

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

---

**Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Maestría en Ciencia Biológicas**

**Efecto del aislamiento materno y social durante la  
infancia sobre el desarrollo de la agresión y la  
concentración de serotonina en la corteza prefrontal y el  
núcleo accumbens en la rata macho**

**T e s i s**

**para obtener el grado de  
Maestra en Ciencia Biológicas  
P r e s e n t a**

**Bióloga Aida Patricia Hidalgo Flores**

**Director de tesis**

**Dr. Angel Ismael Melo Salazar**

**Tlaxcala, Tlax.**

**Enero 2014**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

**Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta**

**Maestría en Ciencia Biológicas**

**Efecto del aislamiento materno y social durante la infancia sobre el desarrollo de la agresión y la concentración de serotonina en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens en la rata macho**

**T e s i s**

**para obtener el grado de  
Maestra en Ciencia Biológicas  
P r e s e n t a**

**Bióloga Aida Patricia Hidalgo Flores**

**Comité Revisor Tutorial**

**Dr. Rodrigo Erick Escartin Pérez  
Dr. Kurt Leroy Hoffman  
Dr. Jorge Antolin Rodríguez Antolín  
Dra. Lourdes Arteaga Castañeda**

**Tlaxcala, Tlax.**

**Enero 2014**

La presente tesis se realizó en las siguientes instituciones: 1) Centro de Investigación en Reproducción Animal (CINVESTAV-Laboratorio Tlaxcala-UAT). Campus Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Ixtacuixtla, Tlaxcala, 2) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Laboratorio del Dr. Benjamín Floran Garduño.

El presente trabajo fue financiado por CONACYT a través del proyecto # 156413 a cargo del Dr. Angel Ismael Melo Salazar.

El Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) otorgó una beca al C. Aída Patricia Hidalgo Flores con el # 333758/230665.

Este proyecto es abalado por el programa de Maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta que se encuentra registrado en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP) CONACYT.

Agradezco el apoyo brindado por mi director de tesis, el Dr. Ángel Ismael Melo Salazar; y al Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez por fungir como un codirector de tesis.

Igualmente al Dr. Kurt Leroy Hoffman por participar como miembro de mi Comité Tutoral y a el Dr. Jorge Rodríguez Antolín y a la Dra. Lourdes Arteaga Castañeda.

También agradezco el trabajo dedicado por parte de los miembros del grupo de investigación a cargo del Dr. Melo, compañeros estudiantes de licenciatura y maestría, durante los experimentos y sobre todo durante la Crianza Artificial.

Asimismo, a el espacio prestado por el Dr. Benjamín Florán Garduño en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV del IPN. Particularmente al Dr. Erick Escartín Pérez por su dirección en el uso del equipo utilizado para la determinación de serotonina y su metabolito.

Finalmente, a los técnicos Jose Luis y Graciela por su colaboración en la obtención del tejido.

A todos ellos mi infinita gratitud.

Dedico este trabajo a mi familia,  
mi madre y padre:  
Gracias por todo su cariño.

## Resumen

Las interacciones sociales entre los roedores durante la etapa temprana de la vida son esenciales para el desarrollo de las conductas sociales como la agresión. Por ejemplo, se ha encontrado que la separación materna parcial (3 hrs/día) o total (24hrs/día; Crianza artificial: CA) incrementa la agresividad en la etapa adulta, mientras el re-emplazo de estímulos sociales durante el período de aislamiento previene la mayoría de los efectos. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos que subyacen a dichos efectos. Se ha propuesto que la expresión exagerada e impulsiva de la agresividad es mediada por niveles bajos de serotonina (5-HT) o su metabolito (5-HIAA) a nivel central o del líquido cefalorraquídeo en roedores, humanos y primates. El propósito del presente trabajo es determinar si la separación materna total y CA, afecta la concentración basal de 5-HT o 5-HIAA en áreas neurales que participan en la modulación de la agresión en la rata macho, y tratar de establecer una relación entre dichas concentraciones y la expresión de conductas agresivas.

Así, ratas macho de cuatro días de edad fueron (1) criadas por su madre (Control), (2) criadas en ausencia de su madre dentro de un sistema de CA (CA-Aislado), y (3) criadas en ausencia de su madre junto a dos compañeros de camada (CA-Social). A los 3-4 meses de edad se tomaron muestras de la corteza prefrontal, el núcleo accumbens y, el rafe dorsal y medial de machos para medir el contenido de 5-HT y 5-HIAA por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en las siguientes condiciones: 1) *basales*; los machos se removieron de sus cajas de acrílico, y de sus compañeros de caja y se procedió a tomar las muestras de cerebro, i.e., sin ninguna manipulación, 2) *Prueba Residente-Intruso*; los machos se aislaron en cajas de acrílico transparente por 24 hrs, al término de este tiempo, la mitad de ellos fueron expuestos a machos no familiares para realizar la prueba, y la otra mitad no fueron expuestos a la prueba. Posteriormente se procedió a tomar las muestras de cerebro.

Los resultados mostraron que los niveles basales de 5-HT en el rafe dorsal y medial y de 5-HIAA en la corteza prefrontal de las ratas CA-A fueron significativamente menores en comparación a los niveles encontrados en los machos Control ( $p < 0.05$ ). El reemplazo de estímulos sociales (grupo CA-Social) sólo previno el efecto del aislamiento en el Rafe dorsal y medial. Además, la concentración de 5-HT después de la confrontación agresiva en la corteza prefrontal media de las ratas CA-Aislada y CA-Social fue significativamente menor, en

comparación con encontrado en las ratas Control ( $p < 0.05$ ). En adición, el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el Rafe dorsal y medial en el grupo CA-Social fue menor en comparación al del grupo Control ( $p < 0.05$ ). Un dato interesante se encontró en el incremento de 5-HIAA en el Núcleo Acumbens Shell de las ratas CA-Aisladas respecto de las Controles ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, los machos CA-Aislados que sólo se mantuvieron aislados socialmente por 24 hrs presentaron una disminución de la 5-HT en el Rafé dorsal y medial, en comparación con los machos Control, y el reemplazo de los estímulos sociales (Grupo CA-Social) previno dicho efecto. En contraste, los niveles de 5-HT en la corteza prefrontal, en el Núcleo Accumbens Shell, así como en el Rafé dorsal y medial, fueron mayores en los machos CA-Sociales que en los machos Ca-Aislados. Este último efecto se replicó en el contenido del metabolito sólo en el núcleo Acumbens Shell y el Rafé dorsal y medial.

Por otro lado, las pruebas conductuales mostraron un incremento en la frecuencia de patadas y lucha al intruso, así como un aumento en el tiempo de lucha ( $p < 0.05$ ). Además, se observó una disminución en la latencia para someter al intruso (postura de sumisión completa) en los machos CA-Aislados en comparación con los machos Control ( $p < 0.05$ ). Los machos CA-Aislados mostraron una disminución en frecuencia y duración de las conductas de exploración (cabeza, cuerpo, aire) en comparación con los demás grupos. El re-emplazo de estímulos sociales (CA-Sociales) previno la mayoría de los efectos causados por la separación materna y CA.

Los presentes resultados sugieren que la interacción social de madre y hermanos durante el período postnatal pre-destete afecta los contenidos de serotonina en el Rafé dorsal y medial y la Corteza Prefrontal, así como los contenidos de 5-HIAA en la Corteza Prefrontal, núcleo Accumbens Shell y Rafé en la etapa adulta. Además, dicho aislamiento también afecta negativamente los niveles de agresividad (altos) en la rata macho adulta. Mientras el remplazo social durante el aislamiento previene algunos de los efecto del aislamiento sobre dichos parámetros.

## Índice

1. Introducción.....	1
1.1.La agresión y su definición.....	2
1.2.La agresión en modelos animales.....	5
1.3.Agresión ofensiva y defensiva.....	7
1.4.Prueba de residente-Intruso.....	9
1.5.Componentes neuroanatómicos de la agresión.....	10
1.6.Emoción y agresión Afectiva.....	12
1.7.La amígdala y la agresión defensiva o afectiva.....	15
1.8.La serotonina (5-HT) y la agresión defensiva o afectiva.....	17
1.9.Los receptores 5-HT y la agresión.....	19
1.10.El déficit de serotonina como responsable de la agresión impulsiva.....	20
1.11.La experiencia social.....	20
1.12.Influencia del cuidado materno en la conducta y desarrollo cerebral.....	21
1.13.Impulsividad y cuidado materno.....	25
1.14.Reversibilidad de la experiencia temprana sobre la conducta.....	25
2. Antecedentes.....	28
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivo general.....	31
5.1.Objetivos particulares.....	31
6. Metodología.....	32
6.1.Sujetos.....	32
6.2.Procedimiento General.....	32
6.3.Implante de catéter.....	34
6.4.Crianza artificial.....	35
6.5.Formula láctea.....	36
6.6.Homogenados de tejido cerebral para la determinación de los contenidos de serotonina.....	36
6.7.Tejido disecado.....	37

6.8.Prueba residente-intruso.....	38
6.9.Caracterización de las conductas.....	39
6.9.1. Conductas agresivas.....	39
6.9.2. Conductas de sumisión.....	39
6.9.3. Conductas de estrés.....	40
6.9.4. Conductas sociales.....	40
6.9.5. Conductas de exploración y mantenimiento.....	40
6.10.Análisis estadístico.....	40
7. Resultados.....	42
7.1.Experimento 1.....	42
7.1.1. Contenido basal de serotonina cerebral.....	42
7.2.Experimento 2.....	44
7.2.1. Contenido de serotonina cerebral post-prueba Residente-Intruso..	44
7.2.2. Conductas agresivas.....	46
7.3.Experimento 3.....	52
7.3.1. Contenido de serotonina 24 hrs post-privación social.....	52
8. Discusión.....	54
9. Perspectivas.....	60
10. Bibliografía.....	61

## 1.- Introducción

Las interacciones sociales entre los individuos de la misma especie durante las etapas tempranas de la vida son esenciales para el desarrollo de las conductas sociales y de procesos neuroendócrinos, fisiológicos y cognitivos. El contacto con la madre es la primera interacción social, seguido de la interacción con los hermanos de camada (para las especies que tienen 2 o más hermanos de camada). Cuando la interacción madre-crías se interfiere experimentalmente, como en la separación materna parcial o total de las crías durante el período postnatal predestete, provoca un desarrollo inadecuado de los procesos antes mencionados, incluyendo a las conductas agresivas de los animales en la edad adulta. Entre las conductas que son afectadas, está la agresividad (Lukkes y cols., 2011), cuya expresión está aumentada. La conducta agresiva está compuesta de ciertos patrones motores como la postura de ataque, el ataque, lucha, mordidas, patadas, boxeo, y la inducción de la postura de sumisión, completa e incompleta del animal intruso.

Estudios iniciales de destete temprano (un tipo de separación materna temprana) (Nakamura y cols., 2003) y de aislamiento social después del destete encontraron que dichos animales (ratas y ratones) eran más agresivos que aquellos que no sufrieron las manipulaciones experimentales. Además, recientemente el grupo de Fleming y de Melo ha reportado que la separación materna total y crianza artificial incrementa la agresividad de madres lactantes (Melo y cols., 2009) y de hembras no lactantes (Melo y cols., 2006). También, se ha encontrado que machos juveniles que fueron criados artificialmente presentan altos niveles de conductas de juego-lucha, conductas que preceden a las conductas agresivas en etapas adultas (Ochoa y cols., 2008). Existen múltiples propuestas acerca de los mecanismos que subyacen a los efectos mencionados, sin embargo, aun no es claro cuál o cuáles de los sistemas y/o procesos afectados son esenciales.

Se ha propuesto que la expresión exagerada e impulsiva de la agresividad es mediada por niveles bajos de serotonina (5-HT) o su metabolito (5-HIAA; ácido 5-hidroxi indolacético). Por ello, en el presente trabajo con ayuda del paradigma experimental conocido como *Crianza artificial*, en el que se induce la separación total de las crías de la madre y de los hermanos de camada; así, se exploró la relación entre la serotonina y el comportamiento agresivo alterado en la edad adulta de las ratas macho Wistar.

### 1.1.La agresión y su definición

La agresión es una conducta adaptativa muy conservada con el propósito de ayudar a los organismos a competir por los recursos limitados y lograr su supervivencia (Mattson, 2003). Concretamente, la agresión es una construcción heterogénea de componentes que definen diferentes fenotipos (Henning *et al.*, 2005). Lo anterior hace a la agresión un fenómeno multifactorial con una gran variedad de definiciones y tipos (Blanchard *et al.*, 2003). De esta manera, Siegel y colaboradores (2007), definen a la *conducta agresiva* como un comportamiento que trata de herir, lastimar, lesionar o causar daño a otro organismo. Además, Alcazar (2010) y colaboradores afirman que:

*“La agresión se ha entendido tradicionalmente como la manifestación de comportamiento que tiene intención de provocar daño físico a otro individuo con el fin de promover la conservación del organismo y la supervivencia de la especie”* (p. 291)

El *comportamiento agresivo* tiene la función de asegurar una ventaja en la reproducción, en el acceso a la comida, en la obtención de un lugar seguro para dormir y en la protección de la progenie. Dicha función se observa claramente en las conductas sociales de dominación jerárquica y territorial. En especies animales con cohesión social, la conducta agresiva tiene la función de establecer y mantener la jerarquía por medio de alardes, posturas y actos agresivos, esta agresión establece una *dominancia* hacia el interior de la estructura social, por ello se le ha llamado a ésta: *agresión por dominancia*. En otras especies la expresión agresiva está determinada por las relaciones sociales de dispersión, en este caso los rivales son excluidos del territorio; a este componente espacial se le llama *agresión territorial* (Miczek y cols., 2004).

El comportamiento agresivo por dominancia es recurrente en primates y ratas (*Rattus norvegicus*). El repertorio de la agresión como las posturas y actos agresivos se desarrollan en la etapa prepuber del animal con la práctica de la conducta de juego-lucha (Miczek y cols., 2004). Este repertorio sigue una secuencia predecible con la característica de presentar una estructura temporal en el animal adulto. Esta estructura corresponde a una amenaza típica de la especie y a una demostración dominante, al intensificarse la agresión el individuo dominante pasa a una persecución y al daño del tejido por medio de mordidas. El individuo subordinado, por otra parte, responde con una reacción defensiva, sumisa y de huida. En último término, la función de la agresión por dominancia es asegurar recursos para la

transmisión exitosa de la información genética a la siguiente generación con la probabilidad de reducir el perjuicio (Miczek y cols., 2004).

Las especies con tendencia a la dispersión después de la pubertad presentan agresión territorial, es el caso de los ratones (*M. musculus*). En ellos, luego de alcanzada la pubertad los machos se dispersan en poblaciones itinerantes. Entonces el residente marca y patrulla un territorio para delimitar una exclusividad territorial, a este espacio delimitado y exclusivo se le llama *territorio de dominio*, dentro de este los intrusos son vigorosamente confrontados. Este tipo de manifestación agresiva es aprovechada en la investigación para ser la base de un protocolo experimental muy común, en el que un residente confronta a un intruso, por ello se le conoce como una *confrontación (prueba) residente-intruso* (Miczek y cols., 2004).

Por otro lado, la defensa de las crías y la supresión de la reproducción exitosa de las hembras rivales son la función y objetivo de ejercer la agresión materna. En los roedores (ratas y ratones) la madre después del parto expresa ataque defensivo hacia machos y hembras intrusos dentro del nido y/o territorio alrededor del nido, este ataque se distingue por embestidas y mordidas hacia el hocico y la cabeza del intruso. Las hembras también utilizan componentes del ataque ofensivo, estos son principalmente las amenazas (patadas) laterales y las persecuciones. (Miczek y cols., 2004). Lo anterior es de importancia porque estos comportamientos agresivos, tanto los de tipo territorial y por dominancia como el materno, son una adaptación del comportamiento esencial para lograr los objetivos de la reproducción (Miczek y cols., 2004). No se debe olvidar que la agresión refleja la competencia entre los organismos, no solo de la misma especie sino también de diferentes, por las parejas reproductivas, el alimento o el territorio (Siegel y cols., 2007).

Los tipos de conducta agresiva siguen más de una nomenclatura (Henning *et al.*, 2005). De hecho, cada tipo de conducta agresiva puede incluir sub-clasificaciones. Por ejemplo, la agresión por dominancia puede ser ofensiva por parte del macho dominante, y defensiva por parte del subordinado como se describirá en párrafos siguientes (Miczek *et al.*, 2004). Sin embargo, de manera general las investigaciones permiten la distinción de dos formas de agresión a pesar de las diversas maneras de nombrarla y subdividirla: la *agresión premeditada* y la *agresión impulsiva* (Alcazar-Córcoles y cols., 2010).

La agresión premeditada, también llamada instrumental o ataque depredatorio, es fría por parte del agresor y tiene como fin conseguir determinados propósitos. En el caso de los animales no humanos es un ataque planeado con la expresión de pocos signos anatómicos, le precede un periodo de asechanza hacia una presa específica de otra especie con el propósito de cazarla (Siegel y cols., 2007). En el caso de los humanos este tipo de comportamiento es evidente de forma patológica en los asesinos depredadores, aunque estos prefieren manipular para alcanzar sus propias metas y regulan sus impulsos agresivos hacia otros, presentan una proclividad a comportarse agresivamente (Alcazar-Córcoles y cols., 2010).

