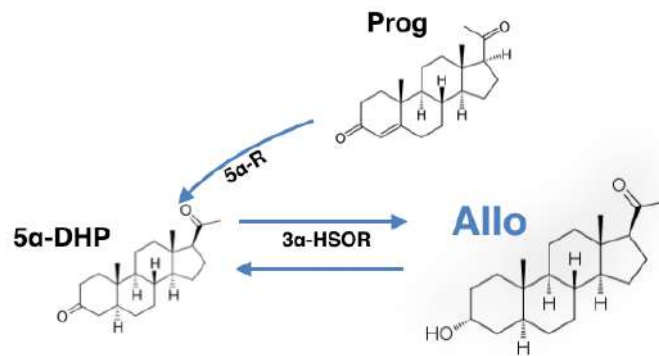


Figura 1. 8. Biosíntesis de Allo a partir de progesterona. Prog: progesterona; 5α-R: 5α-reductasa; 5α- DHP: 5α-dihidroprogesterona; 3α-HSOR: 3α-hidroxiesteroide óxido reductasa. (Modificado de Escudero, 2014).

3. 2. 2. Allopregnanolona y Sistema Serotoninérgico

En distintos estudios (Devall et al., 2015; Pinna et al., 2009; Serra et al., 2001), se ha demostrado la acción de los esteroides neuroactivos sobre el sistema serotoninérgico. Entre los efectos conocidos, Allo ejerce efectos antagónicos sobre el receptor 5-HT₃ (McKenzie-Quirk et al., 2005; Wetzell et al., 1998). Por otra parte, en pacientes con trastornos por estrés posttraumático, las bajas concentraciones de Allo en LCR, luego del tratamiento con ISRS, han mostrado aumentos y mejoras en el trastorno. El tratamiento con ISRS también ha mostrado disminuir la respuesta al miedo y la agresión, luego de aumentar la concentración de Allo (Pinna et al., 2009).

3. 2. 3. Allopregnanolona y Sistema GABAérgico

Uno de los receptores más ampliamente estudiados en relación a Allo es el receptor GABA_A. Allo, ejerce acciones alostéricas positivas sobre el receptor GABA_A. Como se expresó anteriormente, este receptor tiene una amplia distribución en el encéfalo y una variada expresión de subunidades que lo

conforman. Varios estudios (Carver y Reddy, 2016; Spigelman et al., 2003) muestran que la exposición crónica a esteroides neuroactivos, como Allo, da como resultado una estructura alterada del receptor GABA_A, que en algunos casos se asocia con cambios en la expresión de las subunidades (Carver et al., 2014) y estos podrían ejercer efectos sobre la conducta. El aumento de la expresión del receptor extrasináptico GABA_A mejora la sensibilidad de los NS al aumentar aún más la corriente tónica (Carver et al., 2014; Wu et al.; 2013). Por el contrario, la expresión deficiente del receptor extrasináptico GABA_A reduce la sensibilidad a los NS o esteroides neurooativos (Carver y Reddy, 2016; Spigelman et al., 2003). La literatura (Carver y Reddy, 2016) propone al hipocampo como un núcleo de expresión de ARNm en el encéfalo de la subunidad δ . Esta expresión tiene diversas funciones sobre la memoria y el aprendizaje. La otra estructura que presenta características similares a las del hipocampo, en un encéfalo adulto, es el BO. En nuestro laboratorio, hemos demostrado la acción moduladora de Allo en el hipocampo (Escudero et al., 2012; 2019). Sin embargo, no existe evidencia que vincule la acción de los esteroides neuroactivos en el BO. En el 2014, Cook et al. demostraron que las enzimas regulatorias de la neuroesteroidogénesis se encontraban presentes en las neuronas del hipocampo, la corteza y el BO y que cumplían funciones asociadas a la memoria y aprendizaje y las conductas sociales.

4. Objetivo General

Estudiar la participación del neuroesteroide Allopregnanolona, como un factor modulador de las interacciones neuronales serotoninérgicas y GABAérgicas relacionadas con la agresividad en ratas macho.

4. 1. Objetivos Específicos

4. 1. 1. Validar el modelo de agresión en ratas macho Sprague Dawley

- a. Evaluar los patrones de agresividad en ratas macho en el test RI, posterior a la inhibición de la enzima TPH por pCPA.

- b. Evaluar y correlacionar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO con la conducta agresiva.
- c. Determinar la expresión del ARNm de TPH2 en el BO, posterior a la administración del inhibidor enzimático pCPA.

4. 1. 2. Evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y génicos de Allo

- a. Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de Allo.
- b. Evaluar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO, posterior a la administración de Allo.
- c. Determinar la expresión del ARNm de TPH2; GABA_{Aα1} y GABA_{Aδ} en el BO, posterior a la administración de Allo.

4. 1. 3. Evaluar los efectos de Allo sobre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y Serotoninérgico

- a. Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de un antagonista y un agonista específicos de GABA_A y 5-HT

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

1. Consideraciones Éticas

Todos los protocolos experimentales con animales fueron previamente aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, bajo el **Aval 82/2016** (Anexo N°1).

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas (*Rattus Norvegicus*) macho de la cepa Sprague Dawley, separados en residentes (60–80 días; 390–450 g) e intrusos (50–55 días; 290–310 g), nacidas y criadas en el bioterio central IMBECU (Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo). Las mismas se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura (22 ± 2 °C). La luz se mantuvo y controló (150–200 lx), en ciclos de 12 h luz /12 h oscuridad (de 7,00 a.m. a 7,00 p.m.). Los animales se alimentaron con comida para ratas (GEPISA, Córdoba, Argentina) y agua potable, ambas con libre acceso.

3. Drogas

Las drogas utilizadas fueron: pCPA metilo clorhidrato de éster, Allo, 5-HT, bicuculina (Bic) (SIGMA, St. Louis, MO, EE. UU.); Penicilina G benzatina (Richet, Arg.); Ketamina HCL (Holliday-Scott S.A, Bs. As., Arg.) y Xylazina (Laboratorios Köning, Bs. As., Arg.).

El clorhidrato de éster metílico de pCPA se disolvió en solución salina a pH 6,5; a una concentración de 300 mg/kg (Jéquier et al.,1967).

Allo se disolvió inicialmente en propilenglicol a una concentración de 600 µM. La dosis de Allo utilizada en los experimentos, 6 µM, se obtuvo por dilución sucesiva en solución salina estéril. La concentración de 6 µM de Allo se eligió en

un rango farmacológico, siguiendo hallazgos previos de nuestro laboratorio (Escudero et al., 2012; 2019). A su vez, concentraciones similares de Allo (5 μ M) han sido reportadas por su acción inhibitoria en actividad neuronal GABAérgica en el núcleo dorsal del rafe, por la activación del receptor GABA_A (Kaura et al., 2007).

La concentración elegida para 5-HT fue de 1 nM (Krstić y Djurković 1981; Meneses, 2007). La concentración elegida para Bic fue de 4,9 μ M (Cáceres et al., 2020). Estas drogas (5-HT y Bic), al igual que Allo, fueron disueltas en solución salina estéril con 1% de propilenglicol hasta la concentración indicada (Escudero et al., 2019).

Todas las drogas vehiculizadas en el tercer ventrículo (Allo, 5-HT, Bic) se inyectaron en un volumen final de 1 μ l. (Cáceres et al., 2020)

La penicilina G benzatínica (im) se disolvió a 1.200.000 UI (0,6 μ g; 72 mg/rata) (Asensio et al., 2018; Cáceres et al., 2020).

La solución salina estéril (Rivero y Cía. Bs. As., Arg.) fue utilizada como vehículo en los grupos control. (Nishida et al., 2020)

Los reactivos específicos que se utilizaron en cada técnica son descriptos en los puntos donde se desarrollan las mismas.

4. Procedimientos Experimentales Generales

4. 1. Inhibición de la enzima TPH por pCPA

Los animales experimentales residentes (60–80 días; 390–450g), elegidos al azar, recibieron una sola administración i.p. de 300 mg/kg de pCPA (Jéquier et al., 1967; Vergnes et al., 1986; Stokes et al., 2000) entre 3,00 p.m. y 6,00 p.m., tres y seis días previos al test conductual y la eutanasia.

4. 2. Procedimiento quirúrgico: Implantación de cánula en el tercer ventrículo cerebral

Los animales experimentales residentes (60–80 días; 390–450 g) fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos. Los animales fueron anestesiados con

una combinación de Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg), mezcladas en una misma jeringa de 1 ml (Asensio et al., 2018). La confirmación del plano anestésico se evaluó por la pérdida del reflejo postural, palpebro-palpebral, córneo-palpebral, reflejo podal y falta de respuesta ante el pellizco de la cola. Posteriormente, fueron colocados en un estereotáxico (David Kopf, EE. UU.) para el procedimiento quirúrgico. Con la finalidad de prevenir la hipotermia, el procedimiento se realizó con el animal cubierto con una manta, durante la recuperación del plano anestésico se cubrió al animal con la misma manta. Para prevenir daño ocular durante el procedimiento, se añadió una gasa de algodón sobre los ojos del animal.

Las cánulas guías fueron realizadas de acero inoxidable (13.5 mm × 0,80mm × 38 mm). Se implantaron sobre la región del tercer ventrículo cerebral, de acuerdo con las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2008): AP: 0.00 (Bregma); L: Línea media; inclinación de la barra dental: +5°; DV: 9 mm (la Figura 2. 2. muestra la sección donde se colocó la cánula guía, de acuerdo a la inclinación de la barra dental del estereotáxico), y se fijaron al cráneo con cemento dental y un tornillo de acero inoxidable. Con la finalidad de minimizar los daños de áreas circundantes, la cánula guía fue implantada, de acuerdo a coordenadas, 1,5 mm por encima del tercer ventrículo cerebral. Este procedimiento ofreció mayor eficacia para la correcta administración de las diferentes drogas.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico, las cánulas fueron taponadas con un alambre de acero inoxidable para evitar la obstrucción. En ese momento y para evitar posibles infecciones, todos los animales recibieron inyección subcutánea de penicilina G benzatínica (im) de 1.200.000 UI (Asensio et al., 2018; Cáceres et al., 2020). Posteriormente, se colocó a cada animal en una caja individual con cama de viruta de pino sobre una almohadilla de papel tisú, con alimento y agua a su disposición hasta el momento en que se constató la recuperación del plano anestésico (se esperó hasta que el animal mostrara movimientos voluntarios coordinados).

Para proceder a la devolución de los animales al bioterio, se los colocó en grupos de tres animales por caja y se esperó seis días para realizar los procedimientos experimentales.

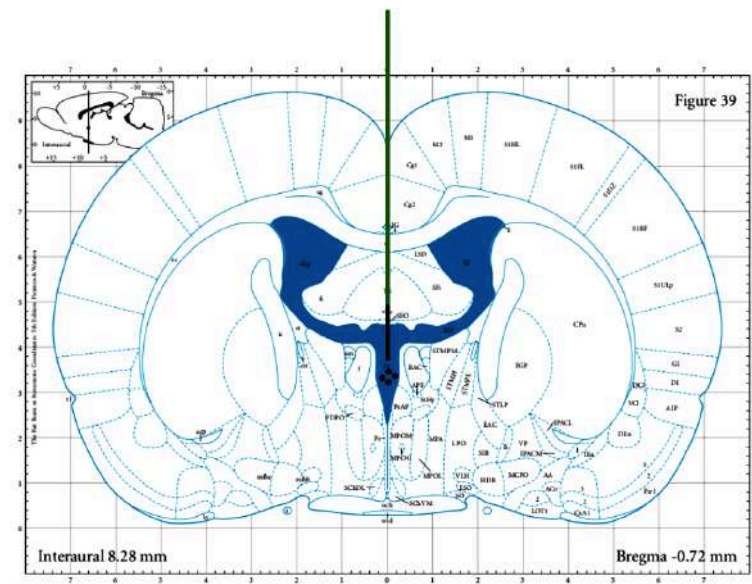


Figura 2. 2. Representación esquemática de una sección coronal del cerebro de rata. Se muestran, pintado en azul, las áreas del tercer ventrículo y ventrículos laterales del cerebro. La línea verde esquematiza la cánula guía, la línea negra la aguja de inyección en el tercer ventrículo, donde se inyectaron las drogas. (Modificado de Paxinos y Watson, 2008).

4. 3. Administración de las drogas experimentales en el tercer ventrículo

Los animales residentes (60–80 días; 390–450 g) recibieron la administración de drogas experimentales en el tercer ventrículo cerebral. Se realizó con una aguja de inyección de 15 mm, de acero inoxidable, previamente esterilizada. Dicha aguja avanzó los 1,5 mm restantes para llegar al interior del ventrículo cerebral (ver Figura 2. 2). El flujo de administración fue de 0, 25 μ l/min (Asensio et al., 2018).

4. 4. Test residente versus intruso

Para evaluar las conductas agresivas, se utilizó la prueba RI de 15 minutos (min) (900 s). El test fue realizado de acuerdo a Koolhaas et al. (2013); con modificaciones. El test se basó en la interacción de dos sujetos: el animal experimental, denominado residente, y el animal de interacción, denominado intruso. Los animales que fueron utilizados como residentes tenían entre 60-80 días de edad, los intrusos entre 50-55 días de edad. Se tuvo particular cuidado al

constatar la diferencia de peso entre los residentes y los intrusos (15-20% menos). Los intrusos fueron alojados en grupos de tres sujetos por caja. Los residentes fueron aislados luego de la inyección de pCPA, para evitar agresiones previas y promover la territorialidad. A su vez, la viruta de la caja donde vivió el residente no se cambió y se utilizó para el día del test RI. La prueba tuvo una duración total de 15 min (900 s). A fin de evaluar las conductas definidas en la Tabla 2. 1., se dividió el tiempo total (900 s) en dos etapas. La primera etapa duró 5 min (300 s) y la segunda etapa 10 min (600 s).

En la primera etapa, el residente se situó solo en la caja de prueba con la viruta de su jaula. En la segunda etapa, se colocó al intruso para medir las conductas de interacción. Para poder situar al intruso en la caja de prueba, se constató la posición en la que se encontraba el residente luego de los 300 s, situando al intruso del lado opuesto.

La caja donde se realizaron las pruebas fue de madera, impermeabilizada con adhesivo de contacto incoloro. Las medidas de la caja para asegurar las interacciones fueron de 70 cm de largo, 50 cm de ancho y 40 cm de altura (modificado de Miczek et al., 2013) (ver Figura 2. 3). La caja de prueba fue limpiada después de evaluar a cada sujeto experimental, con etanol (% 10 v/v) (Casas et al., 2011). Todas las pruebas fueron filmadas con una cámara (Everio Gseries GZ-MG330 JVC). La cámara se ubicó a 190 cm del suelo, para poder filmar todo el campo de la caja de prueba. Solo se llevaron a cabo tres pruebas diarias, cómo máximo, entre las 3,00 p.m. y 6,00 p.m. (Corthell et al., 2013).

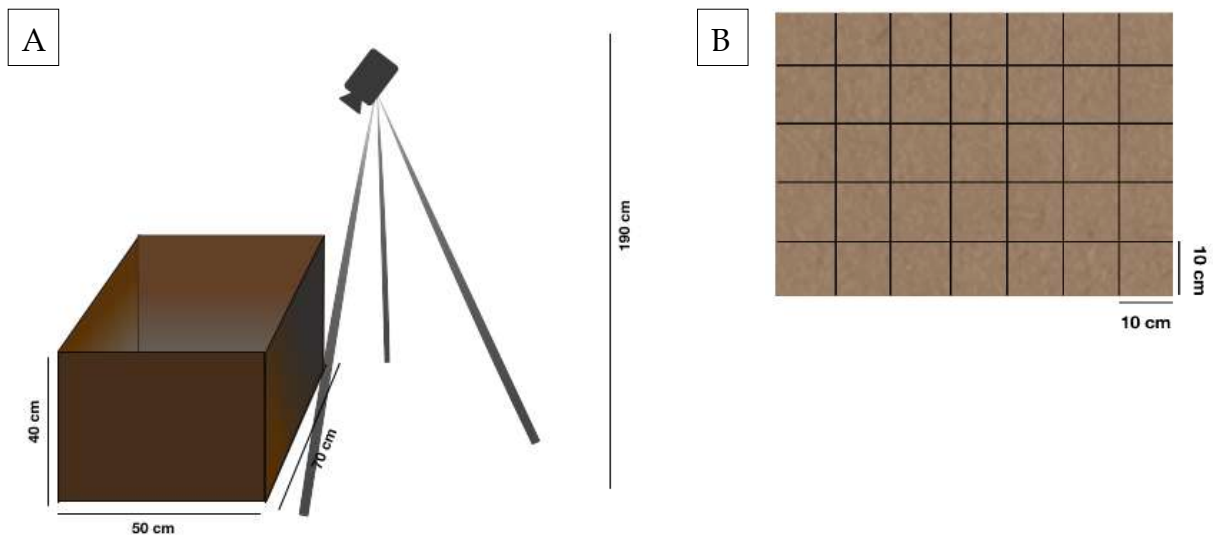


Figura 2. 3. **Representación esquemática de los elementos en la prueba RI.** A: Representa las dimensiones de la caja del test y la altura del trípode que sostiene la cámara filmadora. B: Representa las líneas guías trazadas en el interior para el análisis conductual.

4. 4. 1. Conductas evaluadas en el test RI.

Todas las conductas fueron evaluadas en el residente (Tabla 2. 1), en ciego y por observación de los videos obtenidos durante los test. La categorizas conductuales fueron se definieron a partir de Koolhaas et al. (2013) y Takahashi y Miczek, (2014). Las categorías de las conductas evaluadas fueron mutuamente excluyentes, es decir, cualquier comportamiento realizado por el animal residente fue incluido en una de las categorías y ningún comportamiento fue incluido en más de una de ellas (ej. pisada o ataque lateral). Se observaron detenidamente las conductas del intruso, a fin de revisar las conductas agresivas defensivas.

En la primera etapa se evaluó:

- a. Actividad locomotora (AL) [cm]: distancia total recorrida durante 300 s.

En la segunda etapa se evaluaron:

- a. Latencia de agresión (LAGR)[s]: tiempo de comienzo de conductas de baja agresión, alta agresión o agresión.
- b. Conductas sociales (CS)[s]: suma total del tiempo de acicalamiento social y olfateo ano-genital del residente al intruso.

- c. Conductas no sociales (CnS)[s]: suma total del tiempo de acicalamiento, olfateo y alzarse en dos patas.
- d. Baja agresión (BA) [n°]: frecuencia de pisadas, falsas montas y persecuciones.
- e. Alta agresión (AA) [n°]: frecuencia de ataque laterales, trabas de ataque y mordidas.
- f. Conductas de agresión (AGR) [s]: tiempo de pisadas, falsas montas, persecuciones, ataques laterales, trabas de ataque y mordidas.

Tabla 2. 1
Conductas Evaluadas en la prueba RI

Conducta	Definición
Acicalamiento	Limpiar la superficie del propio cuerpo mediante la acción de lamerse, frotarse y rascarse.
Alzarse en dos patas	Acción de erguirse y sostenerse con las patas traseras.
Olfateo	Presencia exclusiva de movimientos de cabeza, hocico y movimientos respiratorios acentuados.
Acicalamiento social	Limpiar la superficie del cuerpo del intruso mediante la acción de frotar con las patas delanteras.
Olfateo ano-genital	Olfatear al intruso en el ano o genitales en posición adyacente o perpendicular.
Pisadas	Acción de colocar cualquiera de las patas sobre el cuerpo o cabeza del intruso sin dejar que se mueva.
Falsas montas	Montar al intruso desde la parte posterior del lomo.
Persecuciones	Acción que inicia el residente al perseguir al intruso y se sigue por un escape del intruso.
Ataques laterales	Ataques a los flancos del cuerpo del intruso con el hocico.
Trabas de ataque	Ataques laterales al intruso que traban el cuerpo de ambos y dañan al intruso.
Mordidas	Acción de morder al intruso en el cuerpo.

Se definen cada una de las conductas que se evaluaron en la prueba RI sobre el residente durante los 600 s de interacción con el intruso.

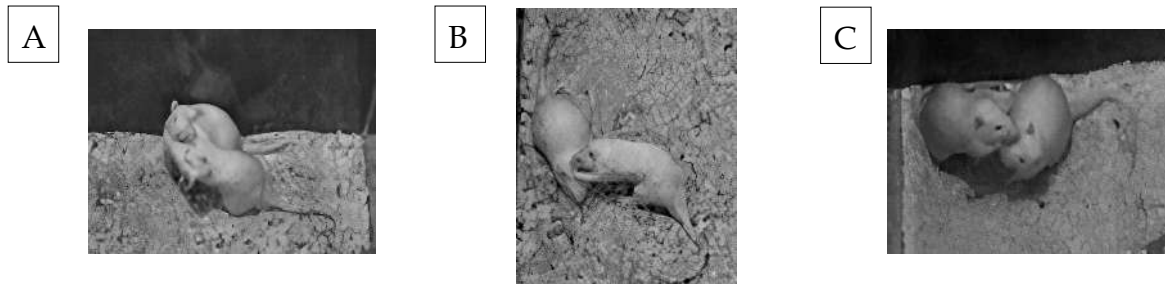


Figura 2. 4. **Fotografías extraídas del test RI.** Conductas agresivas. A: Mordida. B: Trabas de ataque. C: Ataque lateral.