La *agresión impulsiva*, también llamada afectiva, está asociada a emociones negativas intensas, como el miedo, la ansiedad o la ira. Se expresa en respuesta a una amenaza percibida, por ello suele traer consecuencias negativas importantes para los organismos en el enfrentamiento (Alcazar-Córcoles y cols., 2010). Por ocurrir ante la percepción o presencia de una amenaza, también la nombran agresión defensiva, por ejemplo, ocurre ante la intrusión de un organismo de otra especie en el territorio del residente. A diferencia de la agresión instrumental, esta es evidente al desplegarse signos anatómicos muy característicos por parte del organismo, tales como la dilatación pupilar, la erección pilosa, la retracción de las orejas, entre otras. Otro aspecto a resaltar es la falta de un blanco específico, la agresión no está dirigida a un individuo en particular sino a la necesidad de responder ante un estímulo motivador adverso. En humanos en un estado sano se manifiesta con ataques, impulsividad y signos como la dilatación pupilar y la aceleración el ritmo cardiaco (Siegel y cols., 2007). De manera patológica los asesinos afectivos tienen arranques agresivos impulsivos desregulados, esto es, sin causa o motivo aparente (Alcazar-Córcoles y cols., 2010).

Al hablar de impulsividad, se entiende una “... *tendencia a emitir una respuesta de forma rápida, en ausencia de reflexión, y se caracteriza por comportamientos inadecuados, poco planificados y que frecuentemente ponen al individuo en riesgo...*” (Alcazar-Córcoles y cols., 2010; p 292.. Esa impulsividad es la razón de que la agresión afectiva no sea planeada y haya ataque encolerizado o enfurecido sobre el objeto percibido como fuente de la amenaza o de la frustración. Es también la razón por la que la agresión se inicia sin considerar una meta potencial, es así que el detonante interno es una emoción negativa (Blair y Charney, 2003).

Como ya se mencionó, las señales iniciales de la agresión impulsiva son la erección pilosa, la dilatación de las pupilas y otros signos motores del sistema autónomo, así como el gruñido y demás posturas corporales de extremidades y cabeza distintivas, algunos de estos componentes se mantienen incluso mientras se despliega el patrón de ataque. La reacción generalmente conlleva un aumento gradual de la respuesta al detectar la aproximación de la amenaza, entonces al principio el animal se mantiene inmóvil, después tratará de escapar sobre todo si es imposible atacar a la amenaza y si no hay otra opción atacará al agresor (Blair y Charney, 2003).

### **1.2.La agresión en modelos animales**

Debido a la amplia definición de la agresión, se ha tenido que acotar a una clasificación. Dicha nomenclatura ha surgido en gran parte del análisis realizado en modelos animales, a pesar de carecer de una definición de la agresión más adecuada a las características de estos (Blanchard *et al.*, 2003). Sin embargo, como ya se vio, estos modelos animales han aportado evidencias suficientes para proponer la clasificación de agresión impulsiva e instrumental. Para el caso de la agresión registrada en los modelos animales de roedores, se engloban las siguientes variedades de comportamiento: “agresión ofensiva”, que son acciones realizadas por animales adultos ante un reto; “agresión defensiva”, que se observa en respuesta a un ataque de un depredador o de un conespecífico; “agresión materna”, son las acciones realizadas por la hembra ante la amenaza de su progenie o ante la presencia de cualquier intruso que se encuentre dentro del área de su nido; “agresión predatoria”, que es un ataque hacia un animal con la finalidad de satisfacer el hambre (Blanchard *et al.*, 2003).

De manera similar, entre los paradigmas experimentales utilizados para la investigación de la conducta agresiva, se tienen los siguientes tipos: el miedo-inducido, la agresión materna, agresión entre machos, por irritabilidad, agresión relacionada al sexo, agresión territorial, residente-intruso y depredación. A excepción de la depredación, estos modelos de estudio del comportamiento agresivo comparten las características de la agresión afectiva o defensiva (Siegel y cols., 2007).

Es importante hacer notar que estos modelos son útiles porque han permitido entender cómo ocurre la conducta agresiva y cuáles son sus sustratos neurales. Sobre todo, nos ha

permitido reconocer regularidades características de las especies animales para las demostraciones agresivas dentro de las confrontaciones agónicas, en donde ocurre en muy pocas ocasiones el daño, la lesión y la muerte. Esto último refiere al carácter adaptativo de la agresión, es decir, la normatividad de las especies para refrendar su necesidad de reducir las probabilidades de un daño fatal. A su vez, estas limitaciones de la conducta agresiva natural han permitido distinguir las formas intensas de agresión patológica. Estas formas, dentro de las que se incluyen términos como la “violencia”, son “*factores decisivos sociales y neurales de excesivo y pervertido comportamiento agresivo humano, en particular los actos impulsivamente violentos*” (Miczek y cols., 2004). Los modelos animales a menudo están orientados a investigar dichas manifestaciones patológicas del comportamiento, tanto dentro de las enfermedades psiquiátricas como dentro de los contextos sociales, la mayoría de ellos en relación a las problemáticas humanas (Miczek y cols., 2004).

La agresión exagerada e impulsiva en los individuos pierde su capacidad comunicativa y su función biológica. Las investigaciones sobre este tipo de agresión, la cual exceden los patrones y niveles normales típicos de la especie, permiten evaluar de manera detallada los diferentes componentes de la agresividad, así como manipular dicha conducta a través de modelos farmacológicos y de desarrollo. La forma de reconocer en los modelos animales dicha alteración es la corta latencia, la alta frecuencia e intensidad de los patrones conductuales agresivos, la falta de inhibición ante la sumisión y los actos indiscriminados, persistentes y nocivos por parte del individuo (Miczek y cols., 2004). Así las siguientes son categorías de estudio dirigidas a entender la agresión intensa: “agresión por frustración”, ocurre ante la recompensa planeada no concretada, a esto se le conoce como experiencia frustrante; “instigación social”, consiste en la reacción intensa hacia la observación de un rival aún por breve instante, generalmente esta reacción es de tipo agresivo; “agresión anticipada”, se condiciona al animal a una confrontación agresiva luego de completar un requerimiento específico, estos animales se anticipan al encuentro mostrando erección pilosa, cautela y temblor de la cola (Miczek y cols., 2004).

Hay otra prueba que se utiliza para conocer el desarrollo de la agresión en los roedores antes de establecer en la edad adulta los patrones característicos de la conducta agresiva, esta es la prueba de interacción social de juego-lucha. La conducta conocida como juego-lucha es

una forma distintiva de interacción social en las ratas juveniles (otros roedores como los ratones también presentan este tipo de comportamiento). En él se incluyen una variedad de actos rudos y rodadas entre un par de sujetos o en grupos más numerosos. Un púber inicia un combate de juego o secuencia de juego con movimientos rápidos (correr), estos movimientos resultan en múltiples contactos con uno o más jóvenes. Una secuencia de persecución, de rodadas y lucha termina después de que uno de los púberes asume una posición de dominio sobre el otro, esto es, cuando uno de ellos (sometido) se coloca en invertido, mostrando el vientre, y el otro (dominante) se sube sobre él. La función del juego-lucha consiste en preparar y ejercitar a los jóvenes para el comportamiento adulto, así incrementa la aptitud física y proporciona las oportunidades para ejercitar las capacidades necesarias en la adultez. El juego-lucha es una forma inmadura del comportamiento agresivo adulto, comparte con este último los elementos de la dominancia, la amenaza, la intimidación o el daño hacia un conoespecífico. Sin embargo, es importante mencionar que el juego-lucha del púber normalmente no causa alguna herida o lesión dolorosa o traumática (un trauma físico); más aún, el púber es espontáneo y no tiene la persistencia como en la agresión del adulto (que puede insistir por días o incluso semanas). Otra diferencia está en el surgimiento esporádico del juego-lucha dentro un grupo juvenil, mientras en el adulto está dirigido específicamente a un genero y situación (agresión materna o entre machos), un ejemplo de esto es la agresión observada en contra de un macho adulto, extraño e intruso (Thor y Holloway, 1984).

### **1.3. Agresión ofensiva y defensiva**

Dentro de la agresión impulsiva o afectiva hay una clasificación más minuciosa. La razón se debe a la variedad de necesidades presentes en las situaciones sociales. De lo anterior surge la agresión ofensiva y defensiva. Cabe aclarar que aunque ambas agresiones parecen opuestas, se ubican dentro de la agresión impulsiva o afectiva debido a sus similitudes en los mecanismos emocionales y las respuestas conductuales ante una amenaza. Así, la distinción entre ambas se basa en las condiciones precedentes, la variables orgánicas, la topografía del ataque y el resultado típico (consecuencia distintiva) (Blanchard *et al.*, 2003). Las condiciones precedentes tienen que ver con la situación social, estas son diferenciables de acuerdo a las estrategias del modo de vida de la especie, en este caso los roedores viven en colonias y, por

tanto, dentro de una jerarquía social. Las variables orgánicas se relacionan a la condición física y a las características individuales del organismo, como el peso, la edad, el sexo, entre otros. La topografía del ataque indica la zona del cuerpo hacia la que se dirige el ataque. El resultado típico se refiere a la predicción de un resultado de acuerdo a la forma del ataque, por ejemplo, en el caso de la agresión ofensiva el sujeto suele lograr el sometimiento del contrincante.

Respecto a la agresión materna, esta se expresa sólo en las hembras durante la lactancia, incluye tanto características de la agresión defensiva como de la ofensiva. En este contexto, la madre elegirá la estrategia a tomar de acuerdo al género del oponente; ante un macho la respuesta agresiva será de tipo defensivo, pero ante una hembra la agresividad será ofensiva (Blanchard *et al.*, 2003).

La agresión ofensiva es una respuesta a un desafío o provocación por la obtención de recursos o protección territorial y que tiene una importancia adaptativa. En contraste, la agresión defensiva es una conducta en defensa de la integridad corporal del propio individuo. Los blancos del ataque ofensivo son los flancos y la espalda del contrincante mientras que el del defensivo es el hocico del conspecífico o del depredador (Blanchard *et al.*, 2003). Un ataque por parte de un macho incita una defensa de parte del atacado. Así, es inevitable observar que ambos comportamientos, el ofensivo y defensivo, se pueden expresar por un mismo individuo, dependiendo del contexto social en que se encuentre. Un ataque normalmente inicia con un acercamiento social de exploración, esto es olfatear la región anogenital, la nariz y el cuerpo del oponente, seguida de una erección pilosa en la espalda. La primera exploración se utiliza para obtener información sobre el género y desarrollo sexual del intruso, entonces una vez refrendada la posición del contrincante (macho adulto) es posible para el residente atacar o morder sin preludios (Wall *et al.*, 2003).

Las mordidas a la espalda son una manera de controlar el comportamiento agónico. El lenguaje corporal del residente u ofensor anuncia las mordidas con un avance lateral de ataque mientras empuja en contra del oponente erguido para lograr sacarlo de balance. El ofensor puede embestir al oponente de frente o en círculos desde esa posición lateral, esta es otra manera de llegar a la espalda. Para proteger su espalda, el oponente se coloca en posición supina. Ante un oponente tirado sobre su espalda, el agresor permanece sobre el vientre del contrincante, en algunas ocasiones lo empuja, en otras lo jala para voltearlo y exponer su

espalda de nuevo. Si el intruso trata de escapar, el residente lo persigue. Así, se puede notar que ante cualquier situación el ofensor siempre tratará de exponer la espalda del oponente para morderla (Wall *et al.*, 2003). La razón principal de exponer el vientre en posición supina ante los dientes del contrincante responde a la profunda inhibición por parte del agresor para atacar esa parte del cuerpo. Esto convierte a la posición supina en la mejor posibilidad para protegerse del ataque (Blanchard *et al.*, 2003).

El ataque de un macho dominante hacia un intruso en su territorio es agresión ofensiva. Se considera que los animales sociales como las ratas tienen muy marcados los blancos de ataque de acuerdo al tipo de agresión. Esto sucede porque el herir mortalmente a un miembro de su colonia en sociedades pequeñas y por tanto genéticamente cercanas se traduce evolutivamente en un daño para el propio agresor. Por ello, la estrategia de un macho dominante es expulsar por medio de mordidas en la espalda a los machos jóvenes de su progenie para evitar la competencia en lugar de matarlos, eventualmente, esos machos jóvenes transmitirán sus genes al aparearse con hembras de otras colonias (Wall *et al.*, 2003).

#### **1.4. Prueba de residente-Intruso**

Como ya se mencionó, es necesario tener un modelo, paradigma y protocolo de registro dentro de la investigación dirigida a entender la agresión. La prueba residente-intruso es uno de los paradigmas utilizados, aprovecha el componente territorial del sujeto para inducir la confrontación.

Se coloca un macho residente (o acompañado de una hembra, la cual se remueve antes de iniciar la prueba) dentro de una caja por 24 h. Pasado este tiempo, se introduce en esa misma caja un macho desconocido de similar peso y edad, este es el intruso. La prueba consiste en reconocer y cuantificar durante un tiempo estipulado los diferentes componentes de la conducta agresiva durante la confrontación de los sujetos, dependiendo del objetivo del estudio se centrará la atención en uno o ambos contrincantes. En la prueba se suelen utilizar animales inexpertos para observar una mayor variedad de tendencia del ataque, debido a que un experto atacaría directamente (Wall *et al.*, 2003).

Típicamente el comportamiento observado durante la prueba sigue el siguiente desarrollo conductual: el residente inicia un acercamiento exploratorio social (olfateo,

erección pilosa y chillido) seguida de un ataque a la espalda y la defensa por parte del intruso. La situación se continúa en un ataque y contraataque de ambas ratas, donde a menudo el intruso se opone atacando activamente al residente. Entre más experiencia tiene los sujetos defendiéndose más evitan las mordidas y menos huyen para evitar dejar su espalda y flanco al alcance del ofensor mientras corre (Wall *et al.*, 2003),

Las mordidas defensivas de los subordinados o intrusos suelen suceder pocas veces, tal vez por la situación experimental controlada. Se observa la mordida del intruso inmediatamente después (1s) y durante la mordida que le propina el residente porque aprovecha la cercanía del hocico o la cabeza del residente para morderla. Cabe mencionar que las ratas silvestres, probadas en el laboratorio o en el medio natural, dirigen este mismo patrón de ataque ofensivo y defensivo (Wall *et al.*, 2003). También, componentes de la agresión ofensiva como perseguir, el ataque lateral y lucha, así como de la agresión defensiva como el arqueamiento del dorso, las orejas en posición horizontal y hacia atrás, la posición erguida de defensa, el gruñido/vocalización y la huida son muy similares entre las ratas silvestre y de laboratorio (Blanchard *et al.*, 2003).

### **1.5. Componentes neuroanatómicos de la agresión**

Se ha sugerido que las áreas neurales importantes para la regulación de la agresión son similares en los seres humanos y los animales. A continuación se describirá brevemente el mecanismo funcional y algunas de las áreas neurales que modulan la expresión de la agresión.

Los componentes de la agresión son organizados, principalmente, por la sustancia gris periacueductal dorsal y central (PAG por sus siglas en inglés). La PAG se ubica alrededor del acueducto cerebral, su parte dorsal recibe proyecciones del hipotálamo, de la amígdala central y basal, de la corteza prefrontal y del núcleo septal. De su parte ventral recibe proyecciones de la amígdala central (Gregg, 2003).

Las neuronas de la PAG proyectan al tallo cerebral, región efectora de los componentes de la agresión defensiva. Las proyecciones de la PAG van a: 1) locus ceruleus (produce la excitación del sistema simpático); 2) al área tegmental central, al núcleo motor del nervio trigémino (responsable de la apertura mandibular y el siseo); 3) la región motora

mesencefálica, a las neuronas motoras de la medula espinal y al núcleo hipoglosos (responsables de la vocalización y movimientos de la lengua) (Gregg, 2003).

Básicamente, la PAG envía comandos por medio de sus proyecciones descendentes a la región efectora del tallo cerebral, la cual puede estimular la expresión de conductas defensivas por sus proyecciones motoras. Otro de los componentes neurales que participan en la modulación de la agresión principalmente defensiva, además de otras conductas como la reproducción, ingestión de alimento y la homeostasis, es el hipotálamo medio. Esta región recibe proyecciones de un amplio número de áreas límbicas y del tallo cerebral. El hipotálamo medio a su vez proyecta hacia la PAG (Gregg, 2003). Finalmente, aunque no de menor importancia, el área hipotalámica anterior y el hipotálamo ventromedial (HVM) también participan en la modulación de la agresión. Por ejemplo, lesiones o destrucción del HVM en la rata estimulan la agresión (Gregg, 2003; Albert *et al.*, 1985).

La intensidad de la agresión es modulada por las estructuras corticales y límbicas, a estas se les llama por tanto estructuras moduladoras. A continuación se describen las más relevantes para la agresión, incluyendo a la amígdala, el septum, la corteza prefrontal y el núcleo accumbens. La participación de las anteriores estructuras neurales en la modulación de la agresión se ha logrado conocer por medio de la lesión y estimulación eléctrica de dichas áreas (Gregg, 2003).

La amígdala se localiza en la parte anterior al hipocampo en el lóbulo temporal. Tres de sus núcleos, el basal, lateral y el accesorio basal, se localizan en el centro del complejo amigdalino mientras que el resto se localizan en la periferia del mismo, estos son el núcleo medio, el núcleo cortical y el área amigdaloides anterior. La mayoría de los impulsos que llegan a la amígdala provienen de la corteza cerebral y del tálamo, los cuales proyectan a los demás núcleos amigdalinos, entre ellos el basal y central. El núcleo basal a su vez proyecta al núcleo central. El núcleo central proyecta a las áreas del bulbo raquídeo, entre ellas a la PAG. Entonces la información en la amígdala fluye del núcleo lateral al central, medio, basomedial y basolateral. La activación del núcleo central inhibe la agresión defensiva y la del núcleo medio la aumenta (Gregg, 2003).