4. 5. Eutanasia

Al finalizar los estudios comportamentales, los animales de los diferentes grupos fueron eutanasiados por decapitación. Luego de remover los encéfalos del cráneo con tijeras punta rombo, los mismos se diseccionaron a 4 °C. La obtención del BO fue con tijeras oftalmológicas. Se guardaron en tubos Eppendorf® de 1,5 ml y conservadas a -80 °C hasta el momento de su utilización. Un número de muestras fueron utilizadas para los ensayos neuroquímicos y otras para los ensayos genéticos.

4. 6. Localización del implante en el tercer ventrículo cerebral.

Para confirmar la ubicación de la cánula, en el área ventricular cerebral, se inyectó, a través de la misma, 1 µl de tinta azul. El sitio de la microinyección se constató utilizando una lente de aumento (Zeiss Alemania Occidental, 4X) por dos experimentadores que desconocían el tratamiento, para determinar la correcta colocación de las cánulas. La colocación correcta de las cánulas fue requisito excluyente para incluir a los animales en los experimentos aquí descritos. El examen del cerebro de 50 ratas canuladas reveló colocación incorrecta de las cánulas en dos animales (96% de los animales con la colocación correcta).

4. 7. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

De sus siglas en inglés, HPLC: High Performance Liquid Chromatography; es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. En nuestro proyecto, analizamos por medio de ella el catabolismo de 5-HT. Trabajamos con la determinación 5-HT y su principal metabolito, 5-HIAA. Estas mediciones fueron de nuestro interés debido a que la formación de 5-HIAA puede utilizarse como indicador de la actividad serotoninérgica o recambio de 5-HT en ratas. A su vez, la relación 5-HIAA/5-HT permitió inferir sobre la depleción del sistema.

4. 8. Determinación de la concentración 5-HT y 5-HIAA

Las determinaciones de este punto se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, CENFI, perteneciente al Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, bajo la dirección del Dr. Ramón Sotomayor.

Al momento de la determinación, los tejidos de cerebro (BO) se homogeneizaron en 400 μ l de ácido perclórico 0,2 N y, luego, se homogeneizaron en un sonicador (modelo XL2005, Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Heat Systems, EE. UU.). El homogeneizado se centrifugó a 12.000 xg durante 15 min a 4 °C (modelo Z233MK-2, Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemania) y el sobrenadante resultante se filtró (filtros de jeringa HPLC de 0,2 μ m, filtro desechable PTFE, modelo EW-32816-26, Cole-Parmer Instrument Company, EE. UU.). El sobrenadante filtrado se inyectó en un HPLC acoplada a un detector electroquímico para la determinación de 5-HT y 5-HIAA. El sedimento se resuspendió en NaOH 1N para la cuantificación de proteínas mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, EE. UU.) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Los contenidos de 5-HT y 5-HIAA se expresaron como pg/mg de proteína total.

Los 10 μ l de cada sobrenadante se inyectaron al sistema HPLC con la siguiente configuración: una bomba isocrática (modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna C18 reversa (modelo MF-8912, BAS, West Lafayette, IN, EE. UU.) y un detector electroquímico (modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, EE. UU.) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0,5 nA. La fase móvil consistió en una solución de NaH_2PO_4 0,1 M, ácido 1-octanosulfónico 1,0 mM, EDTA 0,27 mM y 4,0% (v/v), CH_3CN (pH = 2,5) y se bombeó a un flujo de 80 μ l/min. Las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA se evaluaron comparando el área de pico y el tiempo de elución respectivos de la muestra con un estándar de referencia. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración para cada neurotransmisor en particular (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). En estas condiciones experimentales, los tiempos de retención fueron de 33,3 min para 5-HT; de 25,6 min para 5-HIAA. Los

estándares, EDTA y ácido 1-octanosulfónico, se adquirieron de Sigma-Aldrich, Inc. (St Louis, MO, EE. UU.), todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

4. 9. Extracción de ARN total, retro-transcripción y PCR en tiempo real

Este punto se llevó a cabo con la colaboración de la Dra. Fiorella Campoverde Arbocco, Investigadora Asistente del Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, perteneciente al Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU).

El ARN total de los tejidos analizados (BO) se extrajo usando el reactivo de TRIzol™, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen-Life Technologies, Bs. As., Arg.). Se confirmó la integridad del ARNm de las muestras mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con el Syber Gold™ (Invitrogen-Life Technologies, Bs. As., Arg.). La cuantificación de ARN total se realizó mediante la determinación y análisis espectrofotométrico a 260 nm en espectrofotómetro JENWAY™ Modelo 7305, 5 µg de ARN total se retrotranscribieron a 37 °C utilizando primers hexámeros aleatorios (*random primers*) y la retrotranscriptasa Moloney del virus de la leucemia murina (M-MLV) (Promega Inc.), en una mezcla de reacción de 20 µl. El ARN se desnaturalizó primero a 70 °C durante 5 min en presencia de 1 µl de cebadores hexámeros aleatorios. Para la reacción de RT posterior se añadió la siguiente mezcla: buffer RT [50 mM Tris-HCl (pH 8,4), KCl 75 mM, 3 mM MgCl₂], dNTPs 0,5 mM, DTT 5 mM, 200 unidades de M-MLV transcriptasa inversa. La reacción se realizó mediante la incubación a 37 °C durante 60 min, posteriormente, la reacción se inactivó por calentamiento a 70 °C durante 15 min. El ADNc se almacenó a - 20 °C hasta los ensayos específicos de PCR en tiempo real.

El diseño de los primers se realizó con el software Beacon Designer 7. 9. Cada par de primers se diseñó complementario a diferentes exones de cada uno de los genes blanco, para evitar posible contaminación con ADN genómico.

Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador en tiempo real (Corbett Research Pty Ltd Corbett Rotor Gene 6000 Sydney, Australia) con Eva-Green® (Biotium, Hayward, CA) como fluoróforo, en un volumen final de 20 µl.

La mezcla de reacción consistió en 2 µl de 10 x PCR Buffer, 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,4 µl de 10 mM dNTP Mix (Invitrogen-Life Technologies, Bs. As., Arg.), 1 µl de 20 x EvaGreen® Dye (Biotium, Hayward, CA), 0,25 µl de 5 U/1 de Taq ADN polimerasa (Invitrogen-Life Technologies, Bs. As., Arg.), 0,1 µl de cada cebador, 2,5 mM (Primers Forward y Reverse) y 5 µl de ADNc. El protocolo específico de PCR, para cada uno de los genes seleccionados, se inició con 5 min de incubación a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 30s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Se utilizaron análisis del pico de fusión (en inglés: pico de Melt) para comprobar que la amplificación del gen originó un solo producto de amplificado específico. La cuantificación en tiempo real se constató midiendo el aumento en la fluorescencia causada por la unión de colorante EvaGreen® Dye al ADN de doble hebra al final de cada ciclo de amplificación. La expresión relativa se determinó utilizando el método de cuantificación comparativa de las muestras normalizadas en relación con la expresión de un calibrador de muestra, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pfaffl, 2001). Cada reacción de PCR incluyó un control interno de los ensayos sin ADNc y una muestra cuya retrotranscripción se realizó sin transcriptasa inversa. Todas las muestras se corrieron por duplicado. Las condiciones de reacción y las cantidades de ADNc añadido fueron calibradas de tal manera, que la respuesta del ensayo fue lineal con respecto a la cantidad total de ADNc utilizada para cada reacción. El gen de referencia utilizado para la normalización de los resultados fue S16 ribosomal, cuyos primers se describen en Batra et al. (1991), con una pequeña modificación para adaptarlos a rata, por ello los niveles relativos de ARNm se normalizaron a dicho gen. Los primers usados para la determinación de expresión de cada gen de interés se detallan en la Tabla 2.

5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de cada objetivo se realizaron con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0e (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA-EE. UU.).

Inicialmente, los datos fueron sometidos al test Shapiro Wilks para probar si presentaban una distribución normal. Para los resultados paramétricos, las pruebas estadísticas utilizadas fueron evaluadas con *t* de test de dos colas, para comparar las medias entre dos grupos, y con ANOVA de una o dos vías con *post hoc* test de Tukey, para comparaciones múltiples entre los diferentes grupos experimentales. Para los datos no paramétricos o discretos, se realizaron evaluaciones con el test de Kruskal Wallis para comparaciones entre los grupos, con *post hoc* test de Dunn. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media(media \pm SEM).

Para algunos ensayos se estudió la correlación entre variables. Como las observaciones resultaron ser lineales, se empleó el Coeficiente de Correlación lineal de Pearson.

Tabla 2. 2

Primers diseñados para el ensayo de PCR en tiempo real.

Gen	Primer	Secuencia	Código de identificación del Gen	Tamaño del amplicón	Temp. de annealing	Exon de annealing
TPH2	Sentido	CGGCGAAGAAGTTCTGAAGT	NM_173839.2	164	60,6	Exon 2 Exon 3
	Antisentido	AACCACGGCACATCCTCTA				
GABA _{Aα1}	Sentido	CGGCTGAACAACCTGATGG	NM_183326.2	163	60,6	Exon 4 Exon 5
	Antisentido	ATTCGGCTCTCACAGTCAAC				
GABA _{Aα5}	Sentido	CTGGATCTGCTATGTCTTCGT	NM_017289.1	111	59,8	Exon 9 Exon 9
	Antisentido	CTTGGCTTCGTGACCTTGA				
S16	Sentido	TCCAAGGGTCCGCTGCAGTC	NM_001169146.1	100	60	Exon 1 Exon 2
	Antisentido	CATTACCTTGATGAGCCCATT				

Diseño de primers específicos para la amplificación de secuencias de genes específicos de rata, seleccionados para el ensayo de PCR tiempo real. El diseño se realizó con el software Beacon Designer 7.9.

6. Diseños experimentales por objetivos específicos

6. 1. Validar el modelo de agresión en ratas macho Sprague Dawley

6. 1. a. "Evaluar los patrones de agresividad en ratas macho en el test RI, posterior a la inhibición de la enzima TPH por pCPA"

En este objetivo, se evaluaron los distintos patrones de agresividad, definidos sobre la base de la bibliografía existente de la especie y la cepa (Boyko et al., 2019; Malkesman et al., 2006; Takahashi y Miczek, 2014). Se utilizó un inhibidor de la enzima de TPH, enzima limitante de la síntesis de 5-HT (Jéquier, 1967; Verges M et al., 1986; Stokes et al., 2000).

Los días en que se llevaron a cabo las pruebas conductuales fueron los días tres y día seis, posteriores a la administración única de pCPA. Los animales fueron inyectados entre las 3,00 p.m. y 6,00 p.m. con pCPA 300 mg/kg i.p. (pCPA 3, pCPA 6), o solución salina i.p. (Control 3, Control 6). La administración de pCPA o solución salina, de ahora en adelante vehículo (veh), fue llevada a cabo con una agujas 25 G (0,5mm x 25mm), conectada a una jeringa de 1ml. El día de la administración de pCPA, los animales fueron colocados en cajas individuales con la finalidad de evitar agresiones entre ellos.

Las conductas evaluadas en los residentes (AL, CS, CnS, BA, AA, LAGR) fueron evaluadas en el RI, descritas en el punto 4. 4. 1. de este capítulo.

Los animales de los grupos experimentales o control fueron elegidos al azar. El criterio de peso y edad para conformar cualquiera de los grupos fue el descrito en el apartado 2 del corriente capítulo.

Con la finalidad de hacer más comprensible y ordenada la lectura de esta tesis, cada grupo experimental recibe el mismo nombre con el que luego será nombrado en el capítulo 3 de Resultados.

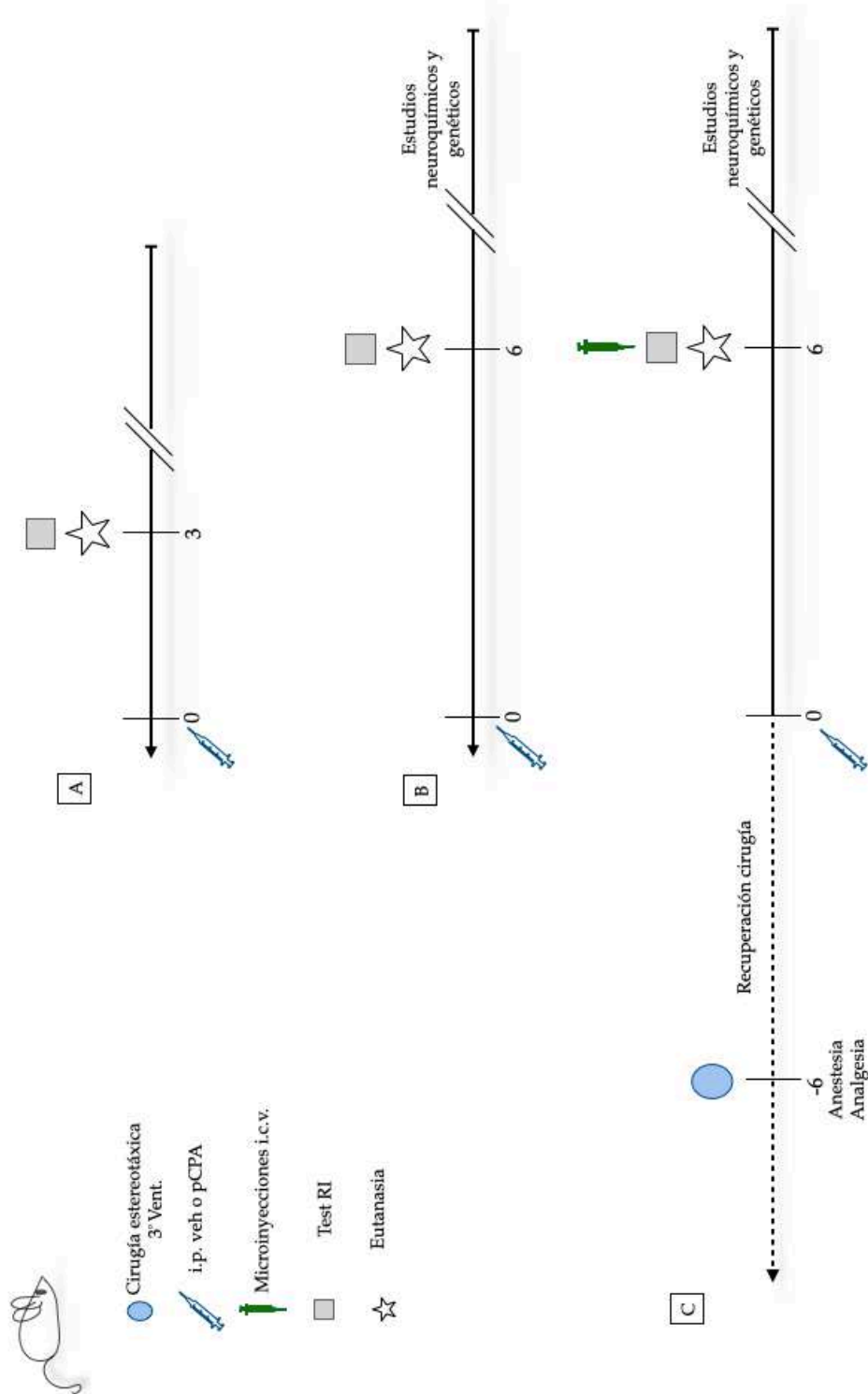


Figura 2.5.

Esquematización general de los diseños experimentales. El día cero del diseño corresponde al día que se administró pCPA i.p (300 mg/kg) o veh. A: Diseño experimental para los animales evaluados tres días posteriores a la administración de pCPA o veh (Objetivo: 1. a). B: Diseño experimental para los animales evaluados seis días posteriores a la administración de pCPA o veh (Objetivo: 1. a; 1. b; 1. c). C: Diseño experimental para los animales que recibieron microinyecciones i.c.v (vehiculizadas a 1 μ L de volumen final) (Objetivo: 2. a; 2. b; 2. c. Objetivo: 3. a).

6. 1. a. 1. Grupos Experimentales

- a. Control 3: ratas controles con una administración de veh i.p. y evaluadas en la prueba de RI luego de tres días posteriores a la inyección i.p.
- b. Control 6: ratas controles con una administración de veh i.p. y evaluadas en la prueba de RI luego de seis días posteriores a la inyección i.p.
- c. pCPA 3: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y evaluadas en la prueba de RI a los de tres días posteriores a la inyección i.p.
- d. pCPA 6: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y evaluadas en la prueba de RI a los de seis días posteriores a la inyección i.p.

6. 1. b. “Evaluar y correlacionar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO con la conducta agresiva”

A fin de evaluar si la actividad del sistema serotoninérgico posterior a la administración de pCPA efectivamente modificó al sistema, se midió la concentración de 5-HT y 5-HIAA, como se describe en 4. 8. (presente capítulo). Se analizó la concentración en el BO de los animales que fueron evaluados en el test RI el día seis posterior a la administración de pCPA, sobre la base de los resultados conductuales obtenidos. Se eligió el BO, ya que es la principal aferencia serotoninérgica de los NR en el encéfalo de la rata (Huang et al., 2017; McLean y Shipley, 1987; Steinfeld et al., 2015). A su vez, se correlacionó la concentración de 5-HT y AA.

Las muestras para realizar este objetivo se obtuvieron de los animales experimentales descritos en 6. 1. a. 1., que fueron eutanasiados al finalizar la prueba RI, por decapitación. Se extrajo y conservó el BO del encéfalo como se describe en 4. 5. del presente capítulo.

6. 1. b. 1. Grupos Experimentales

- a. Control 6: BO de ratas controles con una administración de veh i.p.
- b. pCPA 6: BO de ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p.

6. 1. c. “Determinar la expresión del ARNm de TPH2 en el BO, posterior a la administración del inhibidor enzimático pCPA”

En este objetivo, se determinó si pCPA indujo cambios sobre la expresión génica de TPH2 por la inhibición de su actividad. Las mediciones se realizaron sobre el BO en los animales que realizaron test el día seis posterior a la administración de pCPA. La expresión de ARNm de TPH2 se evaluó por PCR en tiempo real con un Corbett Rotor Gene 6000, usando primers específico para rata (Tabla 2. 2) y condiciones de reacción, como se describieron en el punto 4. 9. del presente capítulo.

Las muestras para realizar este objetivo se obtuvieron de los animales experimentales descritos en 6. 1. a. 1., que fueron eutanasiados al finalizar la prueba RI, por decapitación. Se extrajo y conservó el BO del encéfalo como se describe en 4. 5. del corriente capítulo.

6. 1. c. 1. Grupos Experimentales

- a. Control 6: BO de ratas controles con una administración de veh i.p.
- b. pCPA 6: BO de ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p.

6. 2. Evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y génicos de Allo

6. 2. a. “Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de Allo”

En este objetivo, se evaluaron las modificaciones sobre los patrones de agresividad establecidos en el objetivo 6. 1. a., posterior a la administración de Allo i.c.v. La vía de administración, i.c.v., se siguió sobre la base de resultados previos del laboratorio (Pelegrina et al., 2016). Para cumplir este objetivo, los animales experimentales se sometieron a la cirugía descrita en 4. 2. (presente capítulo). Luego de la cirugía, los animales de todos los grupos experimentales se alojaron

por seis días seguidos, para su recuperación, en cajas. Pasados esos seis días, fueron inyectados i.p. entre las 3,00 p.m. y 6,00 p.m. con pCPA 300 mg/kg (pCPA veh; pCPA Allo) o solución salina (control veh o control Allo) y nuevamente devueltos a su caja por seis días más (ver Figura 2. 5).

El día del test de conducta, 30 min previos al comienzo del mismo, los animales recibieron la microinyección i.c.v. (1 μ l) de las drogas específicas seleccionadas para el objetivo. La administración de las drogas fue llevada a cabo con una aguja (0,5 mm de diámetro exterior) conectada a una jeringa de 10 μ l (Hamilton, Reno, NV, EE. UU.). La misma fue introducida a través de la cánula guía hasta que la punta llegó 1,5 mm por debajo del extremo de la cánula (tercer ventrículo cerebral). La administración se realizó suavemente (0,25 μ l/min). Al finalizar, se dejó *in situ* durante 60 s más para permitir la difusión de las drogas en el sistema ventricular antes de que el experimentador retirara la aguja.

Las conductas evaluadas en los residentes en la prueba RI (AL, CS, CnS, AGR, LAGR) fueron descriptas en el punto 4. 4. del presente capítulo.

Los animales que constituyeron los grupos experimentales o control de este objetivo fueron elegidos al azar. El criterio de peso y edad para conformar cualquiera de los grupos fue el descrito en el punto 2 de este capítulo.

6. 2. a. 1. Grupos Experimentales

- a. control veh: ratas controles con una administración de veh i.p. y con veh i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- b. control Allo: ratas controles con una administración de veh i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- c. pCPA 6 veh: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con veh i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- d. pCPA 6 Allo: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v. 30 min antes de la prueba.

6. 2. b. “Evaluar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO, posterior a la administración de Allo”

En este objetivo, se midió la concentración de 5-HT y 5-HIAA, como se describe en 4. 8. (del presente capítulo) en el BO de los animales experimentales. Se eligió el BO, ya que es la principal aferencia del serotoninérgico de los NR en el encéfalo de la rata (Huang et al., 2017; McLean y Shipley, 1987; Steinfeld et al., 2015).

Las muestras para realizar este objetivo se obtuvieron de los animales experimentales descritos en 6. 2. a. 1., que fueron eutanasiados al finalizar la prueba RI, por decapitación. Se extrajo y conservó el BO del encéfalo como se describe en 4.5. del presente capítulo.

6. 2. b. 1. Grupos Experimentales

- a. control veh: BO de ratas controles con una administración de veh i.p. y con veh i.c.v.
- b. control Allo: BO de ratas controles con una administración de veh i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v.
- c. pCPA 6 veh: BO de ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con veh i.c.v.
- d. pCPA 6 Allo: BO de ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v.

6. 2. c. “Determinar la expresión del ARNm de TPH2; GABA_{A α 1} y GABA_{A δ} en el BO, posterior a la administración de Allo”

En este objetivo, se buscó determinar la expresión de ARNm de GABA_{A α 1} y GABA _{δ} (Carver y Reddy, 2016; Locci y Pinna, 2017; Panzanelli et al., 2005). Sobre la base de los resultados del objetivo 6. 1. c., también se evaluó TPH2. Los niveles de ARNm se estimaron por PCR en tiempo real con un Corbett Rotor Gene 6000,

usando primers específico para rata (Tabla 2. 2) y condiciones de reacción que se describieron en el punto 4. 8. del presente capítulo.

Las muestras para realizar este objetivo se obtuvieron de los animales experimentales descritos en 6. 2. a. 1., que fueron eutanasiados al finalizar la prueba RI, por decapitación. Se extrajo y conservó el BO del encéfalo como se describe en 4. 5. del presente capítulo.

6. 2. c. 1. Grupos Experimentales

- a. control veh: BO de ratas controles con una administración de veh i.p. y con veh i.c.v.
- b. control Allo: BO de ratas controles con una administración de veh i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v.
- c. pCPA 6 veh: BO de ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con veh i.c.v.
- d. pCPA 6 Allo: BO de ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v.

6. 3. Evaluar los efectos de Allo sobre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y Serotonérgico

6. 3. a. "Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de un antagonistas y un agonistas específicos de GABA_A y 5-HT"

En este objetivo, se evaluaron las posibles modificaciones sobre los patrones de agresividad establecidos en el punto 4. 4. 1. (del presente capítulo), posterior a la administración i.c.v. de agonistas y antagonistas específicos del sistema GABAérgico y serotonérgico de acuerdo al punto 4. 3. del presente capítulo. Para cumplir este objetivo, los animales experimentales se sometieron a la cirugía descrita en 4. 2. del presente capítulo. Luego de la cirugía, los animales de todos los grupos experimentales se alojaron por seis días seguidos, para su recuperación, en cajas. Pasados esos seis días, fueron inyectados i.p. entre las 3,00 p.m. y 6,00

p.m. con pCPA 300 mg/kg y devueltos a sus cajas por seis días más (ver Figura 2.5).

El día del test conductual, 45 a 15 min previos al comienzo de la misma, los animales recibieron la microinyección i.c.v. (1µl) de las drogas específicas seleccionadas para el objetivo (Bic, Allo, 5-HT). La administración de las drogas fue llevada a cabo con una aguja (0,5 mm de diámetro exterior) conectada a una jeringa de 10µl (Hamilton, Reno, NV, EE. UU.). La misma fue introducida a través de la cánula guía hasta que la punta llegó 1,5 mm por debajo del extremo de la cánula (tercer ventrículo cerebral). La administración se realizó suavemente (0,25 µL/min). Al finalizar, se dejó *in situ* durante 60s más para permitir la difusión de las drogas en el sistema ventricular antes de que el experimentador retirara la aguja.

Las conductas evaluadas en los residentes en la prueba RI (AL, CS, CnS, AGR, LAGR) fueron descriptas en el punto 4.4. de este capítulo.

Los animales que constituyeron los grupos experimentales o control de este objetivo fueron elegidos al azar. El criterio de peso y edad para conformar cualquiera de los grupos fue el descrito en el punto 2 de este capítulo..

6.3. a. 1. Grupos Experimentales GABAérgicos

Sistema GABAérgico: Se utilizó Bic (antagonista GABA_A específico) + Allo.

- a. pCPA 6 veh: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con veh i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- b. pCPA 6 Allo: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con Allo 6 µM i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- c. pCPA 6 Bic: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y Bic i.c.v. (4,9µM) 45 min antes de la prueba y veh i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- d. pCPA 6 Bic Allo: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y Bic i.c.v. (4,9µM) 45 min antes de la prueba y Allo i.c.v. (6µM) 30 min antes de la prueba.

6. 3. a. 2. Grupos Experimentales Serotonérgicos

Sistema serotonérgico: Se utilizó Allo+ 5-HT. para determinar el mecanismo por el cual Allo podría ejercer el efecto.

- a. pCPA veh: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con veh i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- b. pCPA Allo: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y con Allo 6 μ M i.c.v. 30 min antes de la prueba.
- c. pCPA 5-HT: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y veh i.c.v. 30 min antes de la prueba y 5-HT (1 μ M) i.c.v. 15 min antes de la prueba.
- d. pCPA Allo 5-HT: ratas tratadas con una administración de pCPA 300 mg/kg i.p. y Allo (6 μ M) i.c.v. 30 min antes de la prueba y 5-HT (1 μ M) i.c.v. 15 min antes de la prueba.

CAPÍTULO 3

Resultados

1. 1. Validar el modelo de agresión en ratas macho Sprague Dawley

1. 1. a. “Evaluar los patrones de agresividad en ratas macho en el test RI, posterior a la inhibición de la enzima TPH por pCPA”

Los parámetros conductuales se evaluaron en las dos etapas de la prueba. En la primera etapa del RI, la depleción serotoninérgica no modificó AL en ninguno de los grupos ($F_{(3, 36)} = 0,4131$; $p = 0,7446$) (Figura 3. 1). Al analizar, en la segunda etapa, la CnS ($F_{(3, 36)} = 1,061$; $p = 0,3790$) y la CS ($F_{(3, 36)} = 1,291$; $p = 0,2924$) pudimos observar que la depleción no indujo diferencias entre los grupos (Figura 3. 2).

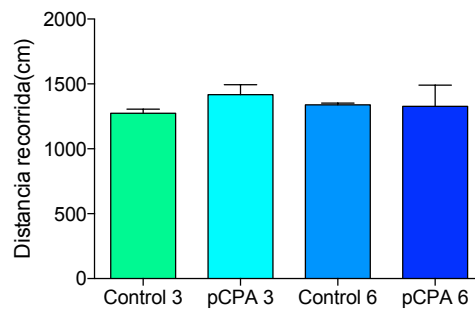


Figura 3. 1. Efecto de pCPA sobre la actividad locomotora (AL). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la distancia recorrida en cm. Cada grupo $n = 10$. No significativo para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

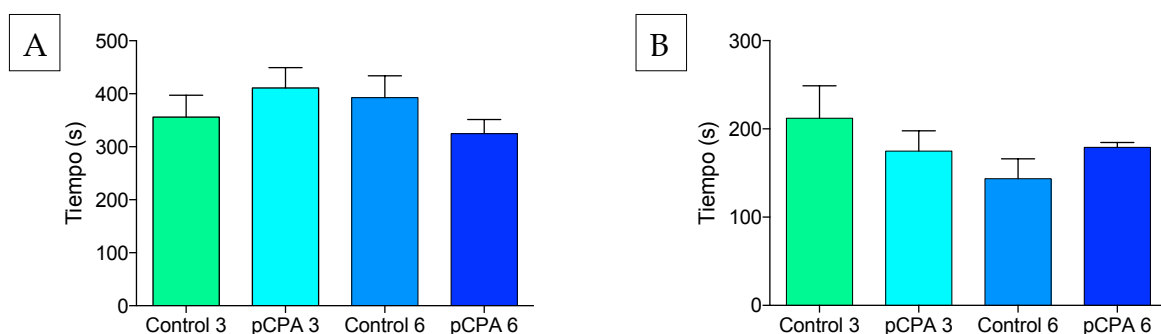


Figura 3. 2. Efecto de pCPA sobre la A: Conductas no Sociales (CnS) y B: Conductas Sociales (CS). Prueba RI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de CnS y CS. Cada grupo $n=10$. No significativo para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

Luego de que el análisis estadístico revelara que no existen diferencias entre los grupos, en las CnS y las CS, observamos la distribución porcentual de cada una de las conductas que conformaron dichos parámetros. Las Tablas 3. 1 y 3. 2 muestran la distribución porcentual de cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta en las CnS y CS. Resultan interesantes las conductas de olfateo. El porcentaje de tiempo, en las CnS y CS, destinado a la olfacción (olfateo pCPA 3: 41,8%; olfateo pCPA 6: 39,12%; olfateo ano-genital pCPA 3: 71,2%; olfateo ano-genital pCPA 6: 67%) es mayor en los animales depletados de 5-HT.

Tabla 3. 1
Distribución de las Conductas no Sociales (CnS). Prueba RI.

CnS	Control 3	pCPA 3	Control 6	pCPA 6
Acicalamiento	33,12	37	46	35,7
Olfateo	23,01	41,8	29,5	39,12
Alzarse en dos patas	44,87	21,2	24,5	25,18

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CnS en los grupos.

Tabla 3. 2
Distribución de las Conductas Sociales (CS). Prueba RI.

CS	Control 3	pCPA 3	Control 6	pCPA 6
Acicalamiento Social	42,7	39,4	48,1	43
Olfateo ano-genital	57,3	71,2	51,9	67

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CS en los grupos.

Adicionalmente en la segunda etapa, la depleción de 5-HT modificó marcadamente la LAGR, BA y AA. Específicamente, la depleción disminuyó significativamente ($p < 0,01$ y $p < 0,001$) a LAGR en los dos días en que se realizó la prueba (Figura 3. 3); a su vez la depleción aumentó significativamente ($p < 0,01$ y $p < 0,001$) BA (Figura 3. 4. A). AA aumentó significativamente ($p < 0,05$) seis días posterior a la depleción (Figura 3. 5. B).

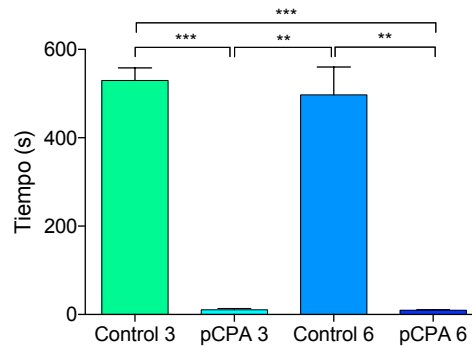


Figura 3. 3. Efecto de pCPA en la Latencia de Agresión (LAGR). Prueba RI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de LAGR. Cada grupo n = 10. **p<0,01; ***p<0,001 para Kruskal-Wallis, *post hoc* Dunn.

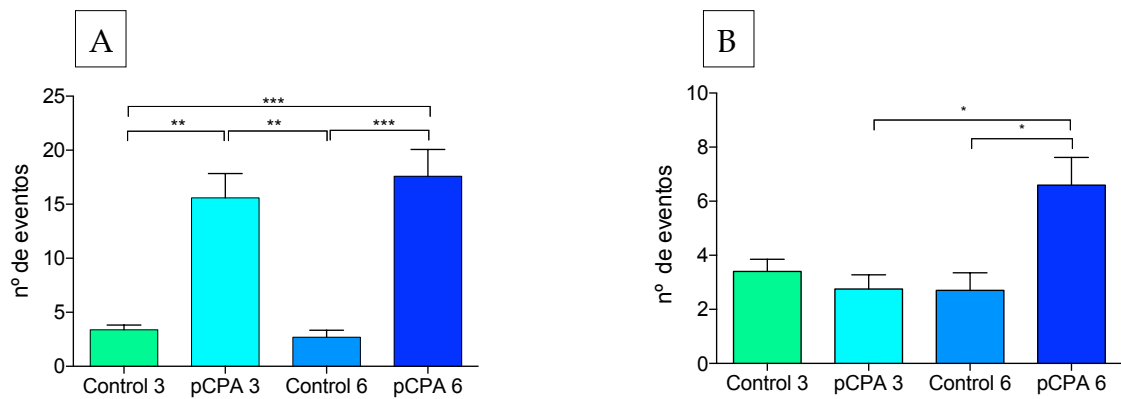


Figura 3. 4. Efecto de pCPA en A: Baja Agresión (BA) y B: Alta Agresión (AA). Prueba RI. A: Los resultados se expresan como la media \pm SEM del nº de eventos. Cada grupo n = 10. **p<0,01; ***p<0,001. Kruskal-Wallis, *post hoc* Dunn. B) Los resultados se expresan como la media \pm SEM del nº de eventos. Cada grupo n = 10. *p<0,05 para Kruskal-Wallis, *post hoc* Dunn.

En la Tabla 3. 3, se muestra la distribución porcentual de cada una de las conductas de BA. Es interesante detenerse en las conductas del grupo Control 6 y pCPA 6. En el grupo Control 6 (las pisadas 46%, las falsas montas 29,46%, las persecuciones 24,61%), las conductas menos agresivas son a las que los animales destinaron mayor porcentaje de tiempo, mientras que en el grupo pCPA 6 (las pisadas 16,3%, las falsas montas 23,4%, las persecuciones 60,3%), el mayor porcentaje de tiempo lo destinaron a las conductas de mayor agresividad.

Tabla 3. 3
Distribución de las conductas de Baja Agresión (BA). Prueba RI.

BA	Control 3	pCPA 3	Control 6	pCPA 6
Pisadas	32	31,3	46	16,3
Falsas montas	23	29,81	29,49	23,4
Persecuciones	31,2	39,8	24,61	60,3

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de eventos de cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta al evaluar las BA en los grupos. Las conductas están ordenadas de menor a mayor grado de agresividad.

En el caso de las AA sí observamos diferencias significativas entre los grupos pCPA 3 y pCPA 6 (Figura 3. 4. B). Es interesante, como puede verse en la Tabla 3. 4, que los dos grupos depletados mostraron todo el espectro de conductas AA. Mientras que los grupos Control 3 y Control 6 solo mostraron ataques laterales.

Tabla 3. 4
Distribución de las conductas de Alta Agresión (AA). Prueba RI.

AA	Control 3	pCPA 3	Control 6	pCPA 6
Ataques laterales	100	37,6	100	35,7
Trabas de ataque	-	41,37	-	46
Mordidas	-	21,3	-	18,3

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de eventos de cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta al evaluar las AA en los grupos. Las conductas están ordenadas de menor a mayor grado de agresividad.

Este resultado parcial permitió elegir al grupo (pCPA 6) en el cual realizaríamos las determinaciones de la concentración de 5-HT y 5-HIAA y la expresión genética de TPH2.

1. 1. b. “Evaluar y correlacionar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO con la conducta agresiva”

La depleción modificó la actividad del sistema serotoninérgico. Específicamente, observamos una disminución significativa ($p < 0,05$) en los niveles de 5-HT en el BO (Figura 3. 5. A). La concentración del metabolito, 5-HIAA, no mostró diferencias significativas respecto del control (Figura 3. 5. B). Por otra

parte, se evidenció una disminución significativa ($p < 0,05$) de la dinámica catabólica de actividad del sistema serotoninérgico (5-HIAA/5-HT) (Figura 3. 6).

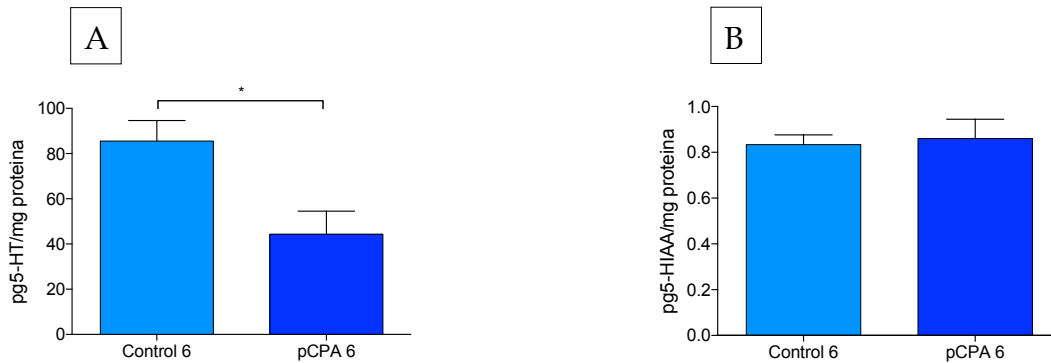


Figura 3. 5: **Determinación de A: Concentración de 5-HT y B: Concentración de 5-HIAA por HPLC en el BO.** Los resultados se expresan como la media \pm SEM pg/mg de proteína. Controles 6 n = 10; pCPA 6 n= 12 para $*p < 0,05$ "t" Test.

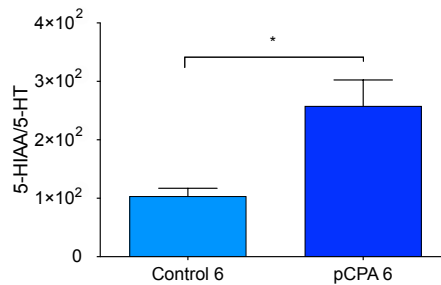


Figura 3. 6: **Índice de recambio entre [5-HIAA]/[5-HT].** Los resultados se expresan como la media \pm SEM % de la relación entre los pg/mg de proteína 5-HIAA y 5-HT. Controles 6 n = 10; pCPA 6 n= 12. $*p < 0,05$ para "t" Test.

En la Figura 3. 7, se muestra la correlación de la concentración de 5-HT y los eventos AA seis días posteriores a la depleción. Mientras que en el grupo pCPA 6 observamos una alta correlación negativa $r = 0,7648$ $p = *0,0226$ (Figura 3. 7. B), en el grupo Control 6 observamos una baja correlación $r = 0,1022$ $p = 0,5368$ (Figura 3. 7. A). Estos datos muestran que la depleción serotoninérgica permite generar un modelo de agresión territorial.

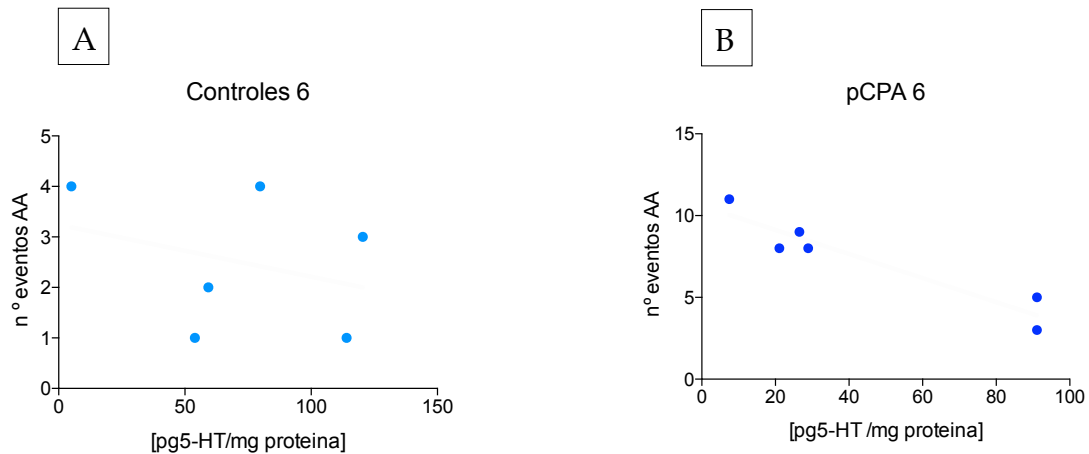


Figura 3. 7. Resultados de la correlación entre la concentración 5-HT de controles y tratados con pCPA a los 6 días. A: [5-HT] vs Eventos de AA, para Controles 6. B: [5-HT] vs Eventos de AA. Cada grupo n = 6. Correlación de Pearson.

1. 1. c. “Determinar la expresión del ARNm de TPH2 en el BO, posterior a la administración del inhibidor enzimático pCPA”

A fin de determinar si la depleción de 5-HT indujo cambios en la expresión génica de TPH2, y teniendo en cuenta que las depleciones de sistemas de neurotransmisión inducen cambios compensatorios en el rafe (Walther et al., 2003) y en otras estructuras cerebrales (Zill, et al., 2007), realizamos la cuantificación de ADNc de TPH2 derivados del BO. Observamos un aumento significativo ($p < 0,05$) en el ARNm de TPH2 seis días posteriores a la administración de pCPA (Figura 3. 8).

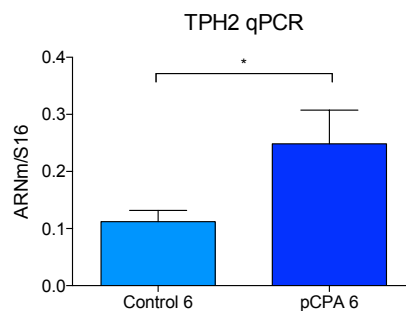


Figura 3. 8. Expresión Relativa de ARNm de TPH2 en el BO. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las unidades de expresión relativa de ARNm de TPH2 de rata tratado con veh o pCPA. Controles 6 n = 10; pCPA 6 n= 6. * $p < 0,05$ para “t” Test.