Por otro lado, la corteza prefrontal está implicada en la inhibición del comportamiento en general, en particular inhibe las respuestas inapropiadas en la selección de tareas, trabajo de

memoria y la personalidad. En humanos y monos está bien definida por una capa granular, la cual recibe numerosas proyecciones del núcleo mediodorsal del tálamo. Este a su vez recibe proyecciones de la amígdala y de otras áreas. En los roedores y gatos la corteza prefrontal no está definida por una capa granular. Tal vez debido a la importancia de esta en la ruta sináptica para alcanzar la conciencia en el caso de los primates es que existe dicha diferencia. La estimulación eléctrica en esta área suprime la respuesta defensiva hipotalámica (hipotálamo medio) y la lesión en el hipotálamo medio evita la supresión. De manera similar, cuando la corteza prefrontal tiene una función reducida también se evita esta supresión de la agresión defensiva (Gregg, 2003).

El Núcleo Bed de la Estria Terminalis (BNET, por sus siglas en inglés) también participa en los procesos afectivos de la agresión por sus conexiones con la amígdala y el hipotálamo. Lesiones del BNET estimulan la agresión en la rata y el gato (Gregg, 2003).

El núcleo acumbens es importante en la motivación y acción de recompensa y comportamientos dirigidos a metas. Esto ocurre gracias a la inervación dopaminérgica proveniente de las células del área ventral tegmental (por sus siglas en inglés VTA) con un papel crucial en estos comportamientos. El núcleo acumbens influye en la expresión de los componentes agresivos, principalmente aquellos dirigidos a una meta, es el caso del las patadas y del ataque directo con las garras y dientes. Por ello es importante en el control límbico de la actividad motora (Gregg, 2003).

### **1.6. Emoción y agresión Afectiva**

El comportamiento agresivo típico descrito en párrafos anteriores es considerado un recurso apropiado del repertorio adaptativo dentro del comportamiento de los individuos. El problema surge al no darse una regulación emocional apropiada. Thomson (1994), definió a la regulación emocional como *“los procesos extrínsecos e intrínsecos responsables de monitorear, evaluar, y modificar las reacciones emocionales para realizar un objetivo”* (p. X). Así, ante una situación social donde un estímulo que normalmente no provoca una reacción agresiva, el estímulo sobre-activa la respuesta estresante básica y se expresa la agresión; esto puede ocurrir en individuos que no regulan de manera adecuada las emociones, como en los humanos con perturbaciones psiquiátricas (Blair y Charney, 2003).

La agresión afectiva generalmente se expresa de manera espontánea, sin planeación ni premeditación por medio de ataques intensos y excesivos respaldados por procesos de furia sobre los objetos o individuos que se perciben de manera exagerada como amenazas o frustraciones. Cabe aclarar que la meta en la agresión reactiva no tiene un objetivo definido o mejor dicho consciente o activo como ocurre con la depredación, pues al ser un detonante emocional el estímulo es irritante o estresante para el animal (Blair y Charney, 2003).

Como ya se dijo, existen dos vías que hacen inapropiada la regulación emocional de la agresión, una es que el sistema sensorial que percibe la amenaza este alterado y no sea suficiente la actividad reguladora (sistema cortical) para inhibir la agresividad. La otra vía es que el sistema regulador este dañado o funcionalmente deficiente e intérprete inadecuadamente el estímulo social y desencadene la agresión. Normalmente, una estimulación leve al circuito neural de la agresión afectiva inicia una respuesta de congelamiento en el animal, un nivel superior del estímulo desencadena un comportamiento de escapatoria, y un nivel todavía más alto del estímulo desata la agresión defensiva (Blair y Charney, 2003). Una de las maneras de reconocer el nivel del estímulo es por medio del grado de amenaza hacia el sujeto, esto es, como se describió anteriormente, cuando el ofensor o agresor va aumentando el grado de agresión; primero amenaza, si no logra amedrentar entonces persigue, y si no huye el intruso finalmente lo ataca.

Las neuronas de la corteza frontal y de la corteza orbito-frontal participan en la modulación del circuito de la agresión. Primero, el procesamiento de las señales visuales y auditivas dentro de un contexto social (señales de amenaza y de provocación) se realiza en la parte posterior y media de la corteza temporal, al reunirse estas señales, el lóbulo temporal anterior evoca eventos e información relevantes relacionados a estas, por ejemplo, el estatus social, sexo, etc. del oponente. Posteriormente estas señales activan directamente, aunque de un modo difuso, los sistemas de respuesta de agresión/irritabilidad en la corteza cortical/subcortical (Potegal, 2012). Entonces el circuito corre de la amígdala media, descendiendo principalmente por la estría terminalis hacia el hipotálamo medio y de ahí a la mitad dorsal de la sustancia gris periacueductual (Blair y Charney, 2003).

Este sistema se organiza jerárquicamente, esto significa que la presencia de la conducta agresiva provocada por la estimulación eléctrica de la amígdala depende de la integridad

funcional del hipotálamo medio y la PAG, por el contrario, la agresión resultante de la estimulación de la PAG no requiere de la integridad funcional de la amígdala, entonces la jerarquía funcional indica que la PAG es la parte final de la ruta necesaria para realizar la conducta agresiva, si este último “peldaño” está dañado, no importa que el resto del circuito funcione bien no habrá respuesta agresiva; por el contrario, si este funciona correctamente y hay alguna anomalía en el circuito, la manera de presentarse la conducta agresiva cambiará, es decir, la modulación de la agresión estará afectada (Blair y Charney, 2003).

Se han descrito al menos tres sistemas principales reguladores de la agresión. Estos son: 1) la amígdala y dos regiones corticales, 2) la corteza media frontal, y 3) la corteza orbito-frontal. La amígdala, por su parte, modula la probabilidad de que el organismo inicie la agresión ofensiva, parece inhibir la agresión afectiva, debido a que reacciona principalmente para reforzar o aborrecer un estímulo. La amígdala podría mejorar o disminuir la respuesta del sistema cortical responsable de actuar ante la amenaza (Blair y Charney, 2003).

Las neuronas de la corteza frontal participan en la modulación de los circuitos subcorticales mediadores de la agresión afectiva. Se ha encontrado que una disfunción de la corteza prefrontal está presente en individuos con una agresión predominantemente afectiva. Además, los diferentes aspectos de las funciones ejecutivas son dissociables y mediados por distintos sistemas neurales a su vez favorecidos por distintas regiones de la corteza prefrontal. Aunque la corteza media frontal y la corteza orbito frontal están interconectadas y frecuentemente funcionan en conjunto, tiene diferente rol y la regulación que ejercen sobre la emoción la realizan por medio de procesos computacionales distintos. Un estímulo adverso suprime a las neuronas de la corteza media frontal hasta el punto de permitir la activación de la amígdala por parte del estímulo adverso (Blair y Charney, 2003). Además, la corteza orbito frontal puede incrementar o disminuir la probabilidad de expresar la agresión reactiva en función del contexto social (Blair, 2004).

Generalizando, la amígdala y la corteza frontal (media y orbito-frontal) modulan el circuito de acción de la agresión afectiva. La amígdala ejerce su acción moduladora ante la presencia de una amenaza o ante una señal dentro del ambiente. La modulación por la corteza frontal ocurre en función de la información social de tipo emocional, la representación de las

normas sociales y el conocimiento de la posición del contrincante en la jerarquía de dominancia (Blair y Charney, 2003).

### 1.7. La amígdala y la agresión defensiva o afectiva

La agresión defensiva, también llamada impulsiva o afectiva, como ya se mencionó, está relacionada a emociones negativas, por esto se ha conectado a conceptos como la *violencia impulsiva*, esta última se vincula con alteraciones en los sistemas cerebrales de regulación emocional (Alcazar-Córcoles y cols., 2010).

El núcleo medial de la amígdala potencia la agresión defensiva, esto ocurre cuando se estimula eléctricamente esta área, estímulo que se proyecta hacia el hipotálamo medio. Al mismo tiempo, la excitación del núcleo medial suprime la agresión predatoria, conducta mediada por el hipotálamo lateral. Por otro lado, la estimulación de los núcleos lateral y central de la amígdala suprime la respuesta agresiva defensiva. Por tanto, la vía de acción es disináptica (dividida en dos rutas sinápticas), en donde la señal de *potenciación* va a la estra terminalis y de ahí al hipotálamo medio, mientras que la de *supresión*, por medio de las neuronas inhibitorias GABAérgicas, proyecta del hipotálamo medio al hipotálamo lateral para suprimir el ataque predatorio. Si por el contrario se inhibe la agresión defensiva, las neuronas GABAérgicas inhibitorias proyectan desde la amígdala a la PAG mientras la amígdala lateral excita el ataque agresivo predatorio (Siegel y cols., 2007).

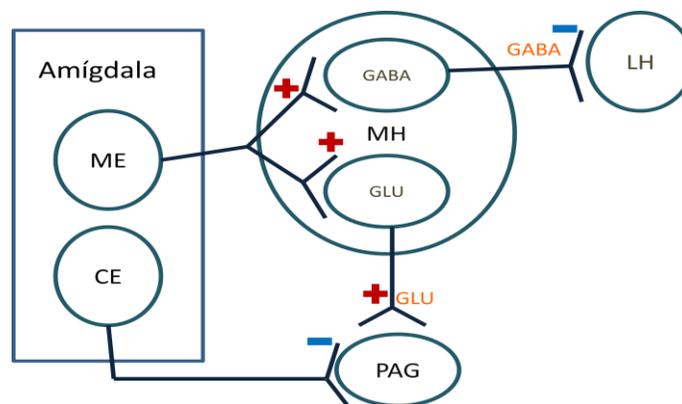


Figura 1. Se muestran las proyecciones de la amígdala, los signos de más rojos indican la estimulación y los signos menos azules indican la inhibición (Siegel *et al.*, 2007). CE=amígdala central; ME= amígdala media; MH= hipotálamo medio; LH= Hipotalamo lateral; Glu = glutamato; PAG=sustancia gris periacueductual.

La señal de *potenciación* es realizada por las proyecciones largas glutamatérgicas, mismas que salen del hipotálamo medio hacia la PAG, lo que constituye la ruta descendente de la agresión defensiva. La señal de supresión es realizada por las neuronas GABAérgicas, estas tienen axones cortos y se conectan al hipotálamo lateral para inhibir el ataque predatorio (Siegel y cols., 2007).

Resumiendo, la acción del sistema en su conjunto es el siguiente: Las estructuras límbicas, como la amígdala y la corteza prefrontal, son activadas por señales sensoriales que llegan hasta ahí por medio de las vías aferentes, estas vías provienen de las regiones sensoriales de la corteza cerebral y sus regiones límbicas son a su vez moduladas por las neuronas monoaminérgicas situadas dentro de la formación reticular del tallo cerebral (Siegel y cols., 2007). Subsecuentemente, los cambios en los niveles de excitabilidad dentro del sistema límbico cambia la regulación a través de las rutas eferentes de las estructuras límbicas como el fornix y la estría terminalis a el hipotálamo, lo que provoca cambios en la excitabilidad de las neuronas hipotalámicas, afectando directamente el control de los mecanismos neurales sobre el comportamiento agresivo y la ira (Siegel y cols., 2007).

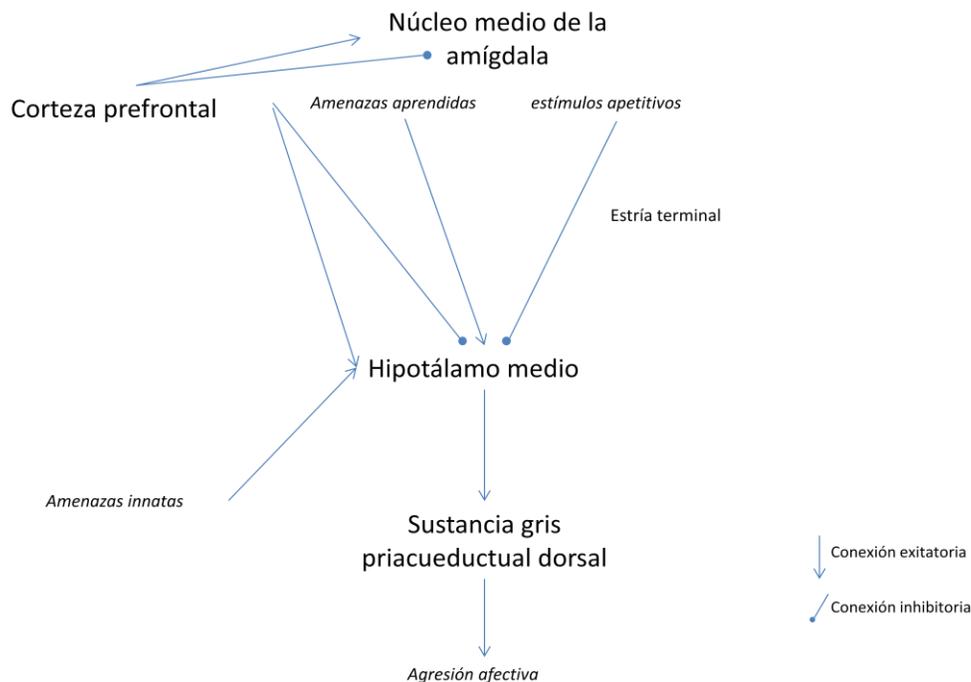


Figura 2. Se muestra esquemáticamente el circuito neural de la agresión afectiva (Modificado de Gregg, 2003).

### **1.8.La serotonina y la agresión defensiva o afectiva**

Estudios clínicos y preclínicos (en animales de laboratorio), sugieren que la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) es el mayor modulador de las conductas emocionales como la ansiedad, depresión, impulsividad y agresión, pues integra funciones sensoriales, cognitivas y motoras en un amplio rango de especies, incluyendo al humano (Takahashi *et al.*, 2011; Olivier, 2004; Quadros *et al.*, 2010; Lesch, 2003; Coccaro, 1989). Estudios iniciales propusieron la hipótesis del déficit de serotonina y la expresión de conductas agresivas impulsivas, hostiles y violentas (Quadros *et al.*, 2010). Además, se han reportado bajos niveles del metabolito de la 5-HT, el ácido indolacético (5-HIAA), en líquido céfalo raquídeo en primates no humanos (Wesergaard *et al.*, 1999), en marinos con historia de agresividad repetitiva (Brown *et al.*, 1979), y en pacientes con personalidad antisocial y alcohólicos tipo II que manifiestan agresividad impulsiva (Linnoila *et al.*, 1983). En especies como el hamster y la rata, los machos que son instigados a pelear tienen niveles bajos de serotonina en el hipotálamo y la corteza prefrontal (Van Erp & Miczek 2000)

En general, la disminución en la activación de los receptores a serotonina, en el número de neuronas serotoninérgicas o bajos niveles de serotonina o su metabolito (5-HIAA) en el líquido cefalorraquídeo, se relaciona con el aumento de la agresión afectiva. Por ello, se ha postulado que la deficiente regulación serotoninérgica altera la regulación emocional y agresiva del tipo afectivo por dos vías, 1) menor eficacia en las funciones de las regiones frontales, aquellas implicadas en la regulación de este tipo de agresión, y 2) previniendo la acción supresora selectiva del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en las neuronas del PAG, mediadoras de la agresión afectiva (Blair y Charney, 2003).

El sistema serotoninérgico central se origina en el mesencéfalo y tronco del encéfalo del complejo del rafe. Está ampliamente distribuido a lo largo del cerebro y su mensajero químico es visto como un control maestro de los neurotransmisores. Este elaborado sistema de comunicación neural es mediado por aproximadamente 14 subtipos de receptores pre y pos sinápticos. Las conexiones rostrales y caudales del Rafe se dirigen hacia el hipotálamo anterior, la amígdala (medial), el séptum, la corteza orbitofrontal y prefrontal media, la sustancia grís periacueductal, el hipocampo y al núcleo accumbens (Gregg, 2003). La corteza prefrontal es la mayor receptora de conexiones aferentes serotoninérgicas. Parece que en

individuos con comportamiento violento impulsivo hay una disfunción en estas conexiones. Esta falta de regulación de las emociones negativas es un riesgo para generar la agresión y la violencia (Lesch, 2003).

La acción de la serotonina como mensajero es regulada por sus enzimas de síntesis y metabolismo, además de su transportador. Las neuronas del rafe envían sus proyecciones a prácticamente todas las regiones cerebrales implicadas en el comportamiento agresivo, y las neuronas presentes en las áreas mediadoras de la agresión, expresan densamente receptores del subtipo 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. Además, la serotonina es un regulador importante de la actividad morfogenética en las etapas tempranas del desarrollo, así como en la neurogénesis y plasticidad en la edad adulta, donde se incluye la proliferación celular, migración, diferenciación y sinaptogénesis (Lesch, 2003).

Se ha propuesto la hipótesis de que la 5-HT ejerce un control inhibitorio sobre la agresión. La disminución de la actividad serotoninérgica central puede causar un déficit en la espera del reforzamiento y disminuye la latencia para iniciar la agresión impulsiva y favorece la expresión de la violencia. Las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo del mayor metabolito de la serotonina, el 5-HIAA, refleja la actividad serotoninérgica presináptica en el cerebro. Se ha encontrado disminución de la concentración de 5-HIAA en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con comportamiento impulsivo, agresivo y con desórdenes psiquiátricos, así como en víctimas de suicidios violentos,. Además, bajas concentraciones de 5-HIAA pueden predecir la agresión explosiva y la violencia impulsiva en chicos con desórdenes conductuales. Igualmente, macacos *rhesus* machos con bajas concentraciones de 5-HIAA presentan comportamiento antisocial (Lesch, 2003).