1. 2. Conclusiones Parciales

La depleción serotoninérgica, permite generar un modelo de agresión territorial ofensivo, sin afectar otras conductas de interacción o exploración. Las conductas cualitativamente más agresivas, son comparables a la agresión patológica o fuera de los niveles adaptativos de la especie; y son observadas seis días posterior a la administración. En el BO, puede constatare la dinámica alterada del sistema serotoninérgico. A esto se suman las altas correlaciones obtenidas entre las agresiones y las concentraciones de 5-HT. Por último, la depleción del sistema genera una respuesta en la expresión del gen TPH2, indicando que el BO cuenta con neuronas productoras de 5-HT independiente del NR.

2. 1. Evaluar los efectos conductuales, neuroquímicos y génicos de Allo

2. 1. a. “Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de Allo”

El primer objetivo nos permitió validar un modelo de conducta agresiva territorial desadaptativa ofensiva. Teniendo en cuenta estos resultados, procedimos a evaluar los efectos de la administración aguda de Allo (i.cv. 30 min antes de la prueba RI), como un neuromodulador conductual. En este objetivo, observamos los efectos de Allo en el grupo control (sin depleción) para ver si Allo provocaba efectos *per se* en los parámetros de interés. Los parámetros de interés se evaluaron en dos etapas.

En la primera etapa del RI, observamos una disminución significativa ($F_{(1, 41)} = 31,02$; $p < 0,0001$) de la AL en el grupo control, posterior a la administración de Allo. Este efecto no se observó en el grupo con depleción serotoninérgica (Figura 3. 9).

En la segunda etapa, observamos un aumento significativo ($F_{(1, 41)} = 3,758$ $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$) en las CnS en el grupo control, posterior a la

administración de Allo (Figura 3. 10. A). En contraposición, posterior a la administración de Allo en el grupo control, se observó una disminución significativa ($F_{(1, 41)} = 30,65$; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$) de las CS respecto de los demás grupos (Figura 3. 10. B). Nuevamente, la administración de Allo, en el grupo previamente depletado, no muestra cambios estadísticamente significativos en las CnS y CS.

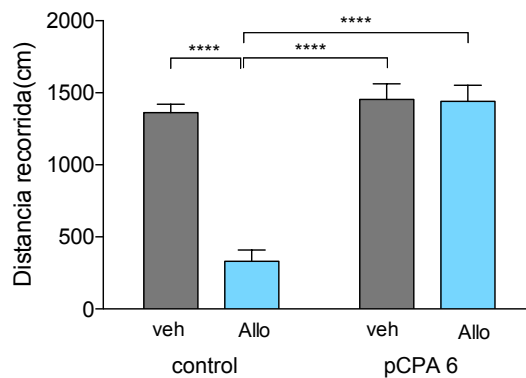


Figura 3. 9. Efecto de Allo sobre Actividad Locomotora (AL). Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de AL. control veh n = 10; control Allo n = 11; pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15. **** $p < 0,0001$ para ANOVA II, *post hoc* Tuckey.

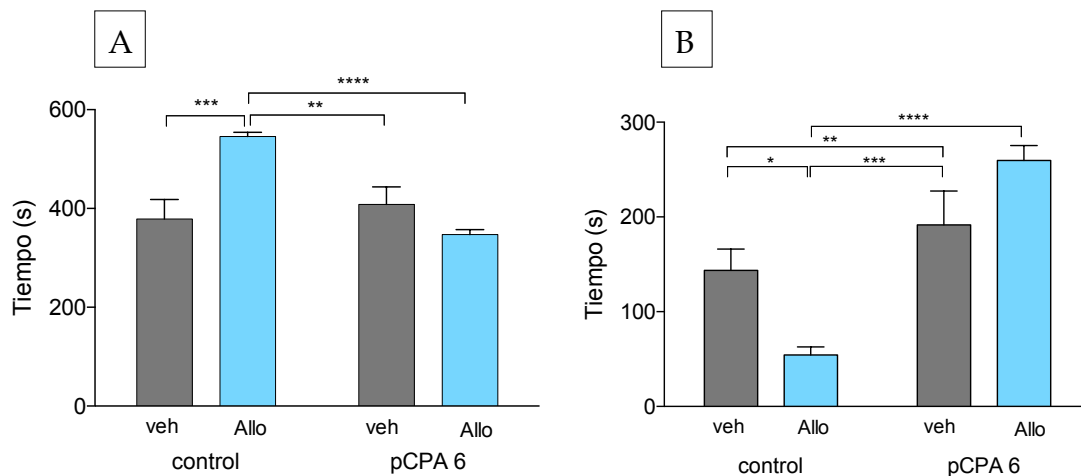


Figura 3. 10. Efecto de Allo sobre la A: Conductas no Sociales (CnS) y B: Conductas Sociales (CS). Prueba RI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de CnS y CS. control veh n = 10; control Allo n = 11; pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para ANOVA II, *post hoc* Tuckey.

Luego del análisis estadístico sobre las CnS y las CS, observamos la distribución porcentual de cada una de las conductas que conformaron dichos parámetros (Tabla 3. 5. y

3. 6). El tiempo destinado a las conductas de reconocimiento del territorio o del oponente resulta interesante. Tanto para las CnS como para las CS, en los animales depletados de 5-HT, fue considerablemente mayor (olfateo pCPA 6 veh: 79,54 %; olfateo ano-genital pCPA 6 veh: 78,71 %) que en los que recibieron administración de Allo (olfateo pCPA 6 Allo: 68,4 %; olfateo ano-genital pCPA 6 Allo: 55,46 %). Mientras que en los grupos control, el tiempo destinado al acicalamiento individual o social fue mayor (acicalamiento control veh: 45,9 %; acicalamiento control Allo: 54,3 %; acicalamiento social control veh: 51,9 %; acicalamiento social: control Allo 61,3 %).

Tabla 3. 5
Distribución de las Conductas no Sociales(CnS). Prueba RI

CnS	control		pCPA 6	
	veh	Allo	veh	Allo
Acicalamiento	45,9	54,3	13,63	16
Olfateo	30,1	23,7	79,54	68,4
Alzarse en dos patas	24,5	21,9	6,81	15,6

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CnS en los grupos.

Tabla 3. 6
Distribución de las Conductas Sociales (CS). Prueba RI.

CS	control		pCPA 6	
	veh	Allo	veh	Allo
Acicalamiento Social	51,9	61,3	21,29	44,53
Olfateo ano-genital	48,1	38,7	78,71	55,46

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CS en los grupos.

Como puede verse en la Figura 3. 11, la administración de Allo modificó la LAGR y las AGR en los grupos depletados.

Allo no afectó la LAGR en los grupos sin depleción (control veh vs control Allo). Ahora bien, la administración de Allo aumentó significativamente ($p < 0,001$) la LAGR en los grupos previamente depletados. Pudimos observar un aumento significativo de la LAGR ($p < 0,0001$), posterior a la administración de Allo, entre el

control Allo vs pCPA veh y pCPA Allo, pero este efecto fue exclusivo del parámetro LAGR (para todas las comparaciones de LAGR $F_{(1, 41)} = 83,97$) (ver Figura 3. 11. A).

Por otro lado, observamos una disminución significativa ($F_{(1, 41)} = 6,850$; $p < 0,01$) de las AGRE en el grupo depletado, posterior a la administración de Allo (ver Figura 3. 11. B).

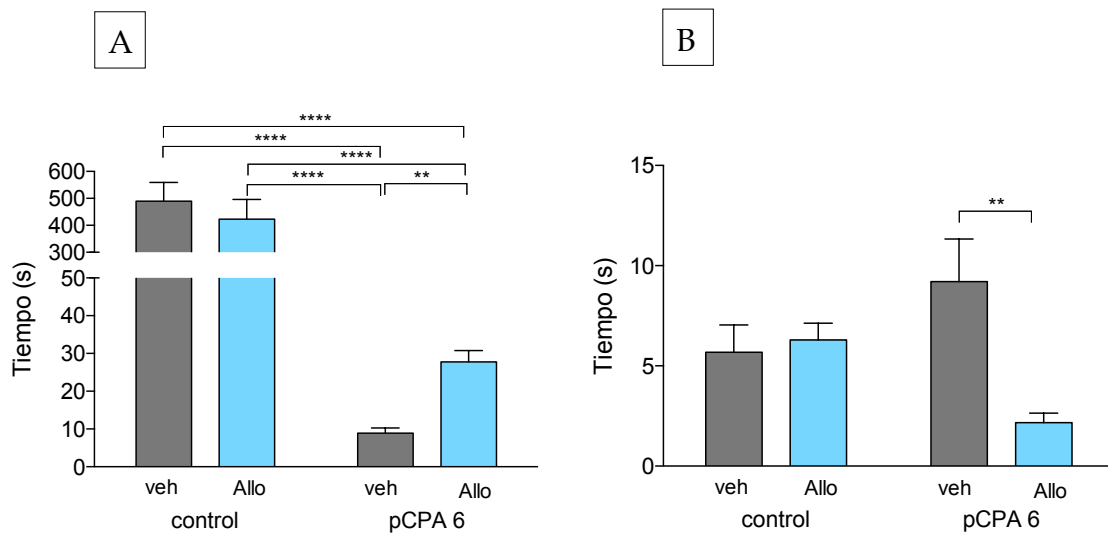


Figura 3. 11. Efecto de Allo sobre A: Latencia de Agresión (LAGR) y B: Conductas de Agresión (AGR).
Prueba RI. A: LAGR. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de latencia. B: AGR. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de AGR. control veh n = 10; control Allo n = 11; pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ para ANOVA II, *post hoc* Tuckey.

Al analizar la distribución porcentual de las AGR (Tabla 3. 7), observamos que mientras el grupo control con previa administración de Allo mostró diferencias significativas con los grupos depletados, las conductas que presentaron fueron cualitativamente menos agresivas (pisadas 55,12%, falsas montas 16,03% y persecuciones 28,85%) y no se registró presencia de conductas cualitativamente más agresivas. Por otro lado, en el grupo con depleción sin administración de Allo, observamos todas las AGR (pisadas 18,2%; falsas montas 28,8%; persecuciones 23,6; ataques laterales 3,8%; trabas de ataque 19,2% y mordidas 6,4%). Curiosamente, el grupo con la depleción serotoninérgica y administración de Allo, mostró ausencia de persecuciones y mordidas.

Tabla 3. 7
Distribución de las Conductas de Agresión (AGR). Prueba RI.

AGR	control		pCPA 6	
	veh	Allo	veh	Allo
Pisadas	77,6	55,12	18,2	33,04
Falsas montas	22,4	16,03	28,8	32,17
Persecuciones	-	28,85	23,6	-
Ataques laterales	-	-	3,8	5,21
Trabas de ataque	-	-	19,2	29,56
Mordidas	-	-	6,4	-

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta al momento de medir el tiempo de las AGR en los grupos. Las conductas están ordenadas de menor a mayor grado de agresividad.

2. 1. b. “Evaluar la actividad del sistema serotoninérgico en el BO, posterior a la administración de Allo”

La administración de Allo (Figura 3. 12. A) en los grupos, indujo un aumento significativo en la concentración de 5-HT ($p < 0,05$) (pCPA 6 veh y pCPA 6 Allo). Asimismo, observamos un aumento significativo ($p < 0,01$) entre el grupo pCPA 6 veh y el grupo control Allo (para todas comparaciones de la concentración de 5-HT $F_{(1, 27)} = 18,49$). La concentración del metabolito 5-HIAA aumentó significativamente ($F_{(1, 27)} = 8,63$; $p < 0,01$), posterior a la administración Allo, entre los grupos depletados (Figura 3. 12. B). Sumado a ello, al establecer el índice de recambio de 5-HIAA/5-HT, pudimos observar que la administración aguda de Allo aumentó significativamente ($F_{(1, 27)} = 10,47$; $p < 0, 01$; $p < 0, 001$) respecto del grupo depletado (Figura 3. 13). Todos estos resultados indican una acción aguda de Allo sobre la dinámica serotoninérgica.

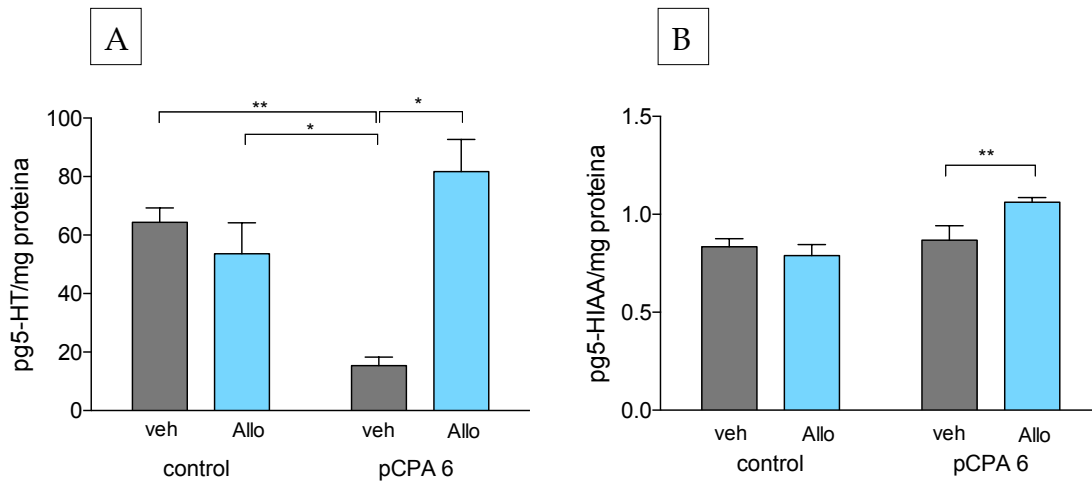


Figura 3. 12. Determinación de la concentración de A: 5-HT y B: 5-HIAA por HPLC en el BO. Los resultados se expresan como la media ± SEM pg/mg de proteína. control veh n = 8; control Allo n = 8; pCPA veh n = 7; pCPA Allo n = 8. *p<0,05; **p<0,01 para ANOVA II *post hoc* Tuckey.

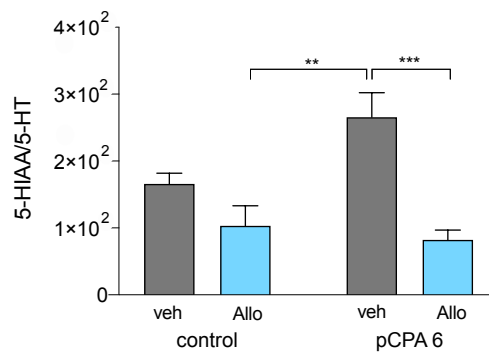


Figura 3. 13. Índice de recambio entre [5-HIAA]/[5-HT]. Los resultados se expresan como la media ± SEM % de la relación entre el pg/mg de proteína de 5-HIAA y 5-HT. control veh n = 8; control Allo n = 8; pCPA veh n = 7; pCPA Allo n = 8. **p<0,01; *** p<0,001 para ANOVA II *post hoc* Tuckey.

2. 1. c. “Determinar la expresión del ARNm de TPH2; GABA_{Aα1} y GABA_{Aδ} en el BO, posterior a la administración de Allo”

En el grupo previamente depletado observamos que Allo indujo una disminución significativa ($F_{(1, 27)} = 3,95$; $p < 0,05$) en la expresión de TPH2 (Figura 3. 14. A). Asimismo, Allo indujo una disminución significativa ($F_{(1, 27)} = 5,61$; $p < 0,01$) en la expresión de GABA_{Aα1}, en los grupos previamente depletado (Figura 3. 14.

B). No se observaron modificaciones en la expresión de génica GABA_{Aδ}, en ninguno de los grupos experimentales ($F_{(1,27)} = 0,0138$) (Figura 3. 14. C).

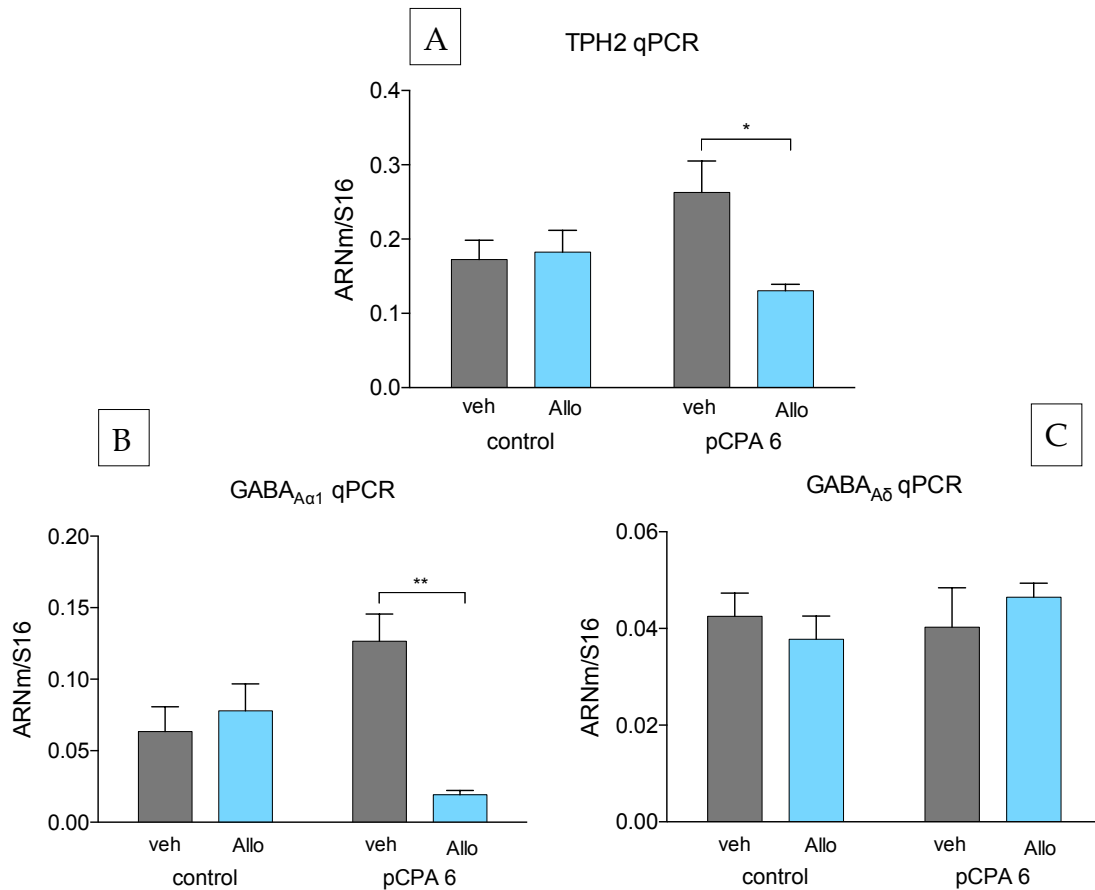


Figura 3. 14. **Expresión Relativa de ARNm de A: TPH2, B: GABA_{Aα1} y C: GABA_{Aδ} en el BO.** Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las unidades de expresión relativa de ARNm de TPH2, GABA_{Aα1} o GABA_{Aδ} de rata, tratado con veh o pCPA. control veh n = 8; control Allo n = 8; pCPA veh n = 7; pCPA Allo n = 8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para ANOVA II *post hoc* Tuckey.

2. 2. Conclusiones Parciales

La administración aguda de Allo afecta las AL, CS, CnS y la LAGR, en los grupos sin previa depleción, pero estos datos no pueden analizarse aisladamente. La AL y la LAGR dan cuenta de la falta de actividad general de los animales. A su vez, las CS y las CnS son tiempos complementarios y el tiempo destinado a la CnS es alto. Por lo tanto, el tiempo destinado al movimiento es mínimo y ello provoca

una falta de interacción. Sin embargo, al dirigir la mirada a los grupos con previa depleción, Allo aumenta la LAGR y disminuye las AGR, sin afectar el resto de las conductas, lo que indica una exclusividad de Allo hacia la conducta agresiva. Estas modificaciones conductuales se acompañan de cambios en la dinámica serotoninérgica en el BO, la estructura más importante para el reconocimiento del medio y el oponente. En los grupos depletados, Allo produce modificaciones rápidas en la expresión génica de la subunidad de GABA_{Aα1} y de TPH2.

3. 1. Evaluar los efectos de Allo sobre los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y Serotoninérgico

3. 1. a. “Evaluar las modificaciones en los patrones conductuales asociados a la agresión, posterior a la administración de un antagonistas y un agonistas específicos de GABA_A y 5-HT”

En este objetivo tuvimos en cuenta los resultados obtenidos en 2. 1. a. Procedimos con el esquema control de animales con depleción (en los gráficos pCPA veh) y animales a los que se les administró Allo (en los gráficos pCPA Allo) para antagonista GABAérgico y agonista serotoninérgico.

3. 1. a. 1. Sistema GABAérgico

En la primera etapa de la prueba, no observamos cambios en la AL en ninguno de los grupos ($F_{(3, 40)} = 1,937$; $p = 0,1411$) (Figura 3. 15). Una respuesta semejante observamos en la segunda etapa del RI, la CnS ($F_{(3, 40)} = 2,048$; $p = 0,1244$) y la CS ($F_{(3, 40)} = 2,165$; $p = 0,1092$) no mostraron diferencias entre los grupos. (Figura 3. 16. A; Figura 3. 16. B).

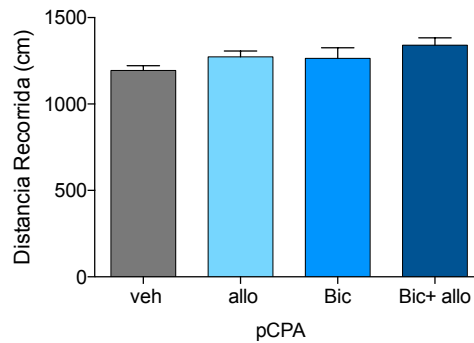


Figura 3. 15. Efecto de Allo y Bic sobre Actividad Locomotora (AL).

Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la distancia recorrida en cm. pCPA veh n = 9; pCPA allo n = 15; pCPA bic n= 10; pCPA bic allo n= 10. No significativo para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

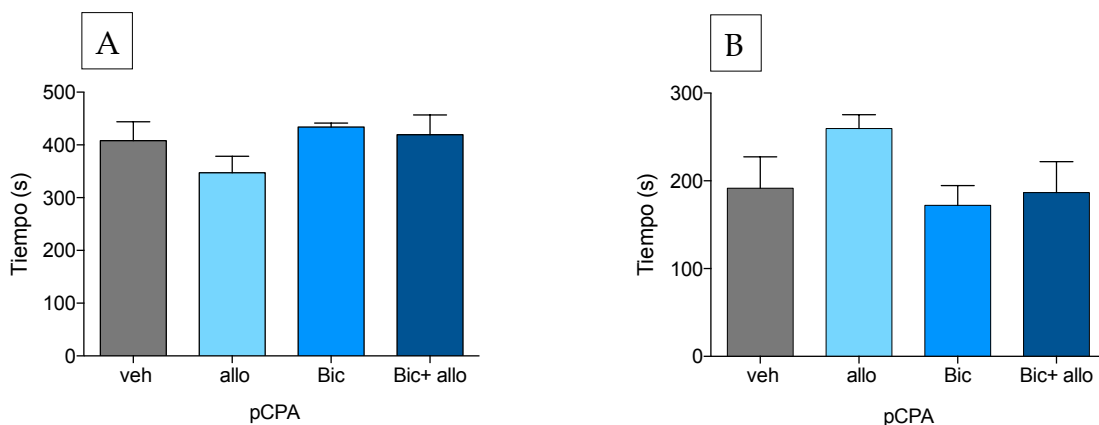


Figura 3. 16. Efecto de Allo y Bic sobre la A: Conductas no Sociales (CnS) y B: Conductas Sociales (CS). Prueba RI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de las CS y CnS. pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15; pCPA Bic n= 10; pCPA Bic Allo n= 10. No significativo para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

En las Tabla 3. 8. y Tabla 3. 9, se muestra la distribución porcentual de cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta en las CnS y CS en comparación a los grupos con administración del antagonista GABAérgico.

Mientras que en las CnS, los residentes del grupo pCPA Bic destinaron mayor tiempo al olfateo u olfato ano-genital, semejante al porcentaje de tiempo que destinaron los residentes de los grupos pCPA veh y pCPA Allo, los residentes del grupo pCPA Bic+Allo destinaron menos porcentaje de tiempo.

Tabla 3. 8

Distribución de las Conductas no Sociales (CnS). Prueba RI.

CnS	veh	pCPA		
		Allo	Bic	Bic Allo
Acicalamiento	13,63	16	20,25	18,13
Olfateo	79,54	68,4	43,52	20,57
Alzarse en dos patas	6,81	15,6	36,23	61,3

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CnS en los grupos.

Tabla 3. 9

Distribución de las Conductas Sociales (CS). Prueba RI.

CS	veh	pCPA		
		Allo	Bic	Bic Allo
Acicalamiento Social	21,29	44,53	16,77	64,23
Olfateo ano-genital	78,71	55,46	83,23	35,77

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CS en los grupos.

Como previamente observamos, Allo recuperó el tiempo de LAGR ($p < 0, 01$) respecto de los animales con depleción. Interesantemente, observamos una disminución significativa ($p < 0, 05$) de LAGR posterior a la administración del antagonista específico GABAérgico entre los grupos pCPA Allo y pCPA Bic+Allo. A su vez, el grupo pCPA Bic+Allo mostró tiempos de LAGR semejantes al grupo depletado (Figura 3. 17. A) (para todas comparaciones el $F_{(3, 40)} = 7,622$).

En cuanto a las AGR (Figura 3. 17. B), como previamente observamos, Allo disminuyó el tiempo de las AGR ($p < 0, 01$) respecto de los animales con depleción. A su vez, observamos que la disminución fue significativa para los tiempos de las AGR en los grupos pCPA Bic; pCPA Bic+Allo ($p < 0, 01$; $p < 0, 001$, respectivamente) respecto del grupo pCPA Allo. Resulta interesante que el tiempo de las AGR para el grupo pCPA Bic y el depletado fuera semejante y que para el grupo pCPA Bic+Allo la diferencia fuera mayor (para todas comparaciones el $F_{(3, 40)} = 22,33$).

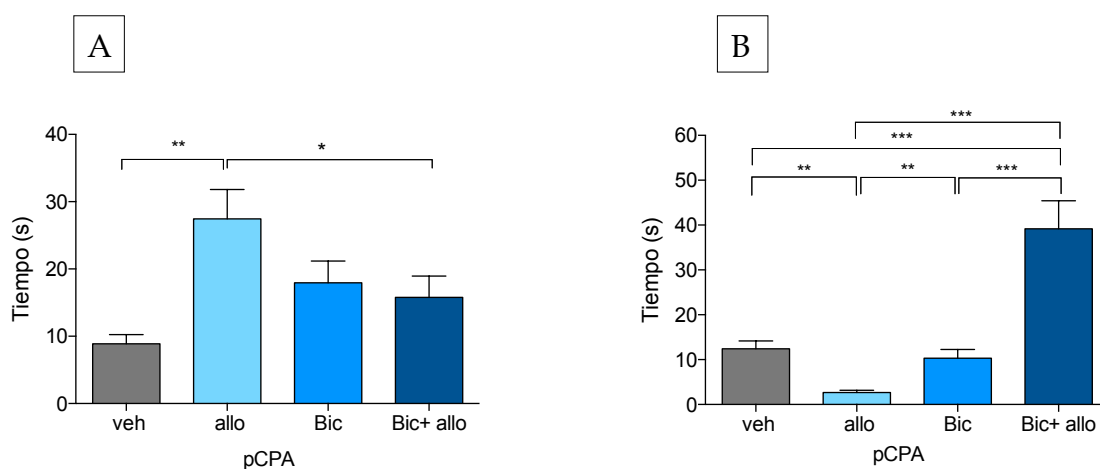


Figura 3. 17. Efecto de Allo y Bic sobre A: Latencia de Agresión (LAGR) y B: Conductas de Agresión (AGR). Prueba RI. A: LAGR. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de latencia. B: AGR. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de AGR. pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15; pCPA Bic n = 10; pCPA Bic Allo n = 10 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

En la Tabla 3. 10, podemos observar la distribución porcentual de las AGR. Se registró presencia de todas las AGR en los grupos con antagonista GABAérgico y Allo. A su vez, estos adoptaron porcentajes semejantes a los del grupo con depleción. Estos datos se correspondieron y reforzaron con los datos de disminución de la LAGR y aumentos de las AGR, en los grupos previamente tratados con el antagonista GABAérgico.

Tabla 3. 10
Distribución de las Conductas de Agresión (AGR). Prueba RI.

AGR	pCPA			
	veh	Allo	Bic	Bic Allo
Pisadas	18,2	33,04	21,2	23,2
Falsas montas	28,8	32,17	25	18,3
Persecuciones	23,6	-	13,9	20,3
Ataques laterales	3,8	5,21	-	9,3
Trabas de ataque	19,2	29,56	21,9	16,6
Mordidas	6,4	-	18	10,3

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta al momento de medir el tiempo de las AGR en los grupos. Las conductas están ordenadas de menor a mayor grado de agresividad.

3. 1. a. 2. Sistema Serotonérgico

En la primera etapa de la prueba, no se observaron cambios en la AL en ninguno de los grupos ($F_{(3, 38)} = 0,4344$ $p = 0,7297$) (Figura 3. 18). Una respuesta semejante observamos en la segunda etapa del RI, la CnS ($F_{(3, 38)} = 1,646$; $p = 0,1976$) y la CS ($F_{(3, 38)} = 1,614$; $p = 0,2018$) no mostraron diferencias entre los grupos. (Figura 3. 19. A; Figura 3. 19. B).

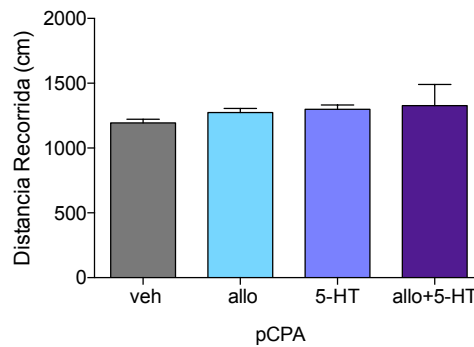


Figura 3. 18. Efecto de Allo y 5-HT sobre Actividad Locomotora (AL).

Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la distancia recorrida en cm. pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15; pCPA 5-HT n = 9; pCPA Allo 5-HT n = 9. No significativo para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

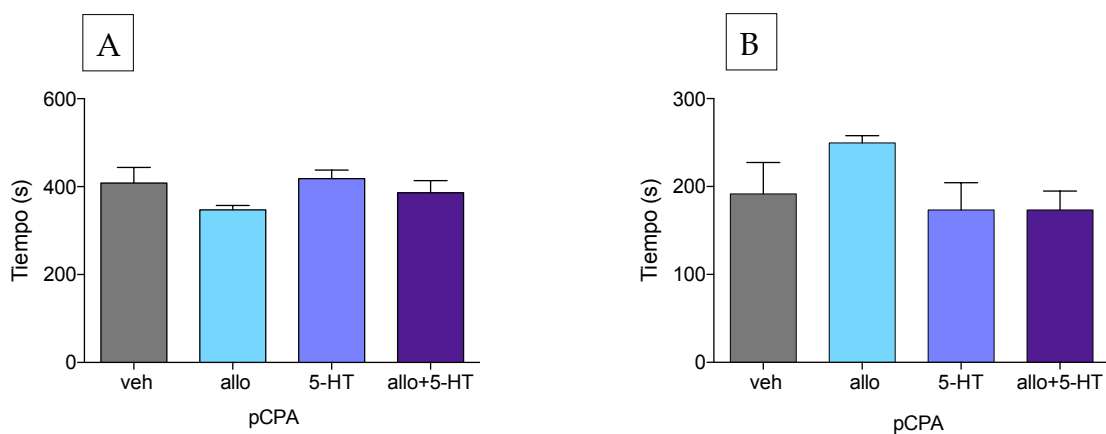


Figura 3. 19. Efecto de Allo y 5-HT sobre la A: Conductas no Sociales (CnS) y B: Conductas Sociales (CS).

Prueba RI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de las CS y CnS. pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15; pCPA 5-HT n = 9; pCPA Allo 5-HT n = 9. No significativo para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

En la Tabla 3. 11. y la Tabla 3. 12, se muestra la distribución porcentual de cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta en las CnS y CS, en comparación a los grupos depletados con administración serotoninérgica.

Nuevamente las conductas de olfacción aportaron datos de valor complementario. Pudimos observar que, en el caso de las CnS, los animales con administración sola de 5-HT destinaron mayor porcentaje de tiempo en acicalamiento (64,9%) y menos en olfateo (30,3%). Mientras que cuando agregamos Allo previamente a 5-HT (pCPA Allo+ 5-HT), observamos mayor porcentaje de tiempo en olfateo (53,31%), comparable al tiempo que destinaron los animales con administración de Allo solamente (grupo pCPA Allo).

En cuanto a las CS pudimos observar algo similar. Todos los grupos destinaron mayor porcentaje de tiempo a la olfacción ano-genital, a excepción del grupo que recibió 5-HT solamente.

Tabla 3. 11
Distribución de las Conductas no Sociales (CnS). Prueba RI.

CnS	veh	pCPA		
		Allo	5-HT	Allo 5-HT
Acicalamiento	13,63	16	64,9	27,53
Olfateo	79,54	68,4	30,3	53,31
Alzarse en dos patas	6,81	15,6	4,8	19,17

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CnS en los grupos.

Tabla 3. 12
Distribución de las Conductas Sociales (CS). Prueba RI.

CS	veh	pCPA		
		Allo	5-HT	Allo 5-HT
Acicalamiento Social	21,29	44,53	60,32	29,43
Olfateo ano-genital	78,71	55,46	39,68	70,57

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas, al momento de evaluar las CS en los grupos

Como previamente observamos, Allo recuperó el tiempo de LAGR ($p < 0,01$) respecto de los animales con depleción. Curiosamente, la administración de 5-HT no recupera la LAGR, sino que se asemeja al grupo con depleción. Allo fue capaz de recuperar la LAGR y observamos una diferencia significativa ($p < 0,05$) cuando se administró previamente (grupo pCPA Allo+5-HT), aunque se observan diferencias ($p < 0,05$) entre pCPA Allo y pCPA Allo+5-HT, lo que indica una interesante interferencia producida por 5-HT en LAGR (para todas comparaciones el $F_{(3,38)} = 29,62$) (Figura 3. 20. A).

En cuanto al tiempo de AGR, podemos observar que Allo disminuyó significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,001$) el tiempo de AGR respecto de todos los grupos y que la administración de 5-HT, ya sea sola o posterior a Allo (grupo pCPA 5-HT; pCPA Allo+5-HT), no logró disminuir el tiempo de las AGR, sino que por el contrario, la aumentó (para todas comparaciones el $F_{(3,38)} = 8,48$) (Figura 3. 20. B).

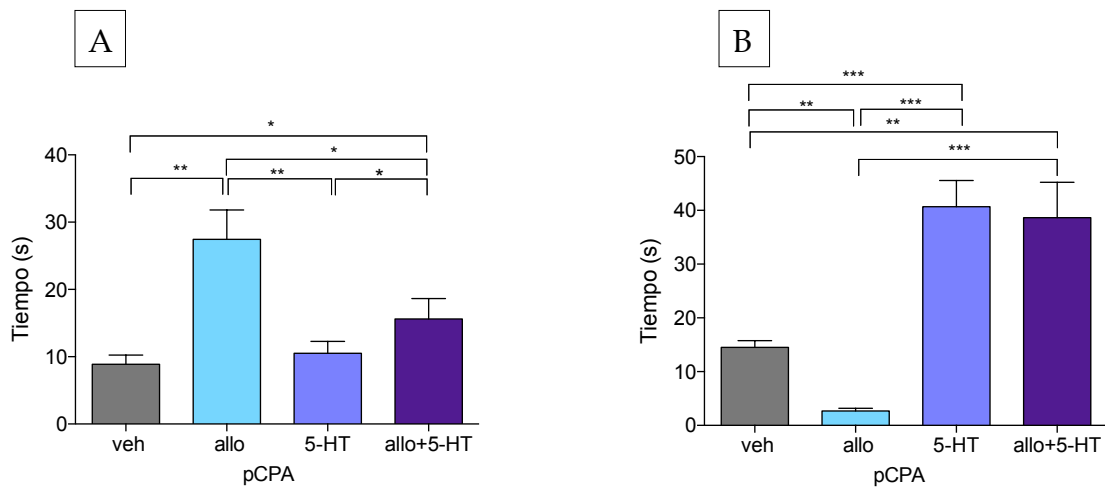


Figura 3. 20. Efecto de Allo y 5-HT sobre A) Latencia de Agresión (LAGR) y B) Conductas de Agresión (AGR). Prueba RI. A: LAGR. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de latencia. B: AGR. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de A. pCPA veh n = 9; pCPA Allo n = 15; pCPA 5-HT n = 9; pCPA Allo 5-HT n = 9. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para ANOVA I, *post hoc* Tuckey.

En la Tabla 3. 13 se muestra la distribución porcentual de las conductas AGR. Como pudimos observar, 5-HT no logró recuperar el tiempo de AGR, ni de LAGR, aunque el tiempo destinado a las conductas de AGR, fue a las conductas

cualitativamente menos agresivas en comparación con los grupos con depleción, lo que indica un grado de recuperación de las AGR mediada por Allo.

Tabla 3. 13
Distribución de las AGR

AGR	veh	pCPA		
		Allo	5-HT	Allo 5-HT
Pisadas	18,2	33,04	82,35	77,92
Falsas montas	28,8	32,17	8,82	11,25
Persecuciones	23,6	-	5,88	0,86
Ataques laterales	3,8	5,21	2,94	9,85
Trabas de ataque	19,2	29,56	2,94	-
Mordidas	6,4	-	-	0,86

Los resultados se expresan como porcentajes (%) de tiempo destinado a cada una de las conductas que se tuvieron en cuenta, al momento de medir el tiempo de las AGR en los grupos. Las conductas están ordenadas de menor a mayor grado de agresividad.

3. 2. Conclusiones Parciales

Es importante que las conclusiones parciales sean vistas en conjunto. Observamos que al momento de administrar un antagonista GABAérgico, las respuestas de los parámetros de agresión no fueron recuperadas sino que, por el contrario, aumentaron. El mismo efecto fue observado al administrar agonistas serotoninérgicos. Ambos resultados nos permiten pensar en mecanismos de neurotransmisión conjuntos y recíprocos, capaces de intervenir en la conducta agresiva. Aunque la administración de Allo, posterior o previa, en los grupos con antagonistas o agonistas específicos respectivamente, aumenta el porcentaje de tiempo destinado a las conductas cualitativamente menos agresivas y aumenta el porcentaje de tiempo destinado al acicalamiento social. Esto indicaría una acción positiva de Allo sobre las conductas agresivas desadaptativas.

CAPÍTULO 4

Discusión

Los procesos de interacción social, entre los que se encuentra la conducta agresiva, están regulados por factores biológicos y ambientales variados. La conducta agresiva puede alternar en un continuo que abarca desde repuestas normativas hasta desadaptativas y patológicas de la especie. Los NS ejercen funciones modulatorias sobre los sistemas de neurotransmisión que median las interacciones sociales. En este trabajo de tesis doctoral, hemos estudiado el rol del esteroide neuroactivo Allo, administrado i.c.v, en un modelo de comportamiento agresivo territorial en ratas macho, generado por la depleción del sistema serotoninérgico. Es sabido que Allo muestra efectos positivos sobre enfermedades psiquiátricas que presentan como uno de sus signos la agresión. A su vez, hemos estudiado si estos efectos tienen lugar en el BO, la estructura con mayor valor de interacción social para los roedores, y si los mismos se corresponden a respuestas de membrana o a cambios en la expresión de genes específicos. Por otro lado, estudiamos si los efectos conductuales responden a la acción de Allo sobre un único sistema o sobre más de uno. Esta propuesta aporta conocimientos sobre los mecanismos de acción que subyacen a los NS, en las conductas de interacción social, entre ellas la agresión.

La vasta evidencia, que se originó con Jéquier et al. (1967), muestra que la administración i.p. única de pCPA, inhibe las enzimas de paso de 5-HT (TPH1 y TPH2), lo que resulta en la disminución de los niveles de 5-HT y 5-HIAA. Los niveles comienzan a restablecerse desde el tercer día hasta el doceavo, donde alcanzan niveles control. Adicionalmente, los bajos niveles encontrados de 5-HIAA en LCR de humanos y 5-HT en tejido cerebral de roedores y otras especies (Brown et al., 1979; Kohlert et al., 2012; Mongillo et al., 2014), permitieron establecer la hipótesis de deficiencia serotoninérgica como una explicación posible a la agresión entre humanos. Brown et al. (1979) observaron que las personas con rasgos agresivos también mostraron bajos puntajes en los tests de interacción social, lo que indica una deficiencia en el repertorio de habilidades sociales. Otros estudios,

realizados en humanos sometidos a una dieta con dosis bajas de triptófano, mostraron puntajes más altos en los tests de agresión, pero sin afección de las habilidades sociales (Bjork et al., 1999; Kaye et al., 2000). Sin embargo, los autores Koolhaas et al. (2013) Takahashi y Miczek, (2014), coinciden e insisten en que, al momento de trasladar estos resultados a modelos en animales, debe tenerse en cuenta la complejidad cualitativa y cuantitativa de la agresión en la especie. Por ello, al momento de establecer las conductas, tuvimos en cuenta parámetros que conciliaran ambas características en la prueba que más aceptación tiene para modelos animales de conducta agresiva territorial (Miczek et al., 2013). De acuerdo con todos ellos, nuestros datos muestran que la administración de pCPA generó un aumento de todas las conductas de agresión (BA y AA) y una disminución en la LAGR en la prueba RI (Miczek et al., 2013), sin afectar el tiempo de CnS y CS. A diferencia de nuestro modelo, otros autores, que encuentran diferencias entre CnS y CS, utilizan diferentes métodos de modelado (Goodell et al., 2017) o estudian otros tipos de agresión, como la agresión materna (Toth et al., 2012), y de allí las diferencias encontradas en nuestros resultados.