Los estudios de tomografía por emisión positrones (por sus siglas en inglés PET) ha mostrado una disminución del metabolismo de la glucosa en respuesta a un estímulo serotoninérgico en las regiones corticales prefrontales y del cíngulo anterior de pacientes con desorden de personalidad impulsiva y agresiva, es decir, ha mostrado anomalías en la función de la 5-HT (Lesch, 2003). De igual forma, por medio del PET se ha observado en pacientes con desorden de personalidad antisocial en quienes hay una propensión a la agresión impulsiva y una reducción en el volumen de materia gris en dichas áreas neurales. También se han registrado anomalías en la corteza prefrontal de individuos responsables de una

agresión impulsiva. En asesinos con desórdenes de impulsividad y afectividad, hay una hipoactividad en el área prefrontal tanto en su zona lateral como media, así como una hiperactividad en la amígdala derecha, pero no en la izquierda (Lesch, 2003).

### **1.9. Los receptores 5-HT y la agresión**

Se han caracterizado 14 diferentes tipos de receptores a serotonina: 1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 2A, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 y 7, localizados en la mayoría de las áreas neurales involucradas en la modulación de la agresión (Takahashi *et al.*, 2010). Sin embargo, la excesiva agresividad e impulsividad es causada por un decremento en el intercambio de 5-HT y por una deficiencia en la función de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> en regiones cerebrales relacionadas a la emoción (Lesch, 2003).

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están localizados preferentemente a nivel presináptico en las dendritas (receptores somatodendríticos) que inervan a las neuronas del rafe, y a nivel postsináptico en neuronas no serotoninérgicas (Olivier, 2004). El receptor 5-HT<sub>1B</sub> se expresa en los ganglios basales, la sustancia gris central, el septum lateral, el hipocampo, la amígdala y el rafe tanto en su faceta de terminales presinápticas para inhibir la liberación de 5-HT o como heteroreceptores moduladores de la liberación de otros neurotransmisores. La activación de este receptor influye en la ingesta de comida, la actividad sexual, la locomoción y la agresión. Además de ser muy importante en la modulación de la locomoción y la agresión, también participa en el comportamiento adictivo y agresivo, pues al ser suprimido en ratones (KO del receptor 5-HT<sub>1B</sub>), estos animales presentan mayor ingesta de cocaína y alcohol, así como un aumento en los ataques realizados (Lesch, 2003).

Como se mencionó previamente, la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y el 5-HT<sub>1B</sub> tienen una participación importante sobre la regulación del comportamiento agresivo. Así, la administración de agonistas a dichos receptores causan una reducción en el ataque ofensivo en ratas y ratones (Wall *et al.*, 2003). Además, la agresión ofensiva se asocia a incremento postsináptico de la disponibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en las regiones límbicas y corticales (Lesch, 2003).

### **1.10. El déficit de serotonina como responsable de la agresión**

Una de las maneras en que se ha apoyado a esta hipótesis es aquella en la que se ha hecho manipulación de los niveles de triptófano, precursor de la síntesis de serotonina. La disminución de triptófano en la dieta se ha relacionado con el aumento en el comportamiento agresivo. También se sabe que esta deficiencia se vincula con comportamientos combativos (Siegel y cols., 2007).

Otra de las maneras que se ha relacionado el déficit de serotonina y agresión, es la manipulación de la hidroxilasa que participa en la síntesis de 5-HT. Se han detectado variaciones del gen que la codifica dicha enzima y, la disminución en la activación de dicho gen, produce la disminución en la cantidad de serotonina sináptica. Así, son explicables no sólo los bajos niveles de serotonina en cerebro, sino también la intensificación del comportamiento agresivo (Siegel y cols., 2007).

Los niveles hormonales también muestran un cambio ante la variación del nivel de serotonina. Cuando los niveles de serotonina disminuyen, se observa un aumento en la respuesta endocrina, sobre todo de la prolactina, de la hormona del crecimiento, del cortisol y de la corticotropina y se despliega un mayor índice de agresión. Lo mismo ocurre con las hormonas gonadales, en donde se ha visto que individuos con un alto índice de agresividad, además de tener bajos niveles de 5-HIAA en líquido cefalorraquídeo, presentan altas concentraciones de testosterona en sangre. Algo interesante es que mientras los niveles bajos de serotonina son asociados al aumento de impulsividad, la testosterona está asociada a la competitividad agresiva. Por ello, la combinación de bajos niveles de serotonina y testosterona podrían favorecer el aumento de la agresión impulsiva y competitiva, en general esto aumenta la severidad de la agresión (Siegel y cols., 2007).

### **1.11. La experiencia social**

La conducta depende de múltiples factores: genéticos, contexto social, hormonales, neuroquímicos y de las experiencias sociales durante el desarrollo del sistema nervioso. Esto es especialmente importante en la primeras etapas del desarrollo posnatal de las especies altriciales. Las especies altriciales nacen en un estado de desarrollo sensorial y motor

inmaduro, ejemplos de estas especies se encuentran en los félidos, cánidos, lagomorfos, roedores y primates, incluyendo al humano (Champagne y Curley, 2011).

Se sabe que eventos adversos en etapas tempranas de la vida como la etapa prenatal y la posnatal temprana, tiene efectos de larga duración en el fenotipo de las crías (Curley y cols., 2008). De hecho, se conoce que la experiencia temprana durante periodos sensibles tiene el potencial de modificar los circuitos cerebrales por medio de la plasticidad cerebral (Heiming y cols., 2011), ya que durante estos periodos del desarrollo, los factores ambientales tienen un alto impacto en el comportamiento posterior (Beery y Francis, 2011). Las modificaciones más importante ocurren en la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y de los neurotransmisores (por ejemplo, serotonina y dopamina) (Hasselt y cols., 2012; Cushing y Krame, 2005).

El cuidado materno en los mamíferos representa el mayor constituyente del ambiente en la primera etapa de vida. Las variaciones naturales en el cuidado materno causa un efecto significativo sobre el contenido de los neurotransmisores en varias estructuras cerebrales e incluso regiones como la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado ventral (Masís-Calvo y cols., 2013). La interacción de la progenie con la madre es la primera estimulación social que afecta a largo plazo su fenotipo. Los estudios en este campo del conocimiento han ayudado a comprender la importancia de la historia de vida, favoreciendo el desarrollo de aproximaciones experimentales dirigidas al estudio del desarrollo cerebral y la transmisión del comportamiento de una generación a otra, conocida como la transmisión intergeneracional (Champagne y Curley, 2005).

### **1.12. Influencia del cuidado materno en el desarrollo cerebral y la conducta**

La interacción madre hijo ocurre en dos etapas en particular. Estas son durante la gestación y durante el período postnatal pre-destete. Las primeras son de importancia para aquellas especies con largos periodos de gestación. Sin embargo, como ya se dijo, en el caso de las especies altriciales, la falta de madurez después del parto las obliga a depender del cuidado materno (conducta materna: CM) durante el periodo posnatal (Champagne y Curley, 2005).

La CM consiste en el despliegue de patrones motores por parte de la madre, al final de la gestación, durante y después del parto, para proveer a las crías de calor, protección, nutrición y

estímulos sensoriales y sociales necesarios para el desarrollo de las crías. Después del parto, la madre acarrea las crías al nido, les lame el cuerpo y los genitales y las amamanta. Ella lame el cuerpo de las crías (para mantenerlas limpias), y la región anogenital (para estimular la micción y la defecación), ingiere su orina y heces fecales, las acarrea (si se alejan del nido), las agrupa dentro del nido, se coloca sobre ellas, adopta la postura de amamantamiento y las amamanta frecuentemente. Además, es agresiva hacia extraños: conespecíficos y humanos (Rosenblatt y Lehrman 1963; González-Mariscal y Poindron 2002). El amamantamiento inicia cuando la hembra se coloca sobre las crías, mientras las lame, lo que facilita la succión, posteriormente esta postura se intensifica (postura de amamantamiento de baja intensidad), mientras algunas crías inician la succión, pero ella aún puede estar lamiendo algunas crías, jalando material del nido o acicalándose. Posteriormente, dicha postura se intensifica aún más con una pronunciada ventroflexión, separación de las extremidades posteriores y depresión de la cabeza, de tal manera que se crea una cavidad bajo el vientre de la madre que permite el amamantamiento de las crías (postura de amamantamiento de alta intensidad), en este momento la hembra se queda inmóvil y no realiza ninguna otra conducta (Rosenblatt y Lehrman 1963; González-Mariscal y Melo, 2013). La expresión de las conductas anteriores provee a las crías una gran cantidad de estímulos sensoriales (táctiles, odoríferos), sociales y hormonales (a través de la leche materna), así como procesos fisiológicos tales como la lactancia, que participan en la continuación del crecimiento y desarrollo de estas (González-Mariscal y Melo, 2013).

Los estudios de privación de los cuidados maternos durante la infancia en primates y roedores han mostrado el importante papel de la experiencia temprana en el desarrollo del comportamiento social. En monos *rhesus* aislados durante los primeros 3 a 12 meses de edad muestran conductas defensivas en el comportamiento de juego (cuando son jóvenes), tiene deficiencias de aprendizaje, miedo exacerbado y una cohibición del comportamiento (cuando son adultos). Un efecto similar se observa en ratas adultas separadas de la madre desde el día 3 posnatal y criadas en completo aislamiento social. La interacción madre-crías se puede interrumpir o alterar a través de diversos modelos experimentales, como la “manipulación materna” o la separación materna. Dichas manipulaciones afectan a largo plazo el desarrollo de diversos sistemas positiva o negativamente. La “manipulación materna” consiste en

remover diariamente a las crías del nido por 15 min y regresarlos con su madre, procedimiento que induce en la madre un incremento en la cantidad de lamidos hacia ellas. Al final de la lactancia (en el destete; día 22 postnatal), las crías de estas madres habrán recibido una mayor cantidad de dichos estímulos, los cuales modifican positivamente su desarrollo. Al contrario, la separación materna reduce o abole en las crías la percepción de los estímulos sensoriales y sociales. La separación materna puede ser parcial (SMP) o total (SMT). La primera consiste en separar a las crías del ambiente materno durante 3-24 horas diarias, durante los primeros 14 días de vida. En cambio, la SMT consiste en separar a crías de 3-4 días de vida del nido y mantenerlas aisladas durante todo el período postnatal pre-destete dentro de un sistema de crianza artificial, para proveerles calor, protección y nutrientes hasta el destete. La SMP causa alteraciones negativas a largo plazo en varios sistemas fisiológicos, endocrinos, nerviosos y conductuales (Hull *et al.* 1984). Sin embargo, este tipo de separación no sólo involucra la separación de la madre y de los hermanos de camada, sino también producen estrés asociado a cambios en la temperatura corporal y a periodos de privación de nutrientes. En contraste, en la SMT dichos efectos colaterales son de menor intensidad, e incluso existe la hipótesis de que no ocurren. Específicamente, se ha reportado que la respuesta de corticosterona ante la inyección subcutánea de solución salina es similar entre las crías mantenidas dentro del sistema de crianza artificial y las criadas por su madre (Lomanowska y cols., 2011). Se ha reportado en ratas adultas que sufrieron SMT y criadas en el sistema de crianza artificial: 1) déficit de atención e hiperactividad (Melo y cols, 2009; Gonzalez y cols., 2001), 2) déficit de aprendizaje social (Levy y cols., 2003), 3) reducción de la respuesta inhibitoria al prepulso (PPI, prepulseinhibition, elemento utilizado como modelo de esquizofrenia; Lovic y Fleming 2004), 4) déficit en la expresión de la conducta sexual masculina (Lenz *et al.*, 2008) y en la conducta materna (Gonzalez y cols., 2001), 5) cambios en la respuesta a anfetaminas (Lovic y cols., 2006), 6) incremento en la respuesta al estrés (Gonzalez y cols., 2001), 7) incremento en los niveles de agresión ofensiva en hembras no gestantes (Melo y cols. 2006) y materna (Melo y cols. 2009), y 8) mayor impulsividad (Lovic y cols. 2011). Con la finalidad de prevenir el efecto de la privación materna, en dichos estudios se proveen a las crías durante su aislamiento (en grupos independientes) estímulos sensoriales (con una brocha de pelos de camello) o sociales (se colocan crías de la misma edad dentro de los recipientes de aislamiento). Los

resultados han mostrado que dicho re-emplazo de estímulos previenen parcialmente algunos de los efectos negativos de la SMT.

Las variaciones naturales en el cuidado materno también proveen evidencia de la participación de los estímulos provenientes de la madre en el desarrollo de la progenie. Las crías que son cuidadas por madres que las acicalaron y lamieron mucho durante las primeras dos semanas postparto manifiestan, cuando adultas, menos miedo, presentan una respuesta de corticosterona al estrés atenuada e incrementan el nivel de expresión de receptores a glucocorticoides en el hipocampo en comparación a aquellas que recibieron pocas lamidas y acicaladas (Champagne y Curley, 2005). Lo anterior muestra que la calidad-cantidad del cuidado materno afecta la expresión fenotípica de la conducta y de la fisiología del sistema de respuesta al estrés (eje HHA). Además, deja claro que la variación en la interacción social dentro del rango normal de comportamiento causa efectos duraderos y prolongados en la descendencia (Champagne y Curley, 2005).

Es claro que la experiencia temprana influye en el desarrollo neurobiológico. Por ello encontrar los mecanismos relacionados es de suma importancia. Tradicionalmente, se ha señalado a los receptores a glucocorticoides en el hipocampo como los mediadores de los cambios de la respuesta del estrés observados en las crías de acuerdo a la calidad de la crianza. Se ha sugerido que la metilación del DNA de las regiones que codifican para el receptor a glucocorticoides es la principal responsable del cambio fenotípico. Cuando las crías reciben con alta frecuencia lamidos corporales y genitales, así como mucho tiempo de amamantamiento, ocurre una disminución de la metilación del promotor al receptor alpha a estrógenos. Básicamente, el grupo metilo a DNA bloquea el factor de transcripción desde el acceso adquirido para el gen, con ello la expresión del gen se hace silenciosa. Estos cambios epigenéticos (cambios inducidos por factores externos que modifica la expresión de los genes) se mantienen después de la división celular y ocurre durante la etapa de diferenciación celular. También se sabe que la metilación no presenta cambios en todo el periodo de gestación, es hasta el día 6 posparto que la diferencia en la metilación se hace evidente y se mantiene incluso hasta la adultez. En contraste, cuando las crías reciben pocos lamidos corporales y genitales, así como poco tiempo de amamantamiento, presentan mayor metilación en la región promotora del receptor a glucocorticoide y del promotor del receptor a estrógenos alfa que

aquellas mejor cuidadas, así provoca una disminución en la transcripción de dicho promotor. Esto se relaciona con los bajos niveles del receptor glucocorticoide en estas crías y, a su vez, se asocia a la interrupción del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Champagne y Curley, 2005).

### **1.13. Impulsividad y cuidado materno**

La impulsividad se define como el control inhibitorio reducido o desinhibición conductual, a la intolerancia para demorar o postergar la recompensa y a la rápida toma de una decisión con falta de consideración. Esta se relaciona a la pobre habilidad en la atención y a la hiperactividad. Además, esta incluye una gama de acciones que están pobremente concebidas, expresadas prematuramente, que además son exageradamente arriesgadas o inapropiadas para la situación y que frecuentemente terminan en consecuencias indeseables (Winstanley, 2007).

La impulsividad es un proceso general. Es la base de algunos problemas sociales importantes, entre ellos la agresión. La impulsividad se considera una falla en la mediación inhibitoria a nivel central del sistema serotoninérgico y se considera una pérdida de control sobre la ansiedad del sujeto. Lo anterior es importante porque los comportamientos adictivos se caracterizan por repetidos actos con la intención de obtener un beneficio inmediato sin reconocer una consecuencia negativa posterior y, además, fuera del control racional del individuo (Brunner y Hen, 2007).

La agresión impulsiva por su parte, como ya se mencionó, tampoco evita las consecuencias negativas de llevar a cabo la conducta agresiva, la cual se caracteriza por no frenar las “ansias” de concretarla, por lo que el mecanismo subyacente a ambos comportamientos puede atribuirse al componente conductual de la impulsividad. De manera similar a lo que ocurre con la agresión, donde se propone una relación inversa entre la agresión y la serotonina, la impulsividad sigue el mismo patrón de asociación atribuyéndose bajos niveles de serotonina con un comportamiento impulsivo (Brunner y Hen, 2007).

### **1.14. Reversibilidad de la experiencia temprana sobre la conducta**

Aunque ha sido mostrada la duración del efecto causado por la experiencia temprana, no se debe olvidar la plasticidad existente en el sistema nervioso ante la experiencia subsecuente,

esta puede alterar el desarrollo de la conducta, incluso al grado de compensar el efecto de la experiencia temprana. Sin embargo, esto no significa que el efecto se revierta por completo, sino que la experiencia posterior por medio de otros mecanismos, una vía alterna, puede compensar el resultado final en el comportamiento (Champagne y Curley, 2005).

La SMT y crianza artificial (CA) es un modelo experimental que permite evaluar la participación global de los factores o señales sensoriales y sociales provenientes de la madre y de los compañeros de camada durante este periodo crítico de desarrollo del sistema nervioso. Además, también ayuda a determinar a través del reemplazamiento experimental, cuál o cuáles de las señales involucradas participan en el desarrollo de determinados sistemas fisiológicos, neuroendocrinos o conductuales (Melo y Fleming, 2006). Como se ha descrito anteriormente, esta manipulación experimental (CA), afecta negativamente el desarrollo de diversos sistemas, sin embargo poco se ha estudiado sobre sus efectos sobre el desarrollo de una de las conductas sociales más importantes para los individuos, principalmente los machos, como es la conducta de agresión, así como los posibles mecanismos afectados. Lo único que se sabe es que la CA incrementa la agresión ofensiva y materna en la hembra (Melo y cols., 2009), así como las conductas de juego-lucha (conductas que preceden a la agresividad) en machos juveniles (Ochoa, 2013). Sin embargo, se desconoce si la CA afecta el desarrollo de la agresión en machos adultos, y mucho menos se conocen los mecanismos que podrían estar siendo afectados. Así, considerando que el aislamiento temprano, a través de la CA, incrementa la impulsividad en las ratas macho (Lovic y Fleming, 2004), la agresividad en las ratas hembra y las conductas de juego-lucha en los machos juveniles, es posible que la CA incremente la agresividad en los machos adultos. Los resultados anteriores nos permiten hipotetizar que la agresividad manifestada en la rata que sufrió separación materna y CA pueda ser mediada por una deficiencia en las concentraciones de serotonina en las áreas neurales que regulan la agresión como la corteza prefrontal, el hipocampo ventral, el núcleo accumbens y el rafe dorsal. En adición, como se describió anteriormente, cuando se agregan dos crías de la misma edad dentro del recipiente de aislamiento (Grupo CA-Social), los efectos de dicho procedimiento se previenen parcialmente (Melo et al., 2009). Así, en el presente trabajo se pretende estudiar la relación entre la concentración de serotonina cerebral y la agresión en las

ratas adultas con ayuda del modelo de crianza artificial para establecer el efecto de la experiencia posnatal pre-destete sobre el desarrollo de la agresión.