Interesantemente, el grupo que fue evaluado al sexto día de la prueba mostró un aumento de las conductas cualitativamente más agresivas (ataques laterales, trabas de ataque y mordidas). Es posible interpretar este dato en un contexto de mayores días de aislamiento, teniendo en cuenta que Valzelli et al. (1981) encontraron parámetros de agresión desadaptativa en un test RI realizado un día después del tratamiento oral con pCPA (150 mg/kg), aunque nuestros cambios se condicen con una conducta agresiva territorial desadaptativa y con muy bajas alteraciones en CS y CnS, tal como indican Takahashi y Miczek (2014). Podemos decir, entonces, que la diferencia entre la AA y la BA nos permitió elegir el sexto día pos-pCPA para realizar los experimentos ulteriores, ya que la AA se enmarca en la agresión territorial desadaptativa y, como muestran otros trabajos, exceden los comportamientos normativos de la especie sin alteraciones de otras conductas de interacción (Haller y Kruk 2006; Miczek et al., 2004; Nelson y Trainor 2007).

El olfato es el componente sensorial fundamental de comunicación entre roedores y el primer centro de procesamiento en el BO, una estructura que ha sido

dejada de lado al estudiar la agresión territorial. La inervación serotoninérgica originada en los NR hacia las distintas estructuras encefálicas, tiene su principal centro sináptico en el BO. En esta línea, Huang et al. (2017) mostraron que la 5-HT reduce la amplitud de la entrada sensorial en la primera etapa sináptica del procesamiento del olor. Nuestros resultados muestran que la concentración de 5-HT en el BO estaba disminuida en los animales sometidos al test RI el sexto día pos-pCPA. Esta disminución de 5-HT afecta, entre otras, la transmisión sináptica en la CG del BO, donde la densidad de las fibras de 5-HT es mayor. En la CG, las células mitrales, luego de la activación serotoninérgica, liberan GABA que posteriormente activará los receptores GABA_A, y disminuirá la amplitud de información sensorial (Crespo et al., 2013). En concentraciones bajas de 5-HT, las células mitrales no podrían disminuir la amplitud de información sensorial y aumentarían, de esta manera, la agresión territorial. Si bien no pudimos observar que la depleción por pCPA provocara una modificación en la concentración de 5-HIAA, sí pudimos demostrar que el recambio entre 5-HIAA/5-HT disminuyó en los animales tratados, lo que guarda una directa relación con otros resultados previamente reportados (Hritcu, et al., 2007; Koe y Weissman, 1966). También, pudimos demostrar que existe una alta correlación negativa registrada al sexto día pos-pCPA entre la baja concentración de 5-HT y las conductas AA. Todos estos datos en conjunto, nos alientan a pensar que se instalarían cambios plásticos en la internación serotoninérgica en el BO y que ello se encuentra de acuerdo con la hipótesis de deficiencia serotoninérgica (Mongillo et al., 2014).

Dada la importancia del papel que juega el BO en la conducta agresiva, medimos la expresión de ARNm de la enzima TPH2, que da paso a 5-HT en el encéfalo. Se han reportado hallazgos de la expresión de TPH2 en el BO de otras especies (Raghuveer et al., 2011). Sin embargo, la expresión génica de TPH2 en ratas ha sido descrita, únicamente, en neuronas del rafe (Walther et al., 2003), ya que allí se encuentran los somas de las neuronas productoras de 5-HT (Hernández-Vázquez et al., 2018). En nuestro estudio, encontramos que los animales tratados con pCPA muestran un aumento de la expresión de TPH2, respecto de la expresión de los controles. Por ello, este dato resulta por demás llamativo. Zill et al., (2007), en un estudio en encéfalos humanos *post-mortem*,

demonstraron la presencia de TPH2 en corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo y NR. Además, otros estudios han mostrado la presencia de la proteína TPH1 y TPH2 o la expresión del ARNm de ellas en diferentes regiones del cerebro (Berenguer et al., 2003; Khan y Thomas, 2004; Malek et al., 2005; Miguez et al., 1991; Popova et al., 2001). Este hallazgo nos sugiere dos cosas: que la administración de un inhibidor enzimático podría iniciar un mecanismo de compensación en la expresión del gen y que, a la vez, existiría un sistema, no descrito anteriormente, independiente del NR en el BO. Este último dato requiere de estudios inmunohistoquímicos adicionales.

Luego de establecer un modelo de agresión territorial desadaptativa, y sabiendo la importancia de los esteroides neuroactivos en las conductas sociales, nos dispusimos a responder cuál sería el rol de Allo en la conducta agresiva. Utilizando concentraciones similares a las informadas por Kaura et al., (2007) pudimos observar que la administración de Allo en los animales con depleción serotoninérgica por pCPA aumentó la LAGR y disminuyó las AGR, así como el porcentaje de tiempo destinado a las AGR en los animales tratados. Estos hallazgos se condicen con las conductas cualitativamente menos agresivas propuestas por Takahashi y Miczek (2014), ya que los animales mostraron una marcada tendencia a la integración social. Otros hallazgos reportados por Fish et al. (2001), describen un aumento de la agresión luego de una administración i.p. de Allo. Es importante tener en cuenta que la observación de efectos bifásicos en los esteroides neuroactivos es frecuente. Estos resultados, como sostiene Miczek et al. (2003), encuentran una explicación en la concentración utilizada y la vía de administración. Conjuntamente a esta explicación, no nos sorprende observar que, en los sujetos sin depleción serotoninérgica, hay un aumento en la LAGR y una disminución de las AGR, asociados a un aumento de la sedación. En concordancia con la propuesta de sedación en los animales sin depleción, los parámetros de AL, CnS y CS, no presentaron diferencias entre los grupos con depleción serotoninérgica por pCPA, lo que sugiere una disminución de la agresión exclusivamente mediada por Allo en estos grupos.

En relación a la evaluación de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA, en el BO de los animales con depleción serotoninérgica, Allo logró aumentar la

concentración de ambas. Además, observamos un aumento en el índice de recambio. Esto muestra una modificación en el catabolismo del sistema serotoninérgico. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios (Robichaud y Debonnel, 2004), donde se demostró que la administración i.c.v. de Allo en ratas hembra aumenta la tasa de disparos de las neuronas serotoninérgicas *in vivo* en los NR y sugieren una acción directa de Allo sobre las neuronas serotoninérgicas, con un consecuente aumento de la concentración en el BO de machos. Una explicación posible es que Allo haya mediado sus efectos por una modulación alostérica de los receptores GABA_A en el rafe (Hernández-Vázquez et al., 2018). Si bien sabemos que los receptores GABA_A están distribuidos en todo el encéfalo, también está documentado que la modulación del disparo desde los NR hacia el BO es producto de un delicado equilibrio entre los autorreceptores, 5-HT_{1A/1B}, inhibitorios (McDevitt, 2011), y los receptores GABA_A de las neuronas de los NR (Hernández-Vázquez et al., 2018).

Sabiendo que TPH2 aumentó en el BO luego de inyectar pCPA y que la concentración de 5-HT aumentó en los grupos tratados con Allo, buscamos determinar si el tratamiento con Allo modificó la expresión de TPH2. Aunque este resultado requiere de técnicas inmunohistoquímicas para constatar la presencia de neuronas productoras de 5-HT en el BO, demostramos que Allo es capaz de disminuir la expresión de TPH2 en los animales con depleción.

Se ha postulado que el receptor GABA_A tiene funciones para la discriminación de las sustancias odoríferas (Urban y Arevian, 2009). Además, es bien sabido que la concentración circulante de esteroides neuroactivos, como Allo, puede modificar la expresión de las subunidades del receptor GABA_A (Carver y Reddy, 2016; Locci y Pinna, 2017) y que GABA_{A α 1} se expresa diferencialmente en las células mitrales del BO (Panzanelli et al., 2005). Específicamente, en nuestro trabajo buscamos estudiar si Allo, después de una administración aguda, modifica la expresión diferencial del ARNm de GABA_{A α 1} presente en los receptores sinápticos y GABA_{A δ} presente en los extrasinápticos. Curiosamente, observamos que la expresión del ANRm de GABA_{A α 1} se modificó en presencia de Allo, y no la expresión de GABA_{A δ} en el BO. Es muy interesante que sea GABA_{A α 1} la que reviste un cambio ya que, de acuerdo con los resultados reportados por Panzanelli et al.

(2005), las células del BO presentan expresión de GABA_{Aα1} de forma preferencial al resto de otras subunidades α. A diferencia de nuestros datos, varios trabajos (Carver et al., 2014; Wu et al., 2013) encontraron que la expresión de GABA_{Aδ} en presencia de esteroides neuroactivos se modifica en otras áreas del encéfalo, luego de mayor tiempo de exposición a los mismos (Pinna et al., 2004). Los resultados encontrados en tratamientos con esteroides neuroactivos para disminuir la agresión, pueden deberse a la diversidad de subunidades y conformaciones del receptor GABA_A (Matsumoto et al., 2007; Pinna et al., 2004), como sugieren nuestros resultados.

Un análisis integral de estos resultados implicaría que Allo i.c.v. reduce los niveles de ARNm de la subunidad GABA_{Aα1} en el BO, compensando la alta demanda de síntesis de esta subunidad, que es causada por la depleción serotoninérgica en un animal con rasgos de conducta agresiva. Una modulación positiva en la actividad GABAérgica, por Allo, en el BO, podría inducir un patrón más intenso de actividad neuronal facilitando la comparación entre los recuerdos almacenados y los nuevos adquiridos en el test, lo que lleva a una discriminación más fácil del oponente y cambios en comportamientos asociados al patrón de conducta agresiva adaptativa de la especie. En el BO, Allo puede contribuir, entonces, a los mecanismos de discriminación olfativa, mediados por los sistemas GABAérgicos y serotoninérgicos, ya que son fundamentales para las conductas de interacción social en los roedores. La inclinación a no agredir e interactuar igualmente con los intrusos, luego de la administración de Allo, debe guardar un grado de relación con las subunidades del receptor GABA_A en el BO, que produciría una discriminación olfativa diferencial de las señales químicas presentes en el contexto del territorio.

Por otro lado, e intentando esclarecer los mecanismos de neurotransmisión, se ha demostrado que Allo tiene efectos opuestos y complementarios sobre los mecanismos de neurotransmisión inhibitorios y excitatorios (Paul et al., 2020). Hemos observado que la dosis administrada de Bic no modifica los tiempos de AGR ni de LAGR. Resulta de especial interés analizar en conjunto estos resultados con la alta demanda del GABA_{Aα1} evidenciada en los grupos depletados de 5-HT, ya que Mandel et al. (1983) reporta disminuciones de la conducta agresiva al tratar

con agonistas de GABA_A y nosotros encontramos resultados opuestos. Podemos decir que es posible que Bic encuentre en estos animales una menor oferta de sitios de acción disponibles. Interesantemente, al administrar Bic y Allo aumentaron los tiempos de AGR. Un estudio de Gourley et al. (2005), donde utilizaron el mismo método de administración usado en esta tesis, mostró, por un lado, que las benzodiazepinas (agonistas GABA_A) aumentan la conducta agresiva y disminuyen la marcha (comparable con la AL) de forma dosis-dependiente. Por otro lado, demostró que los resultados se invierten al administrar previamente antagonistas GABAérgicos. En nuestros estudios, pudimos probar que una dosis única y aguda de Allo disminuye el tiempo de AGR y LAGR, sin modificar el resto de los parámetros (AL, CnS y CS). Sin embargo, y de acuerdo con otros resultados (Weir et al., 2004), los esteroides neuroactivos tienen un efecto 20 a 200 veces mayor que las benzodiazepinas y sus efectos no se limitan al receptor GABA_A. Es posible entonces, que estos resultados encuentren una explicación a través de la activación del receptor N-metil-D-aspartico. Giulliani et al. (2011) demostraron efectos moduladores de Allo sobre el receptor N-metil-D-aspartico y concluyeron que existen acciones del esteroide neuroactivo sobre el sistema glutamatérgico hipotalámico. Es sabido además, que la administración de fármacos con afinidad competitiva por el receptor GABAérgico, disminuye las posibilidades de unión al receptor. De esta manera, los resultados encontrados al administrar Allo, podrían deberse a una modulación de otros receptores en otras áreas del cerebro (hipocampo, CPF, hipotálamo), aumentando así, el tiempo de AGR en los animales con antagonismo GABAérgico central.

Por otro lado, evidenciamos que la administración de Allo produjo un aumento de la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el BO, lo que aporta hallazgos que concuerdan con la hipótesis de deficiencia serotoninérgica en la agresión. Opuesto a la mencionada hipótesis, al administrar 5-HT i.c.v. observamos que durante la prueba de RI los animales aumentaron las AGR, sin modificar LAGR, CnS y CS. Un inconveniente de la hipótesis de deficiencia serotoninérgica es que siempre se ha sostenido en relación a mediciones posteriores a encuentros agresivos (Brown et al., 1979; Mongillo et al., 2014; Kohlert et al., 2012). Asimismo, hay reportes (de Boer y Koolhaas, 2005) que muestran que la actividad del sistema

serotonérgico podría estar aumentada durante los encuentros agresivos. Otros estudios (van Erp y Miczek, 2000) han mostrado que, durante los encuentros agresivos, no hay disminuciones de 5-HT en el núcleo accumbens o la CPF, pero que en estos casos sí se modifica la actividad del sistema dopaminérgico. En nuestro modelo, la administración de Allo previa a 5-HT modificó los tiempos observados de AGR y de LAGR en su valor absoluto, y observamos que, dentro del análisis de los porcentajes de tiempo de AGR, rotan hacia una condición social cualitativamente menos agresiva, aumentando los tiempos de conductas agresivas más adaptativas, sin dejar de lado la tendencia a la territorialidad. Finalmente, estos resultados nos llevan a proponer estudios a futuro, que faciliten las mediciones durante los encuentros agresivos y nos permitan explicar las posibles modulaciones en los sistemas involucrados aquí estudiados.

En conjunto, todos estos resultados nos brindan aproximaciones para el entendimiento de los mecanismos que atañen a las conductas de interacción y nos permiten mejorar la comprensión del rol de Allo en los mecanismos de neurotransmisión que subyacen a las conductas agresivas.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

Tomados en conjunto, estos resultados proponen que:

- La administración de pCPA produce un aumento de las conductas agresivas cualitativas y cuantitativas que exceden los parámetros adaptativos de agresión territorial. Estos datos muestran que pCPA puede ser un fármaco con validez de apariencia y constructo al momento de elegir un modelo de inducción de la agresión.
- Nuestros datos aportan evidencia sobre la hipótesis de deficiencia serotoninérgica de la agresión y muestran que el BO, puede ser una estructura con neuronas productoras de 5-HT, independiente de los NR.
- El BO es un centro sensitivo de información que modera la respuesta de agresión de forma 5-HT-dependiente.
- La administración de Allo en el encéfalo revierte los efectos causados por pCPA, particularmente por un mecanismo de inhibición en el BO que permite una facilitación de la discriminación adaptativa frente a un intruso en el territorio.
- Allo aumenta la actividad serotoninérgica en el BO.
- Las conductas agresivas posteriores a la administración de Allo son de bajo espectro agresivo, o sea, cualitativamente menos agresivas.
- Allo induce cambios génicos del GABA_{Aα1} y de TPH2, como un modulador rápido.

Los datos presentados, muestran un mecanismo por el cual Allo podría ejercer cambios en las conductas de interacción social. El cambio adaptativo implica una acción novedosa y aguda de Allo sobre el sistema con mayor implicancia en la conducta agresiva, el sistema serotoninérgico. Además de la acción

clásica sobre los receptores GABA_A, sugerimos un mecanismo génico que permitiría una respuesta adecuada entre individuos de una misma especie, en la principal estructura de reconociendo de los coespecíficos, el BO. La reciente aprobación de Allo (análogo sintético brexanolona) como una droga de tratamiento para la depresión posparto nos hace pensar que podría ser beneficiosa para el tratamiento de la agresión desadaptativa o patológica, que aparece como parte de la semiología en enfermedades psiquiátricas.

CAPÍTULO 6

Bibliografía

- Agís-Balboa, R. C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., & Guidotti, A. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14602–14607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606544103>
- Albrecht, B., Staiger, P. K., Hall, K., Miller, P., Best, D., & Lubman, D. I. (2014). Benzodiazepine use and aggressive behaviour: a systematic review. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 48(12), 1096–1114. <https://doi.org/10.1177/0004867414548902>
- Araneda, S., Gamrani, H., Font, C., Calas, A., Pujol, J. F., & Bobillier, P. (1980). Retrograde axonal transport following injection of [3H]-serotonin into the olfactory bulb. II. Radioautographic study. *Brain research*, 196(2), 417–427. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90405-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90405-9)
- Archer J. (2006). Testosterone and human aggression: an evaluation of the challenge hypothesis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 30(3), 319–345. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.12.007>
- Asensio, J. A., Cáceres, A., Pelegrina, L. T., Sanhueza, M., Scotti, L., Parborell, F., & Laconi, M. R. (2018). Allopregnanolone alters follicular and luteal dynamics during the estrous cycle. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 16(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0353-y>
- Bartholow B. D. (2018). The aggressive brain: insights from neuroscience. *Current opinion in psychology*, 19, 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.002>
- Batra, S. K., Metzgar, R. S., & Hollingsworth, M. A. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of the human ribosomal protein S16. *The Journal of biological chemistry*, 266(11), 6830–6833.
- Belelli, D., & Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(7), 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrn1703>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual review of medicine*, 60, 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Berenguer, P., Soulage, C., Perrin, D., Pequignot, J. M., & Abraini, J. H. (2003). Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 74(4), 997–1003. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(03\)00027-3](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(03)00027-3)
- Berman M. E. (1997). Biopsychosocial approaches to understanding human aggression: the first 30 years. *Clinical psychology review*, 17(6), 585–588. [https://doi.org/10.1016/s0272-7358\(97\)00035-4](https://doi.org/10.1016/s0272-7358(97)00035-4)
- Bjork, J. M., Dougherty, D. M., Moeller, F. G., Cherek, D. R., & Swann, A. C. (1999). The effects of tryptophan depletion and loading on laboratory aggression in men: time course and a food-restricted control. *Psychopharmacology*, 142(1), 24–30. <https://doi.org/10.1007/s002130050858>
- Blanchard, R.J., Ohl, F., van Kampen, M., Blanchard, D.C. and Fuchs, E. (2001), Attack and defense in conspecific fighting in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Aggr. Behav.*, 27: 139-148. <https://doi.org/10.1002/ab.6>
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2003). The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 97–116. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01276-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01276-7)

- Blair, R. J., Peschardt, K. S., Budhani, S., Mitchell, D. G., & Pine, D. S. (2006). The development of psychopathy. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 47(3-4), 262–276. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2006.01596.x>
- Boles, S. M., & Miotto, K. (2003). Substance and violence: A review of the literature. *Aggression and Violent Behavior*, 8(2), 155–174. [https://doi.org/10.1016/S1359-1789\(01\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S1359-1789(01)00057-X)
- Bonansco, C., Martínez-Pinto, J., Silva, R. A., Velásquez, V. B., Martorell, A., Selva, M. V., Espinosa, P., Moya, P. R., Cruz, G., Andrés, M. E., & Sotomayor-Zárate, R. (2018). Neonatal exposure to oestradiol increases dopaminergic transmission in nucleus accumbens and morphine-induced conditioned place preference in adult female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 30(7), e12574. <https://doi.org/10.1111/jne.12574>
- Boyko, M., Kutz, R., Grinshpun, J., Zvenigorodsky, V., Gruenbaum, B. F., Gruenbaum, S. E., Frenkel, A., Brotfain, E., Israel Melamed, Frank, D., Zeldetz, V., & Zlotnik, A. (2019). The effect of depressive-like behavior and antidepressant therapy on social behavior and hierarchy in rats. *Behavioural brain research*, 370, 111953. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111953>
- Baulieu E. E. (1991). Neurosteroids: a new function in the brain. *Biology of the cell*, 71(1-2), 3–10. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(91\)90045-o](https://doi.org/10.1016/0248-4900(91)90045-o)
- Brain, P., & Benton, D. (1979). The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. *Life sciences*, 24(2), 99–115. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90119-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90119-x)
- Broadwell, R. D., & Jacobowitz, D. M. (1976). Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. III. The ipsilateral centrifugal fibers to the olfactory bulbar and retrobulbar formations. *The Journal of comparative neurology*, 170(3), 321–345. <https://doi.org/10.1002/cne.901700305>
- Brown, G. L., Goodwin, F. K., Ballenger, J. C., Goyer, P. F., & Major, L. F. (1979). Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites. *Psychiatry research*, 1(2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(79\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0165-1781(79)90053-2)
- Brown, N., Kerby, J., Bonnert, T. P., Whiting, P. J., & Wafford, K. A. (2002). Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *British journal of pharmacology*, 136(7), 965–974. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704795>
- Buhot, M. C., Martin, S., & Segu, L. (2000). Role of serotonin in memory impairment. *Annals of medicine*, 32(3), 210–221. <https://doi.org/10.3109/07853890008998828>
- Butler, T., Schofield, P. W., Greenberg, D., Allnutt, S. H., Indig, D., Carr, V., D'Este, C., Mitchell, P. B., Knight, L., & Ellis, A. (2010). Reducing impulsivity in repeat violent offenders: an open label trial of a selective serotonin reuptake inhibitor. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 44(12), 1137–1143. <https://doi.org/10.3109/00048674.2010.525216>
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(1), 1–56. <https://doi.org/10.1006/frne.1999.0188>
- Carré, J. M., McCormick, C. M., & Hariri, A. R. (2011). The social neuroendocrinology of human aggression. *Psychoneuroendocrinology*, 36(7), 935–944. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.02.001>
- Cansler HL, Maksimova, MA; Meeks JP (2017). Experience-Dependent Plasticity in Accessory Olfactory Bulb Interneurons following Male–Male Social Interaction *Journal of Neuroscience* 26 July 2017, 37 (30) 7240-7252; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1031-17.2017>

- Carver, C. M., Wu, X., Gangisetty, O., & Reddy, D. S. (2014). Perimenstrual-like hormonal regulation of extrasynaptic δ -containing GABA_A receptors mediating tonic inhibition and neurosteroid sensitivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(43), 14181-14197. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0596-14.2014>
- Carver, C. M., & Reddy, D. S. (2013). Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology*, 230(2), 151-188. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3276-5>
- Casas, S., García, S., Cabrera, R., Nanfaro, F., Escudero, C., & Yunes, R. (2011). Progesterone prevents depression-like behavior in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in male rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 99(4), 614-618. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.06.012>
- Cáceres, A., Vega Orozco, A. S., Cabrera, R. J., & Laconi, M. R. (2020). "Rapid actions of the neurosteroid allopregnanolone on ovarian and hypothalamic steroidogenesis: Central and peripheral modulation". *Journal of neuroendocrinology*, 32(3), e12836. <https://doi.org/10.1111/jne.12836>
- Chamero, P., Marton, T. F., Logan, D. W., Flanagan, K., Cruz, J. R., Saghatelian, A., Cravatt, B. F., & Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 450(7171), 899-902. <https://doi.org/10.1038/nature05997>
- Chi, J. D., Odontiadis, J., & Franklin, M. (1999). Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 731(2), 361-367. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00255-8)
- Chisari, M., Eisenman, L. N., Covey, D. F., Mennerick, S., & Zorumski, C. F. (2010). The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors. *Trends in neurosciences*, 33(7), 299-306. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.03.005>
- Coccaro, E. F., & Kavoussi, R. J. (1997). Fluoxetine and impulsive aggressive behavior in personality-disordered subjects. *Archives of general psychiatry*, 54(12), 1081-1088. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1997.01830240035005>
- Coccaro E. F. (2010). A family history study of intermittent explosive disorder. *Journal of psychiatric research*, 44(15), 1101-1105. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.04.006>
- Coccaro, E. F., & Kavoussi, R. J. (2010). GH response to intravenous clonidine challenge: absence of relationship with behavioral irritability, aggression, or impulsivity in human subjects. *Psychiatry research*, 178(2), 443-445. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2010.03.018>
- Corpéchet, C., Leclerc, P., Baulieu, E. E., & Brazeau, P. (1985). Neurosteroids: regulatory mechanisms in male rat brain during heterosexual exposure. *Steroids*, 45(3-4), 229-234. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(85\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0039-128x(85)90072-8)
- Corthell, J. T., Stathopoulos, A. M., Watson, C. C., Bertram, R., & Trombley, P. Q. (2013). Olfactory bulb monoamine concentrations vary with time of day. *Neuroscience*, 247, 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.040>
- Crespo, C., Liberia, T., Blasco-Ibáñez, J. M., Náchter, J., & Varea, E. (2013). The circuits of the olfactory bulb. The exception as a rule. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 296(9), 1401-1412. <https://doi.org/10.1002/ar.22732>
- Cook, J. B., Dumitru, A. M., O'Buckley, T. K., & Morrow, A. L. (2014). Ethanol administration produces divergent changes in GABAergic neuroactive steroid immunohistochemistry in the

- rat brain. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 38(1), 90–99. <https://doi.org/10.1111/acer.12223>
- Datiche, F., Luppi, P. H., & Cattarelli, M. (1995). Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain research*, 671(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01293-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01293-q)
- David, D. J., & Gardier, A. M. (2016). Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique: Application à la réponse antidépressive [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]. *L'Encéphale: Revue de psychiatrie clinique biologique et thérapeutique*, 42(3), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2016.03.012>
- de Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (2005). 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *European journal of pharmacology*, 526(1-3), 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.065>
- de Olmos, J., Hardy, H., & Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *The Journal of comparative neurology*, 181(2), 213–244. <https://doi.org/10.1002/cne.901810202>
- Devall, A. J., Santos, J. M., Fry, J. P., Honour, J. W., Brandão, M. L., & Lovick, T. A. (2015). Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity in female rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(1), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.11.017>
- Diotel, N., Do Rego, J. L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M. M., Mironov, S., Vaudry, H., & Kah, O. (2011). Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. *The European journal of neuroscience*, 34(1), 45–56. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07731.x>
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., & Chaput, M. A. (2000). Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), 2383–2390. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-02383.2000>
- Dulac, C., Torello, A. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4, 551–562 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrn1140>
- Escudero, C., Casas, S., Giuliani, F., Bazzocchini, V., García, S., Yunes, R., & Cabrera, R. (2012). Allopregnanolone prevents memory impairment: effect on mRNA expression and enzymatic activity of hippocampal 3- α hydroxysteroid oxidoreductase. *Brain research bulletin*, 87(2-3), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.019>
- Escudero, C. (2014) Allopregnanolona: nuevos mecanismos moduladores sobre fenómenos de aprendizaje y memoria en la rata hembra. (Tesis de Doctorado). PROBIOL, Mendoza, Argentina.
- Escudero, C., Giuliani, F., Bernedo, M. M., Yunes, R., & Cabrera, R. (2019). Allopregnanolone reversion of estrogen and progesterone memory impairment: interplay with serotonin release. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 126(10), 1321–1328. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02052-6>
- Faroni, A., & Magnaghi, V. (2011). The neurosteroid allopregnanolone modulates specific functions in central and peripheral glial cells. *Frontiers in endocrinology*, 2, 103. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00103>

- Ferris, C. F., Stolberg, T., Kulkarni, P., Murugavel, M., Blanchard, R., Blanchard, D. C., Febo, M., Brevard, M., & Simon, N. G. (2008). Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC neuroscience*, 9, 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-111>
- Fish, E. W., Faccidomo, S., DeBold, J. F., & Miczek, K. A. (2001). Alcohol, allopregnanolone and aggression in mice. *Psychopharmacology*, 153(4), 473-483. <https://doi.org/10.1007/s002130000587>
- Fish, E. W., Whitman, B. J., DiBerto, J. F., Robinson, J. E., Morrow, A. L., & Malanga, C. J. (2014). Effects of the neuroactive steroid allopregnanolone on intracranial self-stimulation in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology*, 231(17), 3415-3423. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3600-8>
- Frye, C. A., & Walf, A. A. (2008). Progesterone enhances performance of aged mice in cortical or hippocampal tasks. *Neuroscience letters*, 437(2), 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.004>
- Frye, C. A., Rhodes, M. E., Petralia, S. M., Walf, A. A., Sumida, K., & Edinger, K. L. (2006). 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in the midbrain ventral tegmental area mediates social, sexual, and affective behaviors. *Neuroscience*, 138(3), 1007-1014. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.015>
- Frye, C. A., & Paris, J. J. (2011). Progesterone turnover to its 5 α -reduced metabolites in the ventral tegmental area of the midbrain is essential for initiating social and affective behavior and progesterone metabolism in female rats. *Journal of endocrinological investigation*, 34(7), e188-e199. <https://doi.org/10.3275/7334>
- Fukunaga, I., Berning, M., Kollo, M., Schmaltz, A., & Schaefer, A. T. (2012). Two distinct channels of olfactory bulb output. *Neuron*, 75(2), 320-329. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.017>
- Gago, N., Akwa, Y., Sananès, N., Guennoun, R., Baulieu, E. E., El-Etr, M., & Schumacher, M. (2001). Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia*, 36(3), 295-308. <https://doi.org/10.1002/glia.1117>
- Giacalone, E., Tansella, M., Valzelli, L., & Garattini, S. (1968). Brain serotonin metabolism in isolated aggressive mice. *Biochemical pharmacology*, 17(7), 1315-1327. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(68\)90069-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(68)90069-5)
- Giuliani, F. A., Yunes, R., Mohn, C. E., Laconi, M., Rettori, V., & Cabrera, R. (2011). Allopregnanolone induces LHRH and glutamate release through NMDA receptor modulation. *Endocrine*, 40(1), 21-26. <https://doi.org/10.1007/s12020-011-9451-8>
- Giuliani, F. A., Escudero, C., Casas, S., Bazzocchini, V., Yunes, R., Laconi, M. R., & Cabrera, R. (2013). Allopregnanolone and puberty: modulatory effect on glutamate and GABA release and expression of 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase in the hypothalamus of female rats. *Neuroscience*, 243, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.053>
- Gottfried-Blackmore, A., Sierra, A., Jellinck, P. H., McEwen, B. S., & Bulloch, K. (2008). Brain microglia express steroid-converting enzymes in the mouse. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(1-2), 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.12.013>
- Gourley, S. L., Debold, J. F., Yin, W., Cook, J., & Miczek, K. A. (2005). Benzodiazepines and heightened aggressive behavior in rats: reduction by GABA(A)/alpha(1) receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 178(2-3), 232-240. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1987-3>
- Goodell, DJ, Ahern, MA, Baynard, J., Wall, VL y Bland, ST (2017). Una nueva prueba de interacción social escapable revela que el comportamiento social y la activación de mPFC durante un encuentro social escapable se alteran por el aislamiento social posterior al destete y

- dependen de la agresividad de la rata de estímulo. *Investigación del cerebro conductual*, 317, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.025>
- Haller, J., van de Schraaf, J., & Kruk, M. R. (2001). Deviant forms of aggression in glucocorticoid hyporeactive rats: a model for 'pathological' aggression?. *Journal of neuroendocrinology*, 13(1), 102-107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00600.x>
- Haller, J., & Kruk, M. R. (2006). Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 30(3), 292-303. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.01.005>
- Haller, J. (2014). *Neurobiological bases of abnormal aggression and violent behaviour*. Springer-Verlag Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1268-7>
- Himmler, B. T., Pellis, V. C., & Pellis, S. M. (2013). Peering into the dynamics of social interactions: measuring play fighting in rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71), e4288. <https://doi.org/10.3791/4288>
- Hardy, A., Palouzier-Paulignan, B., Duchamp, A., Royet, J. P., & Duchamp-Viret, P. (2005). 5-Hydroxytryptamine action in the rat olfactory bulb: in vitro electrophysiological patch-clamp recordings of juxtglomerular and mitral cells. *Neuroscience*, 131(3), 717-731. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.034>
- Hernández-Vázquez, F., Garduño, J., & Hernández-López, S. (2018). GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Reviews in the neurosciences*, 30(3), 289-303. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0014>
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., & Smart, T. G. (2007). Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 116(1), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.011>
- Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 71(4), 533-554. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00746-8)
- Hritcu, L., Clicinschi, M., & Nabeshima, T. (2007). Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. *Physiology & behavior*, 91(5), 652-657. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.028>
- Huang, Z., Thiebaud, N., & Fadool, D. A. (2017). Differential serotonergic modulation across the main and accessory olfactory bulbs. *The Journal of physiology*, 595(11), 3515-3533. <https://doi.org/10.1113/IP273945>
- Irwin, R. W., Solinsky, C. M., Loya, C. M., Salituro, F. G., Rodgers, K. E., Bauer, G., Rogawski, M. A., & Brinton, R. D. (2015). Allopregnanolone preclinical acute pharmacokinetic and pharmacodynamic studies to predict tolerability and efficacy for Alzheimer's disease. *PLoS one*, 10(6), e0128313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128313>
- Jacobs, B. L., & Fornal, C. A. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 21(2 Suppl), 9S-15S. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00012-3)
- Jéquier, E., Lovenberg, W., & Sjoerdsma, A. (1967). Tryptophan hydroxylase inhibition: the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Molecular pharmacology*, 3(3), 274-278.
- Johnston G. A. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British journal of pharmacology*, 169(2), 328-336. <https://doi.org/10.1111/bph.12127>

- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). Principles of neural science. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kaura, V., Ingram, C. D., Gartside, S. E., Young, A. H., & Judge, S. J. (2007). The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABA(A) receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 17(2), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.02.006>
- Kaye, W. H., Gendall, K. A., Fernstrom, M. H., Fernstrom, J. D., McConaha, C. W., & Weltzin, T. E. (2000). Effects of acute tryptophan depletion on mood in bulimia nervosa. *Biological psychiatry*, 47(2), 151–157. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00108-0)
- Keele N. B. (2001). Phenytoin inhibits isolation-induced aggression specifically in rats with low serotonin. *Neuroreport*, 12(6), 1107–1112. <https://doi.org/10.1097/00001756-200105080-00012>
- Khan, I. A., & Thomas, P. (2004). Aroclor 1254 inhibits tryptophan hydroxylase activity in rat brain. *Archives of toxicology*, 78(6), 316–320. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0540-1>
- Koe, B.K. and Weissman, A. (1966) p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154: 499–516.
- Kohlert, J. G., Mangan, B. P., Kodra, C., Drako, L., Long, E., & Simpson, H. (2012). Decreased aggressive and locomotor behaviors in Betta splendens after exposure to fluoxetine. *Psychological reports*, 110(1), 51–62. <https://doi.org/10.2466/02.13.PR0.110.1.51-62>
- Kolonie, J. M., & Stern, J. M. (1995). Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO₄-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. *Hormones and behavior*, 29(4), 492–518. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1995.1285>
- Koolhaas, J. M., Coppens, C. M., de Boer, S. F., Buwalda, B., Meerlo, P., & Timmermans, P. J. (2013). The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (77), e4367. <https://doi.org/10.3791/4367>
- Kravitz, E. A., & Huber, R. (2003). Aggression in invertebrates. *Current opinion in neurobiology*, 13(6), 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.10.003>
- Krentzel, A. A., & Ramage-Healey, L. (2015). Sex differences and rapid estrogen signaling: A look at songbird audition. *Frontiers in neuroendocrinology*, 38, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.01.001>
- Krstić, M. K., & Djurković, D. (1981). Comparison of the cardiovascular responses to intracerebroventricular administration of tryptamine, 5-hydroxytryptamine, tryptophan and 5-hydroxytryptophan in rats. *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, 89(4), 385–391. <https://doi.org/10.3109/13813458109069488>
- Lesch, K. P., & Waider, J. (2012). Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*, 76(1), 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.013>
- Lima, F. B., & Spinelli de Oliveira, E. (2014). What is the impact of low testosterone levels on the anatomical and behavioral repertoire of long-term enriched housing of male mice?. *Behavioural processes*, 108, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.09.025>
- Linster, C., & Fontanini, A. (2014). Functional neuromodulation of chemosensation in vertebrates. *Current opinion in neurobiology*, 29, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.05.010>
- Liu, S., Aungst, J. L., Puche, A. C., & Shipley, M. T. (2012). Serotonin modulates the population activity profile of olfactory bulb external tufted cells. *Journal of neurophysiology*, 107(1), 473–483. <https://doi.org/10.1152/jn.00741.2011>
- Linnoila, M., Virkkunen, M., Scheinin, M., Nuutila, A., Rimon, R., & Goodwin, F. K. (1983). Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentration differentiates impulsive from

- nonimpulsive violent behavior. *Life sciences*, 33(26), 2609–2614. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(83\)90344-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(83)90344-2)
- London, S. E., & Clayton, D. F. (2010). Genomic and neural analysis of the estradiol-synthetic pathway in the zebra finch. *BMC neuroscience*, 11, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-46>
- Locci, A., & Pinna, G. (2017). Neurosteroid biosynthesis down-regulation and changes in GABAA receptor subunit composition: a biomarker axis in stress-induced cognitive and emotional impairment. *British journal of pharmacology*, 174(19), 3226–3241. <https://doi.org/10.1111/bph.13843>
- Lockmann, A., Laplagne, D. A., & Tort, A. (2018). Olfactory bulb drives respiration-coupled beta oscillations in the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*, 48(8), 2663–2673. <https://doi.org/10.1111/ejn.13665>
- Lorenz, K. (1971) Sobre la agresión: El pretendido mal. Iztapalala, Mexico. Siglo Veintiuno Editores.
- Malek, Z. S., Dardente, H., Pevet, P., & Raison, S. (2005). Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *The European journal of neuroscience*, 22(4), 895–901. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04264.x>
- Malkesman, O., Maayan, R., Weizman, A., & Weller, A. (2006). Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behavioural brain research*, 175(2), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.09.017>
- Manchia, M., Carpiniello, B., Valtorta, F., & Comai, S. (2017). Serotonin Dysfunction, Aggressive Behavior, and Mental Illness: Exploring the Link Using a Dimensional Approach. *ACS chemical neuroscience*, 8(5), 961–972. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00427>
- Mandel, P., Ciesielski, L., Maitre, M., Simler, S., Mack, G., & Kempf, E. (1979). Involvement of central GABA-ergic systems in convulsions and aggressive behavior. *Advances in experimental medicine and biology*, 123, 475–492. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-5199-1_30
- Mandel, P., Ciesielski, L., Maitre, M., Simler, S., Kempf, E., & Mack, G. (1981). Inhibitory amino acids, aggressiveness, and convulsions. *Advances in biochemical psychopharmacology*, 29, 1–9.
- Mandel, P., Kempf, E., Simler, S., Puglisi, S., Ciesielski, L., & Mack, G. (1983). Comparison of the effects of GABA-mimetic agents on two types of aggressive behavior. *Advances in biochemical psychopharmacology*, 37, 149–161.
- Maninger, N., Wolkowitz, O. M., Reus, V. I., Epel, E. S., & Mellon, S. H. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(1), 65–91. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.11.002>
- Marler P. (2005). Ethology and the origins of behavioral endocrinology. *Hormones and behavior*, 47(4), 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.01.002>
- Marler, P. (1976). *Social organization, communication and graded signals: The chimpanzee and the gorilla*. In P. P. G. Bateson & R. A. Hinde (Eds.), *Growing points in ethology*. Cambridge U Press.
- Matsumoto, K., Puia, G., Dong, E., & Pinna, G. (2007). GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 10(1), 3–12. <https://doi.org/10.1080/10253890701200997>
- McDevitt, R. A., & Neumaier, J. F. (2011). Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective. *Journal of chemical neuroanatomy*, 41(4), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.001>

- McKenzie-Quirk, S. D., Girasa, K. A., Allan, A. M., & Miczek, K. A. (2005). 5-HT(3) receptors, alcohol and aggressive behavior in mice. *Behavioural pharmacology*, 16(3), 163-169. <https://doi.org/10.1097/00008877-200505000-00005>
- McKinney W.T. (1989) Basis of Development of Animal Models in Psychiatry: An Overview. In: Koob G.F., Ehlers C.L., Kupfer D.J. (eds) *Animal Models of Depression*. Birkhäuser Boston.
- McLean, J. H., & Shipley, M. T. (1987). Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 7(10), 3016-3028. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-10-03016.1987>
- Meera, P., Wallner, M., & Otis, T. S. (2011). Molecular basis for the high THIP/gaboxadol sensitivity of extrasynaptic GABA(A) receptors. *Journal of neurophysiology*, 106(4), 2057-2064. <https://doi.org/10.1152/jn.00450.2011>
- Mehta, A. K., & Ticku, M. K. (1999). An update on GABAA receptors. *Brain research. Brain research reviews*, 29(2-3), 196-217. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00052-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00052-6)
- Meneses A. (2007). Stimulation of 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A/2C, 5-HT3 and 5-HT4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short- and long-term memory. *Behavioural brain research*, 184(1), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.06.026>
- Miczek, K. A., Maxson, S. C., E. W., & Faccidomo, S. (2001). Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behavioural brain research*, 125(1-2), 167-181. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00298-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00298-4)
- Miczek, K. A., Fish, E. W., De Bold, J. F., & De Almeida, R. M. (2002). Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology*, 163(3-4), 434-458. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1139-6>
- Miczek, K. A., Fish, E. W., & De Bold, J. F. (2003). Neurosteroids, GABAA receptors, and escalated aggressive behavior. *Hormones and behavior*, 44(3), 242-257. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.04.002>
- Miczek, K. A., Faccidomo, S., De Almeida, R. M., Bannai, M., Fish, E. W., & Debold, J. F. (2004). Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1036, 336-355. <https://doi.org/10.1196/annals.1330.021>
- Miczek, K. A., Nikulina, E. M., Takahashi, A., Covington, H. E., 3rd, Yap, J. J., Boyson, C. O., Shimamoto, A., & de Almeida, R. M. (2011). Gene expression in aminergic and peptidergic cells during aggression and defeat: relevance to violence, depression and drug abuse. *Behavior genetics*, 41(6), 787-802. <https://doi.org/10.1007/s10519-011-9462-5>
- Miczek, K. A., de Boer, S. F., & Haller, J. (2013). Excessive aggression as model of violence: a critical evaluation of current preclinical methods. *Psychopharmacology*, 226(3), 445-458. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3008-x>
- Miguez, J., Martin, F., & Aldegunde, M. (1991). Differential effects of pinealectomy on amygdala and hippocampus serotonin metabolism. *Journal of pineal research*, 10(2), 100-103. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1991.tb00017.x>
- Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A., Deo, S. K., Daunert, S., & Liu, X. Z. (2017). Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *Journal of cellular physiology*, 232(9), 2359-2372. <https://doi.org/10.1002/jcp.25518>

- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31(3), 187-199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x>
- Mongillo, D. L., Kosyachkova, E. A., Nguyen, T. M., & Holmes, M. M. (2014). Differential effects of chronic fluoxetine on the behavior of dominant and subordinate naked mole-rats. *Behavioural brain research*, 258, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.023>
- Mos, J., & Olivier, B. (1989). Quantitative and comparative analyses of pro-aggressive actions of benzodiazepines in maternal aggression of rats. *Psychopharmacology*, 97(2), 152-153. <https://doi.org/10.1007/BF00442238>
- Mosienko, V., Beis, D., Pasqualetti, M., Waider, J., Matthes, S., Qadri, F., Bader, M., & Alenina, N. (2015). Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. *Behavioural brain research*, 277, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.005>
- Müller, C.P.; Jacobs, B.R. (2010) HANDBOOK OF THE BEHAVIORAL NEUROBIOLOGY OF SEROTONIN. London. UK. Elsevier.
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J. F., Soiza-Reilly, M., & Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain structure & function*, 221(1), 535-561. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0924-4>
- Nelson, R. J., & Chiavegatto, S. (2001). Molecular basis of aggression. *Trends in neurosciences*, 24(12), 713-719. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01996-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01996-2)
- Nelson, R. J., & Trainor, B. C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 536-546. <https://doi.org/10.1038/nrn2174>
- Nelson, M., & Pinna, G. (2011). S-norfluoxetine microinfused into the basolateral amygdala increases allopregnanolone levels and reduces aggression in socially isolated mice. *Neuropharmacology*, 60(7-8), 1154-1159. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.011>
- Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, 13(10), 1161-1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>
- Niederkofler, V., Asher, T. E., Okaty, B. W., Rood, B. D., Narayan, A., Hwa, L. S., Beck, S. G., Miczek, K. A., & Dymecki, S. M. (2016). Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior. *Cell reports*, 17(8), 1934-1949. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.063>
- Nin, M. S., Martinez, L. A., Pibiri, F., Nelson, M., & Pinna, G. (2011). Neurosteroids reduce social isolation-induced behavioral deficits: a proposed link with neurosteroid-mediated upregulation of BDNF expression. *Frontiers in endocrinology*, 2, 73. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00073>
- Nishida, F., Villar, M. F. Z., Zanuzzi, C. N., Sisti, M. S., Camiña, A. E., Reggiani, P. C., & Portiansky, E. L. (2020). Intracerebroventricular delivery of human umbilical cord mesenchymal stem cells as a promising therapy for repairing the spinal cord injury induced by Kainic acid. *Stem cell reviews and reports*, 16(1), 167-180.
- Panzanelli, P., Perazzini, A. Z., Fritschy, J. M., & Sassoè-Pognetto, M. (2005). Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type A receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*, 484(1), 121-131. <https://doi.org/10.1002/cne.20440>

- Paul, S. M., Pinna, G., & Guidotti, A. (2020). Allopregnanolone: From molecular pathophysiology to therapeutics. A historical perspective. *Neurobiology of stress*, 12, 100215. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100215>
- Park, D. H., Stone, D. M., Baker, H., Kim, K. S., & Joh, T. H. (1994). Early induction of rat brain tryptophan hydroxylase (TPH) mRNA following parachlorophenylalanine (PCPA) treatment. *Brain research. Molecular brain research*, 22(1-4), 20–28. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90028-0)
- Paxinos, G. W. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Elsevier Academic Press.
- Pediaditakis, I., Iliopoulos, I., Theologidis, I., Delivanoglou, N., Margioris, A. N., Charalampopoulos, I., & Gravanis, A. (2015). Dehydroepiandrosterone: an ancestral ligand of neurotrophin receptors. *Endocrinology*, 156(1), 16–23. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1596>
- Pelegrina, L. T., Cáceres, A. R., Giuliani, F. A., Asensio, J. A., Parborell, F., & Laconi, M. R. (2016). A single dose of allopregnanolone affects the ovarian morphology and steroidogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)*, REP-16-0463. Advance online publication. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0463>
- Pelosi, B., Pratelli, M., Migliarini, S., Pacini, G., & Pasqualetti, M. (2015). Generation of a Tph2 Conditional Knockout Mouse Line for Time- and Tissue-Specific Depletion of Brain Serotonin. *PloS one*, 10(8), e0136422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136422>
- Penning, T. M., Jin, Y., Heredia, V. V., & Lewis, M. (2003). Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85(2-5), 247–255. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(03\)00236-x](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00236-x)
- Petzold, G. C., Hagiwara, A., & Murthy, V. N. (2009). Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature neuroscience*, 12(6), 784–791. <https://doi.org/10.1038/nn.2335>
- Pinna, G., Costa, E., & Guidotti, A. (2004). Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically facilitate pentobarbital sedation by increasing neurosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6222–6225. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401479101>
- Pinna, G., Dong, E., Matsumoto, K., Costa, E., & 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 of the United States of America*, 100(4), 2035–2040. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337642100>
- Pinna, G., Costa, E., & Guidotti, A. (2006). Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology*, 186(3), 362–372. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0213-2>
- Pinna, G., Agis-Balboa, R. C., Pibiri, F., Nelson, M., Guidotti, A., & Costa, E. (2008). Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. *Neurochemical research*, 33(10), 1990–2007. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9718-5>
- Pinna, G., Costa, E., & Guidotti, A. (2009). SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Current opinion in pharmacology*, 9(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.006>
- Powell, J. G., Garland, S., Preston, K., & Piszczatoski, C. (2020). Brexanolone (Zulresso): Finally, an FDA-Approved Treatment for Postpartum Depression. *The Annals of pharmacotherapy*, 54(2), 157–163. <https://doi.org/10.1177/1060028019873320>

- Popova, N. K., Gilinsky, M. A., Amstislavskaya, T. G., Morosova, E. A., Seif, I., & De Maeyer, E. (2001). Regional serotonin metabolism in the brain of transgenic mice lacking monoamine oxidase A. *Journal of neuroscience research*, 66(3), 423–427. <https://doi.org/10.1002/jnr.1234>
- Puig Velasco, MV (2004) Control Recíproco Entre La Corteza Prefrontal Y Los Núcleos Del Rafe Papel De Los Receptores De Serotonina. Departamento De Neuroquímica Instituto De Investigaciones Biomédicas De Barcelona, España.
- Puglisi-Allegra, S., Simler, S., Kempf, E., & Mandel, P. (1981). Involvement of the GABAergic system on shock-induced aggressive behavior in two strains of mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 14 Suppl 1, 13–18. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(81\)80004-4](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(81)80004-4)
- Purdy, R. H., Morrow, A. L., Moore, P. H., Jr, & Paul, S. M. (1991). Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10), 4553–4557. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4553>
- Raghuveer, K., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., Kagawa, H., Dutta-Gupta, A., & Nagahama, Y. (2011). Gender differences in tryptophan hydroxylase-2 mRNA, serotonin, and 5-hydroxytryptophan levels in the brain of catfish, *Clarias gariepinus*, during sex differentiation. *General and comparative endocrinology*, 171(1), 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.003>
- Raine A. (2002). Biosocial studies of antisocial and violent behavior in children and adults: a review. *Journal of abnormal child psychology*, 30(4), 311–326. <https://doi.org/10.1023/a:1015754122318>
- Ratray, M., Baldessari, S., Gobbi, M., Mennini, T., Samanin, R., & Bendotti, C. (1996). p-Chlorophenylalanine changes serotonin transporter mRNA levels and expression of the gene product. *Journal of neurochemistry*, 67(2), 463–472. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67020463.x>
- Reddy D. S. (2018). GABA-A Receptors Mediate Tonic Inhibition and Neurosteroid Sensitivity in the Brain. *Vitamins and hormones*, 107, 177–191. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.12.001>
- Robichaud, M., & Debonnel, G. (2004). Modulation of the firing activity of female dorsal raphe nucleus serotonergic neurons by neuroactive steroids. *The Journal of endocrinology*, 182(1), 11–21. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1820011>
- Rone, M. B., Fan, J., & Papadopoulos, V. (2009). Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(7), 646–658. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.03.001>
- Rossetti, M. F., Cambiasso, M. J., Holschbach, M. A., & Cabrera, R. (2016). Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *Journal of neuroendocrinology*, 28(7), 10.1111/jne.12402. <https://doi.org/10.1111/jne.12402>
- Rydén, E., Thase, M. E., Stråht, D., Aberg-Wistedt, A., Bejerot, S., & Landén, M. (2009). A history of childhood attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) impacts clinical outcome in adult bipolar patients regardless of current ADHD. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 120(3), 239–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2009.01399.x>
- Saijo, K., & Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 11(11), 775–787. <https://doi.org/10.1038/nri3086>
- Sanchez, A. M., Flamini, M. I., Genazzani, A. R., & Simoncini, T. (2013). Effects of progesterone and medroxyprogesterone on actin remodeling and neuronal spine formation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(4), 693–702. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1278>

- Sassoè-Pognetto, M., & Ottersen, O. P. (2000). Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), 2192–2201. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-02192.2000>
- Schlinger, B. A., & London, S. E. (2006). Neurosteroids and the songbird model system. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*, 305(9), 743–748. <https://doi.org/10.1002/jez.a.303>
- Schlinger, B. A., & Remage-Healey, L. (2012). Neurosteroidogenesis: insights from studies of songbirds. *Journal of neuroendocrinology*, 24(1), 16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02150.x>
- Schmidt, L. J., & Strowbridge, B. W. (2014). Modulation of olfactory bulb network activity by serotonin: synchronous inhibition of mitral cells mediated by spatially localized GABAergic microcircuits. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 21(8), 406–416. <https://doi.org/10.1101/lm.035659.114>
- Schüle, C., Nothdurfter, C., & Rupprecht, R. (2014). The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in neurobiology*, 113, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.003>
- Schweizer, C., Balsiger, S., Bluethmann, H., Mansuy, I. M., Fritschy, J. M., Mohler, H., & Lüscher, B. (2003). The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Molecular and cellular neurosciences*, 24(2), 442–450. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00202-1)
- Schwartzter, J. J., Ricci, L. A., & Melloni, R. H., Jr (2009). Interactions between the dopaminergic and GABAergic neural systems in the lateral anterior hypothalamus of aggressive AAS-treated hamsters. *Behavioural brain research*, 203(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.04.007>
- Serra, M., Pisu, M. G., Muggironi, M., Parodo, V., Papi, G., Sari, R., Dazzi, L., Spiga, F., Purdy, R. H., & Biggio, G. (2001). Opposite effects of short- versus long-term administration of fluoxetine on the concentrations of neuroactive steroids in rat plasma and brain. *Psychopharmacology*, 158(1), 48–54. <https://doi.org/10.1007/s002130100853>
- Siever L. J. (2008). Neurobiology of aggression and violence. *The American journal of psychiatry*, 165(4), 429–442. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07111774>
- Shao, Z., Liu, S., Zhou, F., Puche, A. C., & Shipley, M. T. (2019). Reciprocal Inhibitory Glomerular Circuits Contribute to Excitation-Inhibition Balance in the Mouse Olfactory Bulb. *eNeuro*, 6(3), ENEURO.0048-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0048-19.2019>
- Shipley, M. T., & Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of neurobiology*, 30(1), 123–176. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199605\)30:1<123::AID-NEU11>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1<123::AID-NEU11>3.0.CO;2-N)
- Siegfried, B., Alleva, E., Oliverio, A., & Puglisi-Allegra, S. (1981). Effects of isolation on activity, reactivity, excitability and aggressive behavior in two inbred strains of mice. *Behavioural brain research*, 2(2), 211–218. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(81\)90056-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(81)90056-5)
- Simler, S., Puglisi-Allegra, S., & Mandel, P. (1983). Effects of n-di-propylacetate on aggressive behavior and brain GABA level in isolated mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 18(5), 717–720. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90012-6)
- Smith SS; Shen H. (2009) Neuroactive Steroids and the GABA_A Receptor, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY, USA! 2017 Elsevier Inc. All rights reserved. This chapter is reproduced from the previous edition, volume 3, pp. 1561–1580, ! 2009, Elsevier Inc.
- Spigelman, I., Li, Z., Liang, J., Cagetti, E., Samzadeh, S., Mihalek, R. M., Homanics, G. E., & Olsen, R. W. (2003). Reduced inhibition and sensitivity to neurosteroids in hippocampus of mice

- lacking the GABA(A) receptor delta subunit. *Journal of neurophysiology*, 90(2), 903–910. <https://doi.org/10.1152/jn.01022.2002>
- Steinfeld, R., Herb, J. T., Sprengel, R., Schaefer, A. T., & Fukunaga, I. (2015). Divergent innervation of the olfactory bulb by distinct raphe nuclei. *The Journal of comparative neurology*, 523(5), 805–813. <https://doi.org/10.1002/cne.23713>
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M., & Mody, I. (2003). Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14439–14444. <https://doi.org/10.1073/pnas.2435457100>
- Stoff, DM y Cairns, RB (2014) Aggression and violence: Genetic, neurobiological, and biosocial perspectives. New York, USA. Psychology Press.
- Stokes, A. H., Xu, Y., Daunais, J. A., Tamir, H., Gershon, M. D., Butkerait, P., Kayser, B., Altman, J., Beck, W., & Vrana, K. E. (2000). p-ethynylphenylalanine: a potent inhibitor of tryptophan hydroxylase. *Journal of neurochemistry*, 74(5), 2067–2073. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742067.x>
- Strüder, H. K., & Weicker, H. (2001). Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part II. *International journal of sports medicine*, 22(7), 482–497. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17606>
- Sun, Q., Li, X., Ren, M., Zhao, M., Zhong, Q., Ren, Y., Luo, P., Ni, H., Zhang, X., Zhang, C., Yuan, J., Li, A., Luo, M., Gong, H., & Luo, Q. (2019). A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex. *Nature neuroscience*, 22(8), 1357–1370. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0429-9>
- Suzuki, Y., Kiyokage, E., Sohn, J., Hioki, H., & Toida, K. (2015). Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*, 523(2), 262–280. <https://doi.org/10.1002/cne.23680>
- Svare, B. (1983) Hormones and Aggressive Behavior. New York: Plenum.
- Takahashi, A., Quadros, I. M., de Almeida, R. M., & Miczek, K. A. (2011). Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology*, 213(2-3), 183–212. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2000-y>
- Takahashi A and Miczek KA. (2014) Neurogenetics of Aggressive Behavior – Studies in Rodents. *Curr Top Behav Neurosci*. 2014 ; 17: 3–44. https://doi.org/10.1007/7854_2013_263
- Tinbergen N. (1968). On war and peace in animals and man. An ethologist's approach to the biology of aggression. *Science (New York, N.Y.)*, 160(3835), 1411–1418. <https://doi.org/10.1126/science.160.3835.1411>
- Toth, M., Tulogdi, A., Biro, L., Soros, P., Mikics, E., & Haller, J. (2012). The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation. *Behavioural brain research*, 233(1), 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.025>
- Tsutsui, K., Matsunaga, M., Miyabara, H., & Ukena, K. (2006). Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*, 305(9), 733–742. <https://doi.org/10.1002/jez.a.302>
- Ugale, R. R., Hirani, K., Morelli, M., & Chopde, C. T. (2004). Role of neuroactive steroid allopregnanolone in antipsychotic-like action of olanzapine in rodents. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(9), 1597–1609. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300460>

- Urban, N. N., & Arevian, A. C. (2009). Computing with dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03899.x>
- Valzelli, L., Bernasconi, S., & Garattini, S. (1981). p-Chlorophenylalanine-induced muricidal aggression in male and female laboratory rats. *Neuropsychobiology*, 7(6), 315–320. <https://doi.org/10.1159/000117866>
- Vandenbergh J. G. (1971). The effects of gonadal hormones on the aggressive behaviour of adult golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Animal behaviour*, 19(3), 589–594. [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(71\)80116-1](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(71)80116-1)
- van Honk, J., Harmon-Jones, E., Morgan, B. E., & Schutter, D. J. (2010). Socially explosive minds: the triple imbalance hypothesis of reactive aggression. *Journal of personality*, 78(1), 67–94. <https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.2009.00609.x>
- van Erp, A. M., & Miczek, K. A. (2000). Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), 9320–9325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-09320.2000>
- Vartiainen, H., Tiihonen, J., Putkonen, A., Koponen, H., Virkkunen, M., Hakola, P., & Lehto, H. (1995). Citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, in the treatment of aggression in schizophrenia. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 91(5), 348–351. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1995.tb09793.x>
- Vergnes, M., Depaulis, A., & Boehrer, A. (1986). Parachlorophenylalanine-induced serotonin depletion increases offensive but not defensive aggression in male rats. *Physiology & behavior*, 36(4), 653–658. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90349-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90349-5)
- Vergnes, M., Depaulis, A., Boehrer, A., & Kempf, E. (1988). Selective increase of offensive behavior in the rat following intrahypothalamic 5,7-DHT-induced serotonin depletion. *Behavioural brain research*, 29(1-2), 85–91. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90055-1)
- Viding, E., Price, T. S., Jaffee, S. R., Trzaskowski, M., Davis, O. S., Meaburn, E. L., Haworth, C. M., & Plomin, R. (2013). Genetics of callous-unemotional behavior in children. *PloS one*, 8(7), e65789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065789>
- Volavka J. (2013). Violence in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatria Danubina*, 25(1), 24–33.
- Walther, D. J., & Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical pharmacology*, 66(9), 1673–1680. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00556-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00556-2)
- Wang, J. M., Irwin, R. W., Liu, L., Chen, S., & Brinton, R. D. (2007). Regeneration in a degenerating brain: potential of allopregnanolone as a neuroregenerative agent. *Current Alzheimer research*, 4(5), 510–517. <https://doi.org/10.2174/156720507783018262>
- Weir, C. J., Ling, A. T., Belelli, D., Wildsmith, J. A., Peters, J. A., & Lambert, J. J. (2004). The interaction of anaesthetic steroids with recombinant glycine and GABAA receptors. *British journal of anaesthesia*, 92(5), 704–711. <https://doi.org/10.1093/bja/ae125>
- Wetzel, C. H., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglgänsberger, W., Holsboer, F., & Rupprecht, R. (1998). Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 12(9), 1441–1451. <https://doi.org/10.1210/mend.12.9.0163>
- Wise D. A. (1974). Aggression in the female golden hamster: effects of reproductive state and social isolation. *Hormones and behavior*, 5(3), 235–250. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(74\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0018-506x(74)90032-4)
- Wu, C., & Sun, D. (2015). GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metabolic brain disease*, 30(2), 367–379. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9560-1>

- Wu, X., Gangisetty, O., Carver, C. M., & Reddy, D. S. (2013). Estrous cycle regulation of extrasynaptic δ -containing GABA(A) receptor-mediated tonic inhibition and limbic epileptogenesis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 346(1), 146-160. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.203653>
- Yilmaz, C., Karali, K., Fodelianaki, G., Gravanis, A., Chavakis, T., Charalampopoulos, I., & Alexaki, V. I. (2019). Neurosteroids as regulators of neuroinflammation. *Frontiers in neuroendocrinology*, 55, 100788. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100788>
- Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H. J., Ackenheil, M., & Bondy, B. (2007). Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *Journal of psychiatric research*, 41(1-2), 168-173. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2005.05.004>
- Zorumski, C. F., Paul, S. M., Covey, D. F., & Mennerick, S. (2019). Neurosteroids as novel antidepressants and anxiolytics: GABA-A receptors and beyond. *Neurobiology of stress*, 11, 100196. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100196>
- Zwain, I. H., & Yen, S. S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140(8), 3843-3852. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6907>

Anexo 1



► 2016
AÑO DEL BICENTENARIO
DE LA DECLARACIÓN
DE LA INDEPENDENCIA NACIONAL

Mendoza, 2 de setiembre 2016

CICUAL Aval N° 82/2016

Los integrantes del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de Cuyo, han evaluado el protocolo para el uso de animales del proyecto de investigación: "Rol de los neuroesteroides como moduladores del sistema serotoninérgico central en un modelo de agresión en ratas macho" dirigido por el Dr. Ricardo Cabrera presentado por Mesa de Entradas de FCM mediante Nota CUY N°0031498/2016.

El CICUAL concluye que el mencionado proyecto cumple con las reglamentaciones institucionales y Legislación Nacional vigentes referidas al uso de animales en investigación. Por lo tanto, el CICUAL no tiene objeciones para los siguientes procedimientos que involucran animales descriptos en este proyecto:

1. Test comportamentales:
 - Aislamiento
 - Residente Versus Intruso
 - Natación Forzada
2. Inducción de depleción serotoninérgica:
 - Administración de droga intraperitoneal pCPA (depletor serotoninérgico)
 - Canulación en 3°ventriculo
 - Anestesia y analgesia
 - Cirugía esterotáxica
3. Eutanasia por decapitación para obtención de órganos.

Los procedimientos enunciados se encuentran avalados por CICUAL desde setiembre 2016 hasta julio 2020.

Todo trabajo que resultara de este proyecto debe hacer referencia al presente aval de la siguiente manera:

"All animals were cared in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals of the US National Institute of Health. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the School of Medical Science, Universidad Nacional de Cuyo (Protocol approval N° 82/2016)".

De acuerdo a lo declarado por el director del proyecto asegura que el presente protocolo no tendrá cambios sin previa notificación y revisión del CICUAL, como así también acepta recibir inspecciones por miembros del Comité.

El presente certificado tiene validez oficial y podrá ser presentado ante el organismo que lo solicite.