## 2. Antecedentes

Los roedores sometidos a estrés crónico o aislamiento parcial durante alguna de las etapas tempranas de su desarrollo, presentan aumento del comportamiento agresivo en las siguientes etapas de su vida (González-Mariscal y Melo, 2013). Por ejemplo, las ratas juveniles aisladas en el período posterior al destete invierten más tiempo en la conducta de juego-lucha (olfateo con el hocico o mordida hacia la base del cuello de un intruso) que aquellas que fueron acompañadas durante dicho periodo por otras ratas de similar edad y tamaño (Hant *et al.*, 2011). En ratones, se ha encontrado para las líneas genéticas de baja y alta agresión que el aislamiento en el periodo posterior al destete, de manera similar al ejemplo anterior, incrementa la agresión hacia otro ratón, en comparación a su homólogo criado en grupo. Estos datos sugieren que, independientemente de la carga genética, el aislamiento temprano altera el mecanismo regulador de la agresividad (Garepy *et al.*, 1995). De la misma forma, el aislamiento de la madre y los hermanos de camada en la etapa posnatal pre-destete ha mostrado tener un efecto sobre la expresión de la conducta agresiva en etapas posteriores de ratas juveniles o adultas. Investigaciones previas desarrolladas por nuestro grupo de trabajo mostraron que machos juveniles que sufrieron separación maternal total y criados artificialmente despliegan un incremento en la frecuencia y duración la mayoría de las conductas de juego-lucha, conductas que preceden a las conductas agresivas (Ochoa, 2013), además las hembras lactantes criadas artificialmente son más agresivas en comparación a las ratas criadas por su madre o por aquellas aisladas que estuvieron en compañía de sus hermanos (grupo CA-Social). No obstante, datos indirectos del laboratorio han mostrado que los machos adultos aislados y CA también muestran mayor agresividad que los criados por la madre. Con lo anterior se sugiere un efecto duradero del aislamiento en lo referente a la modulación de las conductas agresivas.

La causa del comportamiento agresivo-impulsivo como una condición patológica se ha atribuido mayormente a la regulación de la serotonina (hipótesis del déficit de serotonina; Giacalone *et al.*, 1968). En condiciones de laboratorio (experimentos de microdiálisis), ratas macho adultas expuestas a una confrontación agresiva mostraron una disminución de la concentración de serotonina en la corteza prefrontal durante la confrontación, efecto que permaneció hasta una hora después de la misma (Van Erp y Miczek, 2000). También, se han

reportado bajos niveles de 5-HIAA (5-ácido indolacético) en líquido céfalo raquídeo en primates no humanos y en una población de marinos estadounidenses con un historial de comportamiento agresivo (Wesergaard *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1979).

Basándose en el conocimiento previo de que el aislamiento social temprano y la CA incrementa la agresividad en la rata macho puber, en el presente trabajo se empleó el modelo de CA y se evaluaron los niveles de agresividad en los machos adultos. Además con la finalidad de relacionar la agresividad presentada por las ratas aisladas con las concentraciones de serotonina se evaluaron los niveles de ésta en áreas neurales que modulan la agresividad (corteza prefrontal, rafe dorsal medial, núcleo accumbens; core y shell) después de una confrontación agresiva.

### **3. Justificación**

El presente trabajo está encaminado a estudiar las consecuencias de la experiencia temprana sobre los mecanismos que regulan la agresión impulsiva para poder comprender la causa de algunas manifestaciones patológicas del comportamiento agresivo utilizando un modelo animal . Aunque se conoce la influencia de la experiencia temprana en el comportamiento, el mecanismo afectado por dicha condición no está del todo esclarecido. Lo anterior nos ha llevado a buscar la relación entre la neurobiología reguladora de ese comportamiento y la alteración producto de la experiencia. Así, se obtendrá información sobre las causas y mecanismos involucrados, específicamente se evaluó si el sistema serotoninérgico podría ser afectado por la privación de los estímulos sensoriales y/o sociales proveniente de la madre y de los hermanos de camada, y si esta afección podría verse reflejada en un incremento en la agresión de los machos.

Lo anterior es de suma importancia ya que los datos obtenidos permitirán sugerir y dar atención a situaciones específicas del ámbito humano, especialistas encargados de solucionar las acciones humanas violentas tanto de carácter patológico e individual como de alcances sociales pueden verse apoyadas por nuestro estudio para plantear y considerar nuevas soluciones.

#### **4. Hipótesis**

El incremento de la agresión de los machos adultos que fueron aislados durante el periodo posnatal pre-destete se relaciona con la reducción de los contenidos de serotonina en áreas neurales específicas.

#### **5. Objetivo general**

Estudiar la relación entre la concentración de serotonina cerebral (homogenados) y la agresión en un modelo de crianza artificial (con y sin estímulo social) con ratas adultas para establecer el efecto de la experiencia posnatal pre-destete sobre el desarrollo de la agresión.

##### **5.1. Objetivos particulares**

- Determinar las concentraciones de los contenidos de serotonina de homogenados de corteza prefrontal media, el rafe dorsal y medial, así como del núcleo acumbens en la rata macho adulta aislada (CA-Aislado) y criada pos su madre (CM).
- Determinar después de un encuentro agresivo los niveles de serotonina en la corteza prefrontal media, el rafe dorsal y medial, y el núcleo acumbens en la rata macho adulta Aislada (CA-Aislado) y CM.
- Establecer si el estímulo social (inclusión de dos compañeros de camada dentro del recipiente de aislamiento; CA-Social) previene los efectos de la crianza artificial sobre el comportamiento agresivo y los niveles de serotonina en la rata macho.

## 6. Metodología

### 6.1. Sujetos

Se utilizaron 34 ratas macho de la cepa Wistar de 3-4 meses de edad. Fueron criadas en el bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CINVESTAV-Laboratorio Tlaxcala-UAT) con ubicación en la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala en el municipio de Ixtacuixtla en Tlaxcala. Se alojaron en cajas de acrílico (44 cm de largo x 28 cm de ancho y 19.5 cm de altura) bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h, el ciclo se iniciaba al apagarse la luz a las 15:00 h, a una temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Los sujetos se mantuvieron con alimento balanceado para roedores (Ratina, Purina) y agua *ad libitum*. Además, se utilizaron adicionalmente dos grupos de hembras lactantes donadoras para proveer de crías: a) como compañeros de las crías aisladas del grupo CA-Social, y b) para ser utilizadas en la etapa adulta como los animales intrusos durante las pruebas Residente-Intruso.

### 6.2. Procedimiento General

El día del parto (día 0) cada camada se ajustó a ocho crías: cinco machos y tres hembras. Cuatro días después se retiraron cuatro machos de cada nido, uno de ellos se marcó en el dorso con un plumón de tinta permanente y se regresó inmediatamente para ser criado por su madre (grupo control, CM-Control). A los tres machos restantes se les implantó un catéter PE-10 en la mejilla, a uno de estos tres se le retiró inmediatamente el catéter y se le regresó con su madre para ser criado por ella (grupo CM-Ciego). Los otros dos machos fueron colocados dentro de un sistema de crianza artificial (CA, ver *crianza artificial*; González *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2006, 2009), con (CA-Social) o sin (CA-Aislado) dos crías de la misma edad dentro del recipiente de aislamiento y fueron alimentados con fórmula láctea (leche preparada). La leche se administró a través del catéter hasta el día 22 postnatal (dpn), a partir del dpn 18, se colocó dentro de los recipientes de aislamiento una mezcla de alimento pulverizado y fórmula dentro de pequeños recipientes para favorecer la transición de líquidos a sólidos, a partir del dpn 20 se incluyeron además de la mezcla antes referida pedazos pequeños de alimento. De esta manera, se formaron los siguientes grupos experimentales: 1) CA-Aislado, estas crías recibieron estimulación en la región anogenital dos veces al día para inducir la micción y defecación; 2) CA-Social, recibieron igual número de estimulaciones anogenitales que el grupo anterior y fueron acompañados dentro del recipiente por dos crías de la misma edad, sus compañeros (as) fueron reemplazados cada 12 horas por otros recién alimentadas provenientes de madres nodrizas; 3) CM-

Ciego, fueron criadas dentro de la camada por su madre y 4) CM-Control, también fueron criados por su madre.

Al finalizar los 22 dpn, las crías se retiraron del sistema de CA y se colocaron en cajas de acrílico (34 cm de largo x 23 cm de ancho y 15 cm de alto) con uno o dos machos de la misma edad para ser sus acompañantes y permanecieron dentro del bioterio hasta alcanzar la edad adulta. A la edad de 3-4 meses se tomaron 10 machos de cada condición experimental (CA-Aislado, CA-Social, o CM-Control/Ciego) y se sacrificaron por decapitación para obtener las muestras en fresco de sus cerebros. Inmediatamente después, se realizaron los cortes cerebrales correspondientes y de ellos se extrajo la corteza prefrontal, el núcleo accumbens y la porción medial y dorsal del rafe con ayuda del Atlas de Cerebro para la rata adulta de Paxinos (1997). Las muestras obtenidas se utilizaron para cuantificar las concentraciones de serotonina en homogenados de tejido cerebral (Rosales *et al.*, 1997) por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica (Grupo Basal).

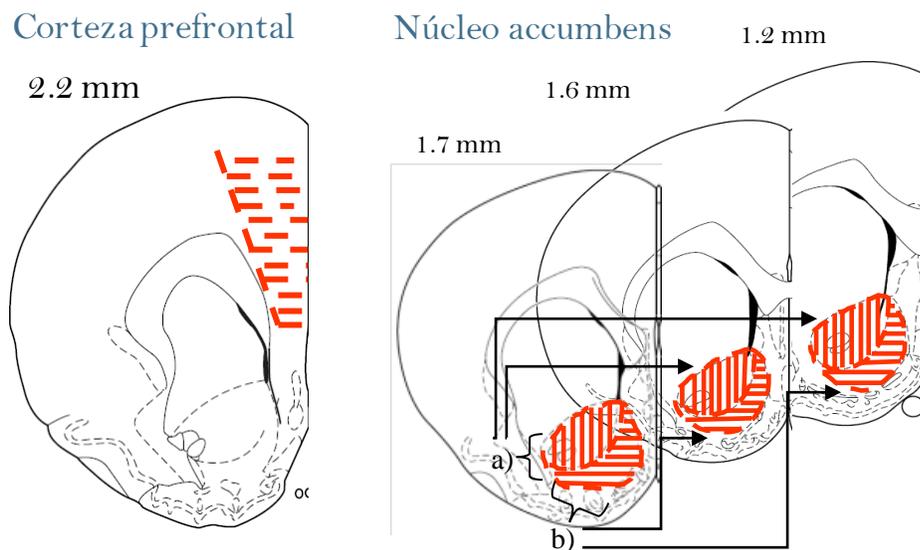


Figura 3. Esquemas de las áreas disecadas. En rojo se muestra la corteza prefrontal media y el núcleo accumbens: a) core y b) Shell.

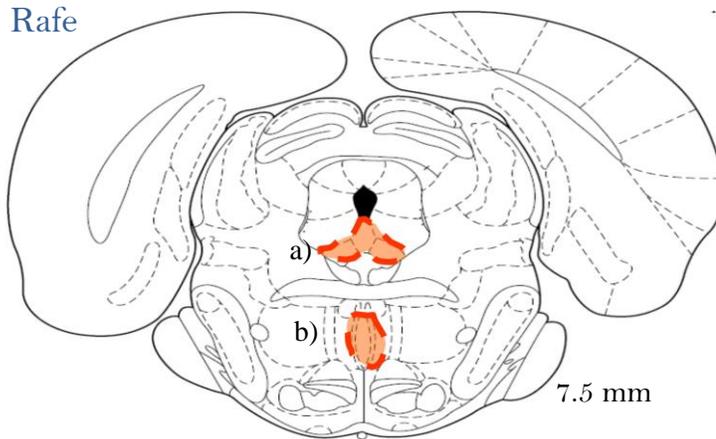


Figura 4. Esquemas de las zonas disecadas, a) la parte dorsal y b) la parte medial.

En un segundo experimento, machos de cada condición experimental se separaron individualmente en cajas transparentes (para poder visualizar bien las conductas), 24 hrs después fueron expuestas o no a una prueba de Residente-Intruso durante 10 minutos. Inmediatamente después del término de la prueba, se sacrificó a los machos y se obtuvieron las muestras en fresco de los cerebros de las áreas correspondientes (las mismas mencionadas para el grupo basal). Todas las pruebas conductuales se video grabaron para posteriormente reproducirlas y registrar cada una de las conductas agresivas con el programa de cómputo titulado “The Observer” (para detalles ver sección: Registro de Residente-Intruso). Todos los machos compañeros de los experimentales e intrusos en la prueba fueron criados por madres donadoras en el bioterio, por lo tanto no tenían parentesco con las ratas experimentales.

### 6.3. Implante de catéter

Crías de 4 dpn fueron, una vez pesadas, anestesiadas con metoxifluorano (Metofane, CDMV, Inc) y sometidas a una cirugía con el propósito de implantarles un catéter de polietileno (PE-10; Clay Adams) de aproximadamente diez cm de longitud en la mejilla (Blake y cols., 1988). Antes de comenzar el procedimiento quirúrgico, un extremo del catéter fue previamente expuesto al calor para redondearlo, entonces en ese sitio se coloca una pieza circular de plástico (rondana) para servir de anclaje en la pared interna de la mejilla de la cría (Fig. 1 a). Posteriormente, se coloca dentro del catéter un cable guía de acero inoxidable de 0.24 cm. de diámetro y 7.2 cm. de longitud, un tubo de silastic cubre un extremo del cable guía para evitar lastimar la boca de la cría (figura 1 b). Poco antes de implantar el catéter se humedece con

aceite el extremo donde se encuentra el tubo de silastic para asegurar un deslizamiento adecuado a través de la mejilla de la cría. El cuerpo de la cría es sostenido con la mano izquierda, la cabeza es tomada entre los dedos pulgar e índice, con la otra mano se introduce dentro del hocico de la cría la cánula guía por el extremo cubierto con el silastic, se empuja a través de la mejilla, una vez que el extremo del catéter se observa en la parte externa de la mejilla, se jala gentilmente hasta tocar con la rondana la pared interna de la mejilla. Posteriormente se retira el tubo de silastic y el cable guía, se aplica una crema antibacterial (Terramicina) en la pared externa del cachete, se coloca otra rondana por afuera y en seguida un pedazo corto de catéter PE-50 en el catéter PE-10 para fijarlo a la pared bucal y evitar su salida de la boca.

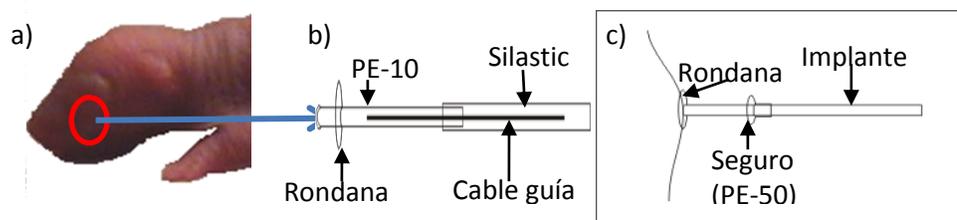


Figura 5. Se muestra, a) el área aproximada donde se coloca el catéter en la mejilla de la cría, b) el cable guía, el catéter y el tubo silastic listos para el implante, c) un esquema del implante.

#### 6.4. Crianza artificial

Una habitación con condiciones de temperatura y humedad adecuadas se preparó para alojar el *sistema de crianza artificial* (24-26° C con humedad al 40-48%). Las crías fueron alojadas en botes de plástico (11 mm. de diámetro x 20 mm. de profundidad) con el piso previamente cubierto de aserrín estéril. El bote o recipiente se colocó dentro de un segundo recipiente en flotación dentro de un acuario con agua a una temperatura de 39°C +/- 1, de esta forma la temperatura al interior del recipiente osciló entre los 34-36°C. Conforme las crías fueron creciendo, la temperatura del agua se redujo de manera gradual hasta los 31-32°C al final del periodo, cuando las crías ya tienen pelo.

El catéter implantado en la mejilla de las crías se conectó a un catéter de mayor calibre PE-50 y este a su vez se conectó a una jeringa de 10 ml llena con una fórmula láctea especial para las crías (fórmula tomada de la Universidad de Iowa; Messer *et al.*, 1969). Las jeringas

alimentaban a las crías durante 10 min de cada hora las 24 hrs del día por medio de una bomba de infusión programable (Harvard Mod. PH2000). La velocidad de infusión se ajustó cada día de acuerdo al peso corporal promedio de las crías conectadas a la bomba (Gonzalez *et al.*, 2001). El procedimiento consistió en un primer paso en conocer la cantidad correspondiente al 33% del peso corporal promedio, es decir, el peso promedio de las crías se multiplica por 0.33, el resultado (corresponde a la cantidad total de leche que consumirán por 24 horas) se divide entre 240 (número total de minutos de infusión por día) y este último resultado correspondió a la velocidad de infusión. En los siguientes días, la velocidad se ajustó de acuerdo al peso promedio de todas las crías, se aumenta un 1% cada día hasta un máximo del 45% del peso promedio.

Cada mañana las crías se desconectaron, pesaron y estimularon anogenitalmente con un pincel húmedo para permitirles orinar y defecar. Los catéteres PE-50 y las jeringas se limpiaron con agua caliente por dos días seguidos para ser llenadas nuevamente con la fórmula láctea. Cada cuarto día las jeringas se reemplazaban por otras nuevas. Al final, las crías se volvieron a conectar y se recalculó su dosis de infusión para ser programada en la bomba.

### **6.5. Fórmula láctea**

La fórmula láctea estuvo compuesta de los siguientes ingredientes: ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, KCl, MgCl, leche evaporada Carnation, agua estéril, proteína de soya, aceite de maíz, metionina, triptófano, vitamina Mix, fosfato de calcio tribásico y ácido deoxycólico (Dieta Messer; Messer *et al.*, 1969). Todos los reactivos provienen de Sigma-Aldrich, Co., excepto la vitamina Mix y la proteína de soya (JT Baker Inc.). La preparación consistió en la mezcla de los ingredientes y una fase posterior de pasteurización (1 ½ hrs en baño maría seguido de refrigeración a 4°C).

### **6.6. Homogenados de tejido cerebral para la determinación de los contenidos de serotonina**

Después de extraer los cerebros de las ratas se realizaron cortes coronales de 300 µm. En seguida, se disecaron, con ayuda de un sacabocados, las rebanadas el core y shell del núcleo acumbens, la corteza prefrontal, la porción dorsal y media del rafe y la amígdala. El tejido

disecado se homogenizó en 200 µl de ácido perclórico al 0.1 N. A continuación, el homogenado se centrifugó a 10 psi (pounds per square inch/libra-fuerza por pulgada cuadrada) por un minuto a 100 000 rpm en una centrifuga de la marca Beckman (Airfuge, airdriven ultracentrifuge) para separar la pastilla proteínica de la fase líquida. La fase líquida se filtró con membranas de nylon de un diámetro de poro de 0.2 µm, al término del proceso, se protegió de la luz y el calor en un refrigerador convencional (1-5° C). Finalmente, el producto del filtrado (muestra líquida) se inyectó en un sistema de HPLC de fase reversa con detección electroquímica (Antec Leyden) para la cuantificación de la serotonina y su metabolito.

EL HPLC estaba equipado de un electrodo de carbono vidriado (VT-03, a un potencial de 395 mV, 30°C) acoplado a una bomba isocrática (Waters, a flujo de 0.35 ml/min). La separación se realizó con una columna Atlantis dC18 (Waters, 50 x 2.1 mm y patícula de 3 µm) conectada a un asa con volumen de 20 µl. La fase móvil estuvo constituida de (en mM) de ácido monocloro acético 95, octanosulfato de Na 0.9, acetato etilendiaminotetra disódico 0.65 y acetonitrilo al 4.5 % con el PH ajustado a 3.2 (gracias a la adición de hidróxido de Na [NaOH]).

Por otro lado, cada una de las pastillas proteínicas se re-suspendieron en 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH) al 1 N. Se tomó de cada re-suspensión una alícuota de 2 µl, ésta se completo con la adición de 798 µl de agua ionizada y 200 µl de solución de Bradford, para cuantificar en el espectrofotómetro su absorbancia. Para conocer la cantidad de proteína en la alícuota de cada muestra, se realizó una curva de estándares de una concentración conocida de albumina (1 mg/ ml). Los estándares se formaron de alícuotas de 0 (blanco), 2.5, 5.0, 7.5 y 10 µl. A partir de las absorbancias obtenidas de ellos se pudo modelar la ecuación de la recta y por extrapolación (modelo de regresión lineal simple) se determinaron las cantidades proteínicas desconocidas de las muestras. Los resultados se expresaron como una relación entre de la cantidad de serotonina detectada (ng) y el contenido de la proteína de la muestra (mg) (Rosales et al., 1997).

### **6.7. Tejido disecado**

Las áreas cerebrales elegidas para ser disecadas fueron las siguientes.

La corteza prefrontal: Se utilizó como mínimo una rebanada y como máximo dos rebanadas de

300  $\mu\text{m}$ . Se disecó bilateralmente el tejido con un bisturí.

El core del Núcleo Acumbens. Se utilizó al menos una rebanada sin exceder las dos. Se disecó bilateralmente con un sacabocados el tejido.

El shell del Núcleo Acumbens. Se obtuvieron de al menos de dos rebanas la muestra (en algunas ocasiones hasta de 4). Se disecó bilateralmente el tejido con un bisturí.

La parte medial y dorsal del Rafe. La muestra se obtuvo de al menos de dos rebanadas (en ocasiones se pudo hacer de 3-4). Se disecaron ambas porciones en la misma muestra.

La amígdala. La muestra se obtuvo de dos rebanadas. Se disecó bilateralmente.

### **6.8. Prueba residente-intruso**

La prueba consiste en exponer a un macho a un encuentro agresivo con otro macho. El macho experimental (residente) fue alojado individualmente durante 24 h antes de la prueba en una caja de acrílico transparente de 28x44x19.5 cm con la base cubierta de aserrín. El día de la prueba, en la fase de oscuridad, se introdujo en la caja del macho residente un macho extraño (intruso) de similar peso e igual edad en la esquina opuesta a la ubicación del residente. El despliegue conductual de las ratas se filmó bajo luz roja durante 10 min con una videocámara en su función de visión nocturna. Al término de los 10 minutos se retiró al macho intruso. Finalmente se esperó por 10 min para proceder a la decapitación del residente e inmediatamente se disecó del tejido.

Las filmaciones se revisaron y visualizaron con un sistema de televisión y reproductor de video. Los diferentes componentes de la conducta agresiva visualizados se registraron con ayuda del programa de "*The observer*" versión 5.0 (Noldus Technology), este se encontraba instalado en dos computadoras portátiles. La configuración del programa consistió en asignar una letra del alfabeto latino a cada una de los componentes de la conducta agresiva para lograr tener un código práctico y eficiente en el registro. Debido a la rápida acción realizada por la rata de los componentes conductuales se reprodujo el video a media velocidad con el propósito de registrar adecuadamente (González et al., 2001; Melo et al., 2006, 2009).

Se registró la latencia, la frecuencia y la duración de las conductas agresivas que a continuación se establecen. Para el macho residente fueron postura de ataque, ataque, lucha y

boxeo. La postura de sumisión completa e incompleta y el ataque se le registró al intruso. Para las mordidas y patadas, solo se registró la frecuencia y latencia, en el caso del residente ambas, en el caso del intruso solo las mordidas. Además se registraron conductas de ingesta, acicalamiento, erguido, olfateo aire, monta y exploración de cabeza, cuerpo y anogenital para mostrar el interés, estrés y sociabilidad del residente hacia el intruso. Para medir el estrés o miedo del intruso, se le registró la inmovilidad y la excavación.

## **6.9. Caracterización de las conductas**

### **6.9.1. Conductas agresivas**

Ataque: Embestida rápida dirigida al cuello o región dorsal del otro macho, generalmente termina en lucha. Lanzamiento hacia el cuello o región dorsal.

Lucha: Ambas ratas se enfrentan con movimientos violentos que las hacen doblar, girar y confrontar. La rata empuja al contrincante mientras lo embiste y aplica fuerza contra él. Ambos sujetos dan vueltas sobre el piso.

Mordida: Contacto de los dientes del macho con cualquier parte del cuerpo del compañero, incluye el cuello y la cabeza. Muerde al otro sujeto en la cabeza, cuello o cualquier parte del cuerpo.

Patadas: El macho golpea al otro macho con las patas traseras.

Boxeo: Ambas ratas se enfrentan paradas sobre sus patas traseras, mientras se golpean con las patas delanteras al mismo tiempo. Enfrentamiento parándose sobre las patas traseras y golpeando con las delanteras.

Postura de ataque: El macho permanece inmóvil con actitud amenazante frente al otro macho antes de realizar un ataque.

Monta: Monta o intenta montar.

### **6.9.2. Conductas de sumisión**

Postura de sumisión completa: El macho se inmoviliza, mientras permanece con su espalda apoyada sobre el piso de la caja y exponiendo su región ventral al residente. Permanece con la espalda sobre el piso de la caja exponiendo el vientre.

Postura de sumisión incompleta: El macho se sienta sobre sus patas traseras con la espalda

curva y sus patas frontales levantadas hacia el macho residente. Se sienta sobre sus patas con el lomo curvo y las patas delanteras levantadas hacia el macho.

### **6.9.3. Conductas de estrés**

Inmovilidad: La rata permanece sin movimiento dentro de la caja. Inmóvil con la cabeza hacia abajo y con exhalaciones exageradas y sin vibrizas durante al menos 20 s.

Acicalamiento: La rata limpia su cuerpo o lo genitales con el hocico y las patas delanteras. También puede rascarse con las patas traseras.

### **6.9.4. Conductas sociales**

Olfateo de cabeza: Con el hocico y/o nariz, la rata inspecciona el cuello y la cabeza del compañero.

Olfateo de cuerpo: Con el hocico y/o nariz, la rata inspecciona cualquier parte del cuerpo del compañero excepto el cuello y la cabeza.

Olfateo anogenital: Exploración anogenital.

### **6.9.5. Conductas de exploración y mantenimiento**

Ingesta: La rata se acerca a beber o comer.

Erguido: La rata se alza sobre las patas traseras para captar el aroma fuera de la caja. Explora el aire parado sobre las patas traseras.

Olfateo aire: La rata permanece en un sitio moviendo la nariz para percibir los aromas dentro de la caja. Explora el aire.

A todas las conductas se les midió frecuencia y latencia. La duración no se midió para las mordidas y patadas por estar configuradas en el programa como eventos y no como estados, pero el resto de las conductas estuvieron en la posibilidad de registrarles la duración.

## **6.10. Análisis estadístico**

La significancia de las diferencias en las concentraciones de serotonina se determinó con un ANOVA de dos entradas, el factor 1 fue la región cerebral y el factor 2 fue el tipo de crianza, en la prueba pos hoc se utilizó el test de Bonferroni cuando era apropiado. Los datos obtenidos

de las pruebas conductuales se analizaron estadísticamente con una prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de un grupo y con una prueba de Mann-Whitney (comparaciones planeadas) para comparar dos grupos entre sí (aquellos con una diferencia significativa,  $p < 0.05$ ), además de una prueba *post hoc* de Tukey, en:

Frecuencia: Número de veces de ocurrencia de una conducta,

Duración: Tiempo total de expresión de una conducta.

Latencia: Intervalo de tiempo para darse la acción conductual.

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa *SPSS versión 11.0* (para conductas) y *Graphpad Prism* (para contenidos de serotonina). Las gráficas de las conductas se hicieron con el programa *SigmaPlot 2001* y *Graphpad Prism*. Se utilizó un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

## **7. Resultados**

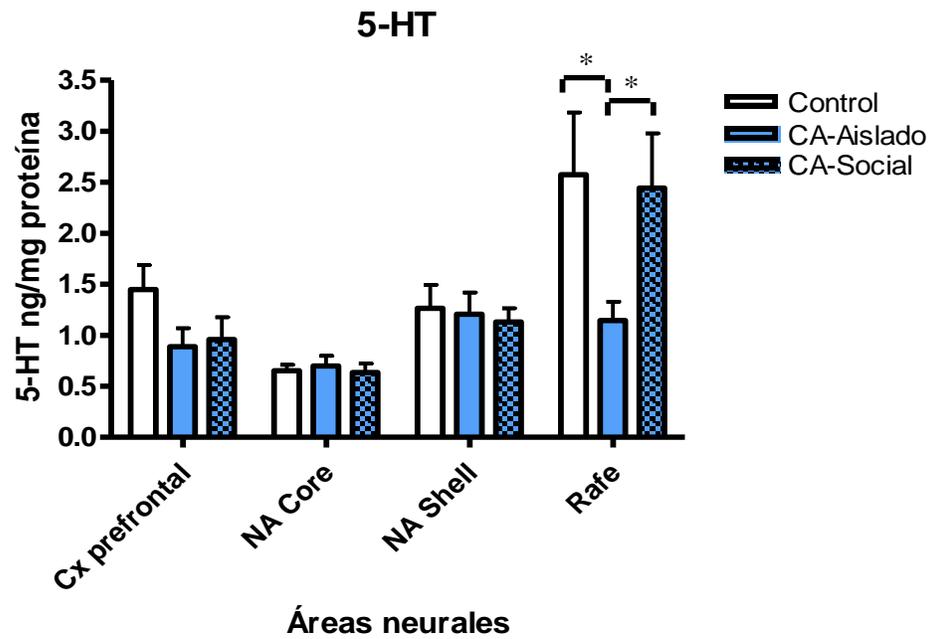
Debido a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Ciego y CM-Control, se decidió conjuntarlos en un mismo grupo (Control).

### **7.1.Experimento 1:**

#### **7.1.1. Contenido basal de serotonina cerebral**

Se observó que los niveles de serotonina fueron significativamente menores en el Rafe dorsal y medial de las ratas CA-Aisladas, en comparación con los de las ratas Control y CA-Social ( $F_{(3,94)}=2.877$ ,  $p<0.05$ ) (figura 5a). En el caso del metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), se encontró una disminución significativa en la corteza prefrontal media ( $F_{(3,91)}=2.740$ ,  $p<0.05$ ) de las ratas CA-Aisladas y CA-Social en comparación a las ratas Control (figura 5b).

a)



b)

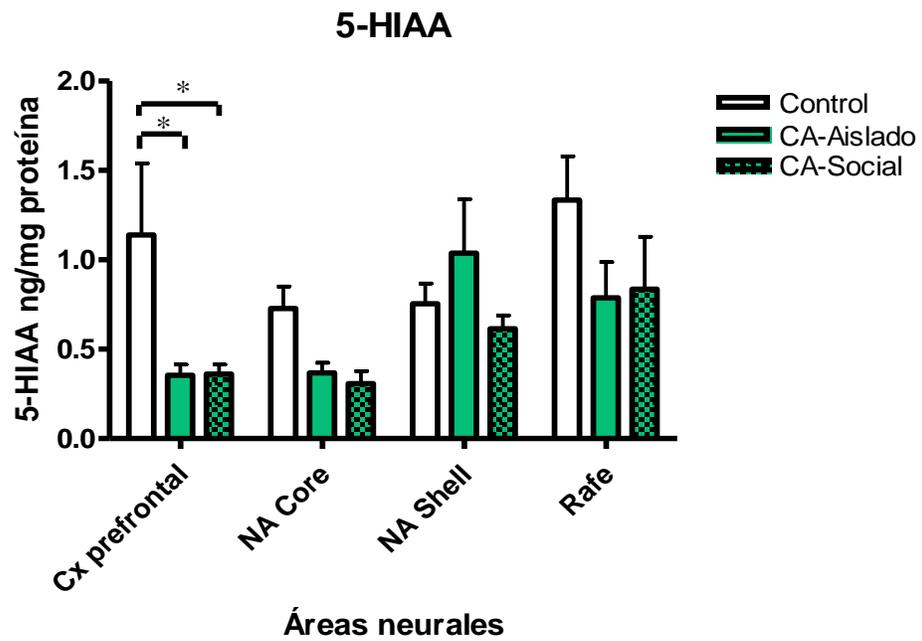


Figura 5. Contenido basal de serotonina (a) y su metabolito 5-HIAA (b) en la corteza prefrontal media (Cx prefrontal), el Núcleo acumbens (NA) Core y Shell y el Rafe dorsal y medial en las ratas CA-Aisladas, CA-Social y Control. \*  $p < 0.05$  post hoc Bonferroni.

## **7.2.Experimento 2:**

### **7.2.1. Contenido de serotonina cerebral post-prueba**

#### **Residente-Intruso**

En esta parte del proyecto, se determinaron los contenidos de serotonina en ratas CA-Aisladas, CA-Sociales y Control después de haber sido sometidas a una prueba de residente-intruso en las áreas cerebrales de la corteza prefrontal, del núcleo acumbens; core y Shell, y en el rafe dorsal y medial. Como se puede observar en la figura 5a, el contenido de serotonina en la corteza prefrontal media de las ratas CA-Aislada y CA-Social fue significativamente menor que la determinada en las ratas Control ( $F(3,76)=2.956$ ,  $p<0.05$ ). En adición, se observaron contenidos significativamente menores en el Rafe dorsal y medial en el grupo CA-Social en comparación con los encontrados en el grupo Control y Ca-Aislado ( $F(3,76)=2.720$ ,  $p<0.05$  para ambas comparaciones) (figura 6a). Para el caso del contenido de 5-HIAA, se encontraron concentraciones significativamente mayores en el Núcleo Acumbens Shell de las ratas CA-Aisladas respecto de las Controles ( $F(3,75)=3.222$ ,  $p<0.01$ ). Por su parte, las concentraciones del metabolito en el Rafé dorsal y medial en las ratas CA-Sociales fueron significativamente menores que en el grupo Control ( $F(3,75)=2.647$ , Bonferroni  $p<0.05$ ) (Figura 6b).

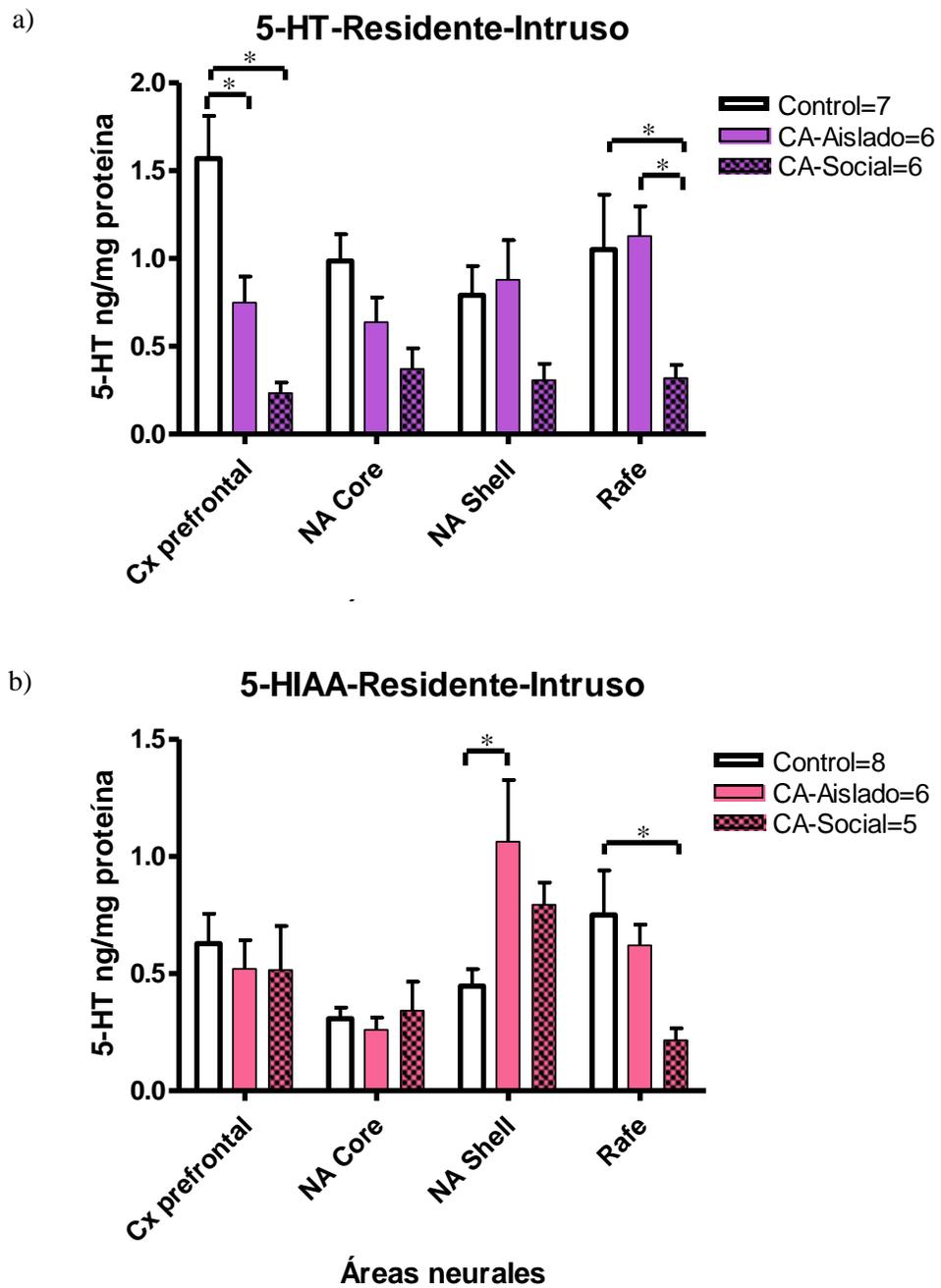


Figura 6. Contenido de serotonina (a) y 5-HIAA (b) en la corteza prefrontal media (Cx prefrontal), el Núcleo acumbens (NA); Core y Shell, y el Rafe dorsal y medio en las ratas CA-Aislada, CA-Social y Control después de la prueba Residente-Intruso. \*  $p < 0.05$  post hoc Bonferroni.

### 7.2.2. Conductas agresivas

Debido a que los datos anteriores de serotonina y su metabolito, fueron determinados después del encuentro agonista (prueba Residente-Intruso), se decidió presentar los datos conductuales de dicho encuentro en esta parte de la tesis. Así, cuando se comparó la conducta de lucha, patadas y sometimiento del intruso (postura de sumisión) entre los tres grupos experimentales, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas para la frecuencia y la duración de la lucha ( $U=34.5$ ,  $p<0.01$ ;  $U=7.6$ ,  $p<0.01$ , respectivamente), en la frecuencia de las patadas ( $U=39.5$ ,  $p<0.01$ ;  $U=15.0$ ,  $p<0.05$ ) y en la latencia para someter al intruso ( $U=31.0$ ,  $p=0.01$ )

Al comparar dos grupos independientes se encontró que las ratas CA-Aisladas presentaron mayor frecuencia y duración de la lucha respecto de las Control ( $H=7.938$ ,  $p<0.05$ ;  $H=7.613$ ,  $p<0.05$ , respectivamente; figura 8). Además, los sujetos del grupo CA-Aislados patearon significativamente más veces al Intruso que las ratas Control y CA-Social ( $H=10.304$ ,  $p<0.01$ ) (figura 9) y sometieron más rápido al intruso que las C ( $H=8.017$ ,  $p<0.05$ ) (figura 10).

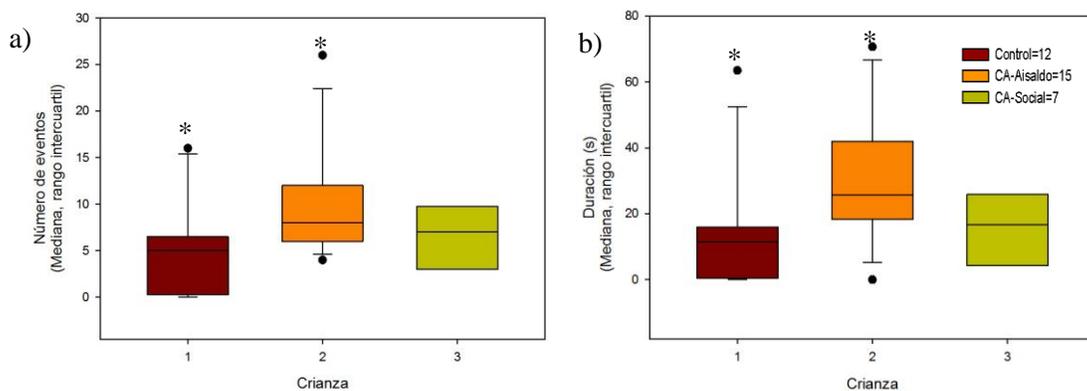


Figura 7. Se muestran la frecuencia (a) y duración (b) de lucha para las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. Como se puede observar en ambas figuras, la frecuencia y duración de la lucha en las ratas CA-Aisladas es significativamente mayor respecto de las ratas Control. En contraste, los parámetros conductuales de las ratas CA-Sociales fueron similares a los de las ratas Control. \*  $p>0.05$  post hoc Tukey.

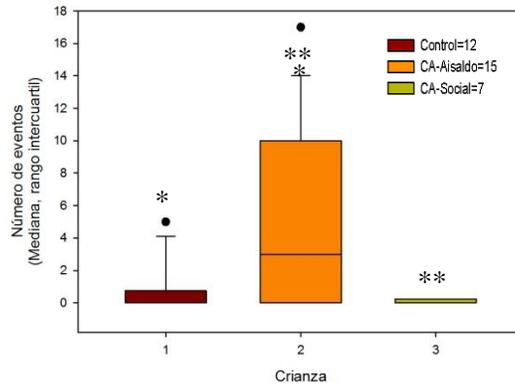


Figura 8. Se muestra la frecuencia de las patadas para las ratas C, CA-Aislada, CA-Social. Las ratas Ca-Aisladas mostraron mayor cantidad de patadas a los machos intrusos que las ratas Control y CA-Sociales. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

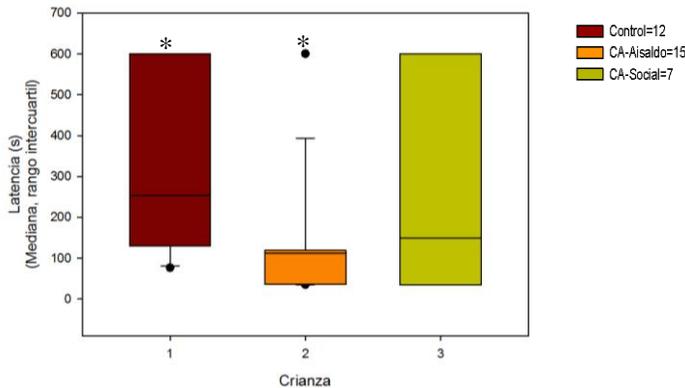


Figura 9. Se muestra la latencia de sometimiento al intruso por parte de las ratas Control, CA-Aislada y CA-Social. La figura muestra que las ratas CA-Aisladas sometiendo más rápido al intruso que los demás grupos. \*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

Cuando se comparó la conducta de exploración de cabeza y cuerpo, el olfateo aire, el acicalamiento y la posición de erguido entre los tres grupos experimentales, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas para la frecuencia y la duración de la exploración de cabeza ( $U=45.0$ ,  $p < 0.05$ ;  $U=46.0$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente), en la frecuencia de la exploración del cuerpo ( $U=45.5$ ,  $p < 0.05$ ), en la frecuencia del acicalamiento ( $U=30.5$ ,  $p < 0.01$ ), en la frecuencia al olfatear el aire ( $U=43.0$ ,  $p < 0.05$ ) y en la frecuencia al colocarse erguida ( $U=2.0$ ,  $p < 0.01$ ).

En el caso de las conductas de interacción social no agresivas, al comparar dichas conductas entre los tres grupos se encontraron diferencias significativas en la exploración de

cabeza y cuerpo, el olfateo aire, el acicalamiento y la postura de erguido ( $p < 0.05$ ). Las pruebas post hoc mostraron que las ratas CA-Aisladas exploran menos veces y por menos tiempo la cabeza de los Intrusos que las ratas Control y CA-Social ( $H = 8.8498$ ,  $p < 0.05$ ;  $H = 8.058$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente; figura 10). De igual forma, las ratas del grupo CA-Aisladas exploran significativamente menos tiempo el cuerpo (figura 11) que las Control y las CA-Social, ( $H = 9.456$ ,  $p < 0.01$ ) y se acicalan menos que las Control ( $H = 10.492$ ,  $p < 0.01$ ; figura 13). También, las ratas CA-Aislada tardan más en olfatear el aire al explorar en comparación a las Control y CA-Social ( $H = 9.822$ ,  $p < 0.01$ ) y lo hacen poco respecto de las CA-Social ( $H = 8.397$ ,  $p < 0.05$ ) (figura 12). Además, las CA-Social tardan menos en ponerse erguidas para explorar los olores fuera de la caja respecto a las Control y CA-Aisladas ( $H = 14.266$ ,  $p < 0.01$ ) (figura 14).

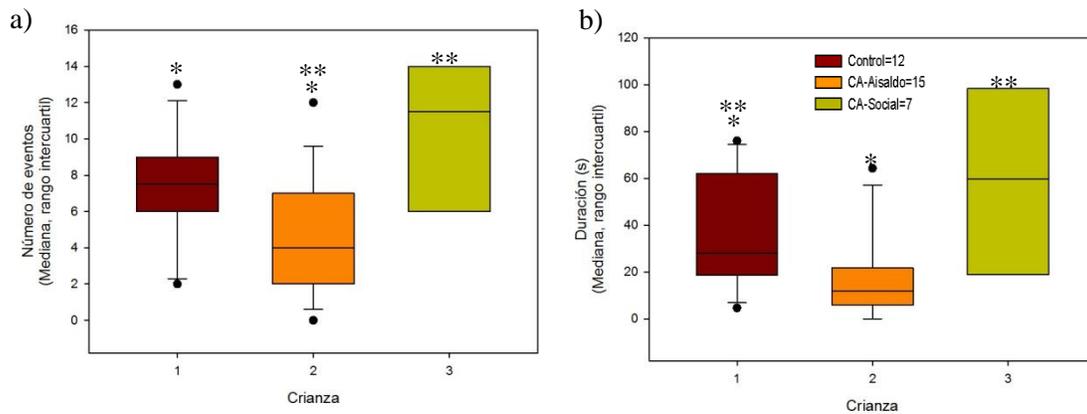


Figura 10. Se muestran la frecuencia (a) y duración (b) de la exploración de cabeza para las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. Los machos CA-Aislados muestran la menor cantidad y duración de exploración de cabeza del Intruso que las ratas Control. Sin embargo, los machos CA-Sociales exploran más veces la cabeza del Intruso que los machos CA-Aislados, y más tiempo que los machos Control. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

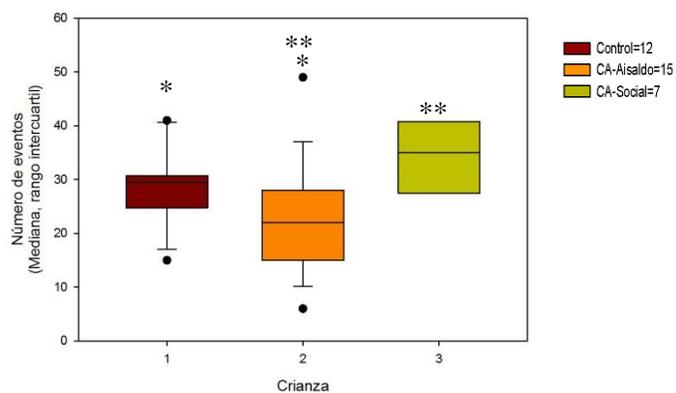


Figura 11. Se muestra la frecuencia de la exploración de cuerpo para las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. Los machos CA-Aislados exploran más veces el cuerpo del Intruso que los machos Control y CA-Sociales. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

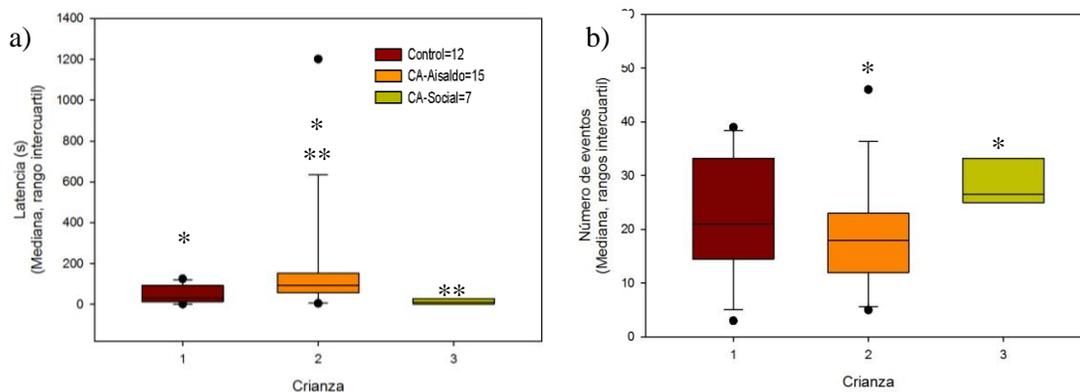


Figura 12. Se muestran la latencia (a) y frecuencia (b) del olfateo aire para las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. La latencia para iniciar el olfateo del intruso fue mayor en los machos CA-Aislados que la de los demás grupos (a). Además, el número de veces que olfatearon en ambiente fue mayor en los machos CA-Sociales que los machos CA-Aislados. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

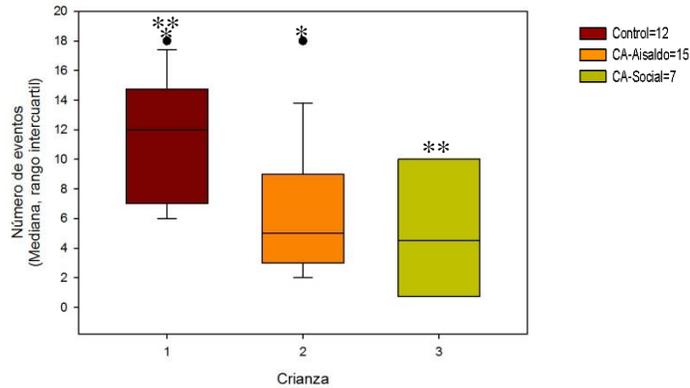


Figura 13. Se muestran la frecuencia de acicalamiento de las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social para acicalarse. Los machos Control se acicalaron más veces que los demás grupos. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

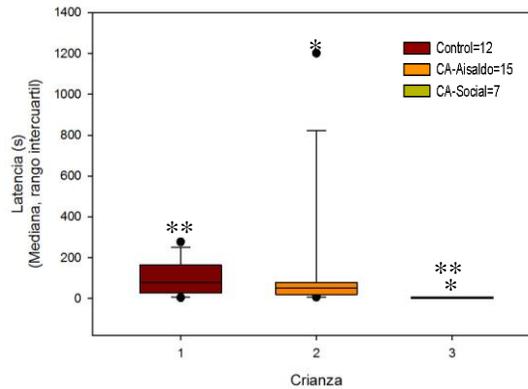


Figura 14. Se muestran la latencia para iniciar la postura de erguido de las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. Los machos Control iniciaron más rápido dicha postura que los machos CA-Social, y los machos CA-Aislados más rápido que los CA-Sociales. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

Cuando se comparó la frecuencia de las mordidas y la duración de los ataques de los machos Intrusos hacia los Residentes, entre los tres grupos experimentales, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas para la frecuencia de las mordidas ( $U=15.5$ ,  $p < 0.01$ ) y la duración de los ataques ( $U=34.5$ ,  $p < 0.01$ ), donde los intrusos mordieron más veces a las ratas CA-Aisladas que a las CA-Sociales y Control (H=6.817,  $p < 0.05$ , ambas comparaciones; figura 15). Además, los intrusos utilizaron más tiempo atacando a los machos CA-Aislados que a los Control (H=9.549,  $p < 0.01$ ) (figura 16).

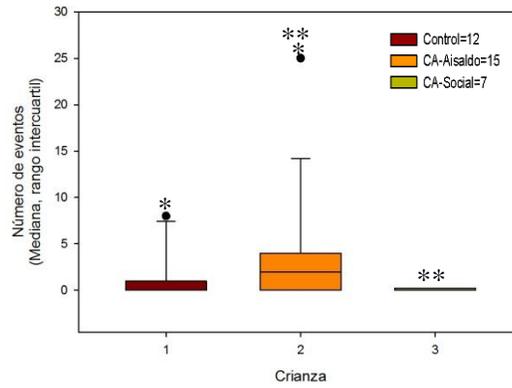


Figura 15. Se muestran la frecuencia de las mordidas de los intrusos hacia las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

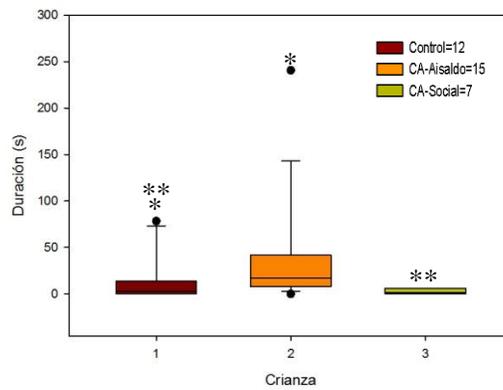


Figura 16. Se muestran la duración de los ataques de los intrusos hacia las ratas Control, CA-Aislada, CA-Social. \*, \*\*  $p > 0.05$  post hoc Tukey.

### **7.3.Experimento 3:**

#### **7.3.1. Contenido de serotonina 24 hrs post-privación social**

Los contenidos de serotonina en las áreas neurales que a continuación se presentan pertenecen a las ratas CA-Aisladas, CA-Sociales y Control que fueron sometidas a 24 h de aislamiento dentro de la caja previas a la prueba de residente-intruso, pero sin haber sido expuestas a las pruebas de Residente-Intruso. Se observó una disminución significativa en el contenido de serotonina en el Rafe dorsal/medial de los machos CA-Aislados respecto de los machos Control ( $F_{(3,74)}=3.415$ ,  $p<0.01$ ), y CA-Social ( $F_{(3,74)}=3.405$ ,  $p<0.01$ ). Además, en la corteza prefrontal y el núcleo acumbens hubo una disminución significativa de serotonina en los machos CA-Aislados, respecto de los machos CA-Social ( $F_{(3,74)}=3.859$ ,  $F_{(3,74)}=5.958$ ,  $p<0.01$ ) (figura 17a). Se observó un incremento estadísticamente significativo del contenido de serotonina en el núcleo acumbens shell ( $F_{(3,74)}=3.497$ ,  $p<0.01$ ) (figura 16a). Para el caso de las concentraciones de 5-HIAA, se encontraron niveles altos en el núcleo acumbens Shell y Rafe dorsal y medial de las ratas CA-Social respecto de las Control ( $F_{(3,61)}=3.280$ ,  $F_{(3,61)}=5.169$ , respectivamente  $p<0.01$ ) y a las CA-Aisladas ( $F_{(3,61)}=3.762$ ,  $F_{(3,61)}=5.136$ ,  $p<0.01$ ) (Figura 17b).

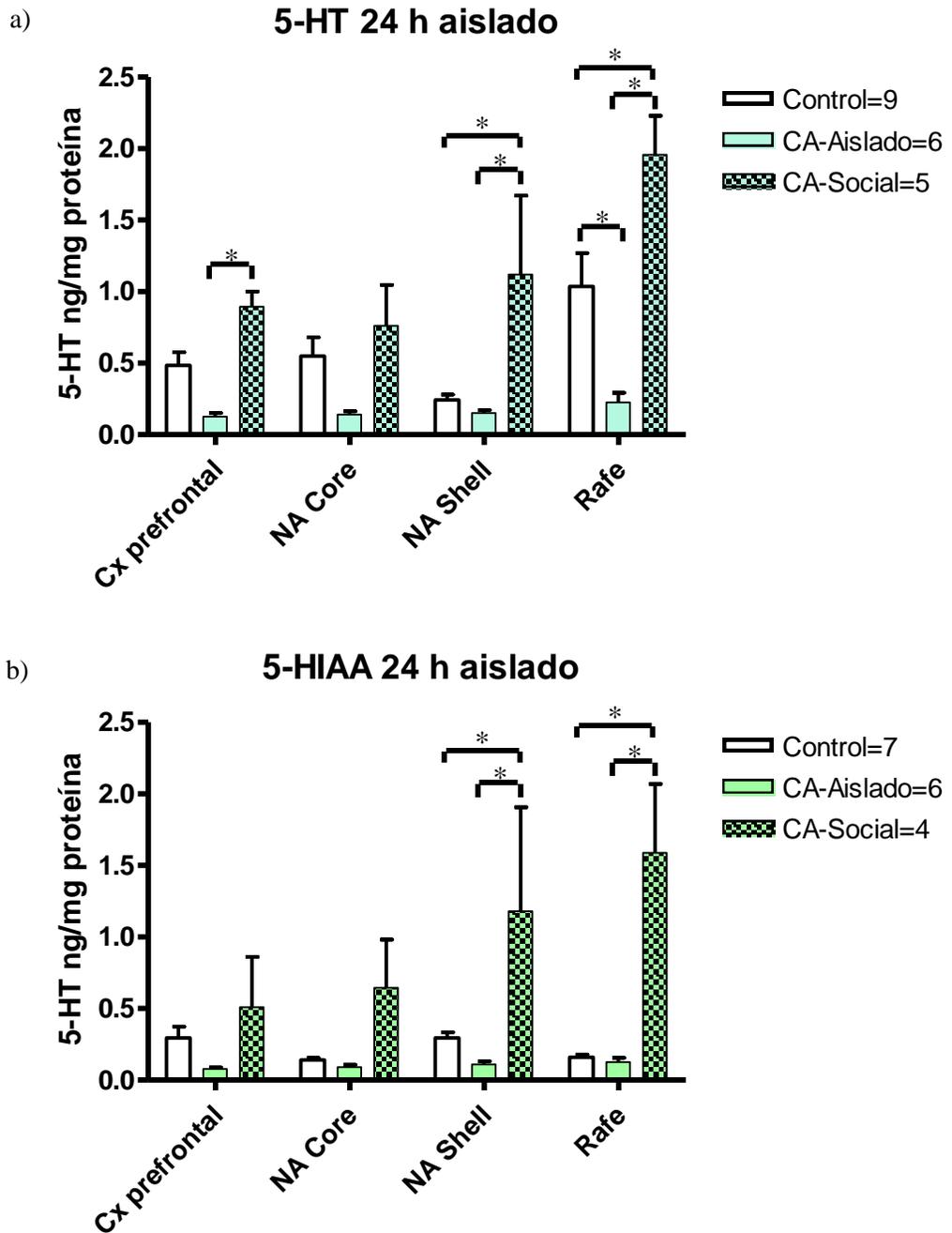


Figura 17. Contenido de serotonina (a) y 5-HIAA (b) en la corteza prefrontal media (Cx prefrontal), el Núcleo acumbens (NA) Core y Shell y el Rafe dorsal y medial en las ratas CA-Aisladas, CA-Social y Control después de 24 hrs de aislamiento. \*  $p < 0.05$  post hoc Bonferroni.

## 8. Discusión

Los presentes resultados son consistentes con los hallazgos anteriormente reportados que, en la rata, la privación temprana de los estímulos sensoriales y sociales provenientes de la madre y los hermanos de camada a través de la crianza artificial (CA), modifica negativamente el desarrollo de conductas agonistas como las conductas de Juego-lucha en machos juveniles (Ochoa, 2013) y la agresión materna en la rata hembra (Melo et al., 2009). Específicamente, este estudio aporta evidencia que dicha experiencia temprana incrementa la agresividad en la rata machos adultos. En el presente estudio se observó que la separación materna y CA está asociada con el aumento de la agresión y muestra por primera vez que dicho efecto puede estar asociado con la reducción del contenido basal de serotonina y su metabolito (5-HIAA), en homogenados de tejidos del Rafé dorsal-medial y de la corteza prefrontal, respectivamente. De la misma forma, encontramos una reducción de la serotonina en la corteza prefrontal después de un encuentro agresivo. Por otro lado, estos datos también son consistentes con lo reportado en otros trabajos de este laboratorio donde se muestra que el re-emplazo de estímulos sociales durante el aislamiento (Grupo CA-Social), previene parcialmente los efectos de la CA sobre las conductas de juego-lucha en el macho juvenil (Ochoa, 2013) y la agresión materna (Melo et al., 2009). Específicamente, cuando a las crías mantenidas en el sistema de CA se les provee de dos crías de la misma edad, sexo indistinto, de madres donadoras, los efectos del aislamiento sobre algunos componentes de la agresividad, y sobre los niveles basales de serotonina y su metabolito se previenen parcialmente.

Específicamente los resultados conductuales mostraron que, en comparación con los machos criados por su madre, aquellos criados dentro del sistema de crianza artificial presentaron: 1) incremento en la frecuencia y la duración de la conducta de lucha, 2) incremento en el número de patadas hacia el macho Intruso, 3) menor latencia para inducir la postura de sumisión en los machos Intrusos, 4) disminución en el número de veces que se acercaron al macho Intruso para explorar su cabeza y en el tiempo que gastaron realizando dicha conducta, 5) disminución de la frecuencia de exploración del cuerpo del Intruso, y 6) menor latencia y duración para olfatear el ambiente dentro de la caja de prueba. Estos datos son consistentes con lo encontrado en los machos juveniles aislados quienes muestran altos niveles de conductas de juego-lucha, aunque el tiempo que gastaron explorando el cuerpo de

los Intrusos fue mayor (Ochoa, 2013). Además, las hembras lactantes manifiestan mayor agresividad que las hembras criadas por su madre, aunque la exploración al Intruso fue similar a la desplegada por el macho criado por su madre (Melo et al., 2009). Por otro lado, los resultados conductuales corroboran la hipótesis, y coinciden con otros datos obtenidos a través de otros paradigmas experimentales, incluyendo a los reportados en este laboratorio.

En ratones de diferentes líneas se ha encontrado que el aislamiento pos-destete incrementa la agresión, las líneas son opuestas, una de baja agresión y la otra de alta agresión (Garépy y cols., 1995). Ambas líneas presentaron aumento en el ataque y las patadas cuando fueron aisladas, las conductas de escape e inmovilidad (estrés) aumentaron de igual manera en las aisladas, mientras el acercamiento social fue mayor en las ratas no aisladas. A este respecto, los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que el hecho que los intrusos hayan agredido más a los machos CA-Aislados, dieron más mordidas y atacaron por más tiempo probablemente sea debido a que respondieron a las incitaciones del Residente, quien fue muy insistente en su acercamiento al intruso.

Por otro lado, como se ha reportado anteriormente, el re-emplazo de estímulos sociales (Grupo CA-Social) previene los efectos negativos del aislamiento sobre las conductas agresivas afectadas. En este estudio, el número de veces que los machos CA-Sociales despliegan luchando y el tiempo empleado en realizar esta conducta, así como la frecuencia de patadas, y la latencia para someter al Intruso (postura de sumisión), así como la exploración del Intruso, fue similar al expresado por los machos criados por su madre (Grupo Control). Estos datos tienen en común que la separación materna y CA incrementa, en etapas posteriores al destete, las conductas agonistas, y el re-emplazo de estímulos sociales previenen dichos efectos. Esto posiblemente a través de modificar negativamente algunas de las áreas neurales que modulan la expresión de la agresión. Con base a la anterior posibilidad, en este estudio se determinó el contenido de serotonina y su metabolito en homogenados de tejidos del Rafé dorsal y medial, el núcleo accumbens (core y Shell) y de la corteza prefrontal; como se esperaba, los niveles de serotonina basal en el Rafé dorsal y medial, y del metabolito en corteza prefrontal de los machos aislados fueron menores que los encontrados en los tejidos de los machos criados por su madre. Estos resultados coinciden con lo encontrado en otros trabajos en la rata (Andersen y cols., 1999; Brenes y cols. 2008; Trabace1

y cols., 2011) y en otras especies, como en los ratones (Giacalone y cols., 1968), en el sentido de que la experiencia temprana modifica el contenido de serotonina en similares áreas del cerebro. En la rata, la separación parcial de la madre induce en la progenie bajos niveles de serotonina en el Rafé dorsal (Andersen y cols., 1999), y el aislamiento social pos-destete provoca una disminución de la serotonina y su metabolito en la corteza prefrontal (Brenes y cols. 2008). Además, ratones aislados socialmente en el post-destete presentan niveles bajos de serotonina en el cerebro (medición post-mortem) bajo condiciones basales (Giacalone y cols., 1968).

De acuerdo a la hipótesis planteada en este trabajo, se esperaba que la confrontación agresiva de los machos CA-Aislados disminuyera aun más los niveles de serotonina en las estructuras neurales involucradas. Como se observa en la figura 5 la hipótesis alterna se aceptó solo para los datos obtenidos en la corteza prefrontal. Es decir, los machos CA-Aislados que fueron expuestos a la prueba de Residente-Intruso, y cuyos niveles de agresividad fueron más altos que los mostrados por los machos Control, tuvieron bajos niveles de serotonina en dicha área. Aunque dicho efecto no se observó en el Rafé dorsal y medial, pues los niveles de serotonina entre los machos Control y los CA-Aislados, fue similar. Los datos obtenidos en la corteza prefrontal y su relación con la expresión de la agresividad coinciden con lo encontrado en ratas macho (van Erp y Miczek, 2000). Aunque en dicho trabajo las ratas no fueron sometidas a separación materna temprana se encontró que la confrontación agresiva redujo los niveles de serotonina extracelulares (por microdialisis) en la corteza prefrontal. En contraste con lo obtenido en los datos basales y de 24 hrs de aislamiento social, la confrontación agresiva en los machos CA-Social, no solo no previno el efecto negativo de la separación materna total (Grupo CA-Aislado), sino que los niveles de serotonina en la corteza prefrontal y el Rafé, así como del metabolito en el Rafé, fueron significativamente menores que los obtenidos en los animales Control, incluso, los niveles de la serotonina en el Rafé de este grupo (CA-Social) fueron menores que los obtenidos en los CA-Aislados. Estos datos podrían deberse a que los animales CA-Sociales cuyos niveles de agresividad fueron similares a los determinados en los machos Controles, exploraron con mayor frecuencia a los machos Intrusos. Lo cual podría inducir en éstos ansiedad, como se ha reportado recientemente en este laboratorio, que el aislamiento y CA incrementa la ansiedad

en machos adultos ante un laberinto elevado en cruz (Melo et al., 2011), y el re-emplazo de estímulos sociales (grupo CA-Sociales), no previene totalmente dichos efectos, i.e., permanecen menos tiempo en los brazos abiertos que los machos Control (son más ansiosos ante el ambiente novedoso del laberinto). Estos datos sugieren que en nuestro caso, el encuentro con un macho no familiar (estímulo novedoso) induzca mayor exploración de reconocimiento (los machos CA-Sociales exploran más a los Intrusos), y un cierto grado de ansiedad, lo cual podría reducir los niveles de serotonina. Para confirmar, o rechazar tal posibilidad se requiere la realización de estudios específicos, como someter a los machos CA-Sociales a otras pruebas de ansiedad (p.e., Prueba de electrodo enterrado) y determinar los niveles de serotonina y su metabolito en las mismas áreas neurales.

Por otro lado, encontramos otros datos no esperados, por ejemplo, posterior a la prueba agresiva se encontró un incremento del metabolito a serotonina en el Núcleo accumbens shell de las ratas CA-Aisladas. Estos datos coinciden parcialmente con lo reportado en la rata macho intacta sometida a una prueba de Residente-Intruso. Es decir, los niveles de serotonina extracelular incrementan levemente en el núcleo accumbens, en relación a la obtenida antes de la prueba (van Erp y Miczek, 2000; Ferrari *et al.*, 2003). Estos datos muestran que la sola expresión de conductas agresivas incrementa ligeramente los niveles de serotonina en el núcleo accumbens, pero que la separación materna total y CA exacerba este efecto. Así, es posible que aunque no se observaron diferencia en el contenido de serotonina o su metabolito en el Rafé dorsal-medial, el alto contenido en el núcleo accumbens podría deberse a que la liberación en esta área haya sido afectada por la CA. Por otro lado, el estudio de van Erp y Miczek (2000), reportó que la confrontación agresiva incrementa los niveles de dopamina en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens, como ocurre por la interacción social con crías, en la hembra, solo en el núcleo accumbens (Afonso et al., 2011). Aunque similar interacción afiliativa en hembras CA reduce los niveles de dopamina en el núcleo accumbens Shell (Afonso et al., 2011). Estudios futuros son necesarios para evaluar la participación de la separación materna y la CA en el macho sobre el contenido de dopamina en similares áreas neurales.

Por otro lado, se desconoce la causa por la cual los niveles de serotonina y su metabolito no se reducen ante la confrontación agresiva, y dichos niveles en similares áreas en los

machos CA-Sociales. Existe la posibilidad que la hora de la toma de la muestra, relacionada con la prueba de agresión haya afectado dichos resultados, i.e., las muestras se tomaron entre 10 y 15 minutos después de la confrontación. Pero como se observa en el trabajo de van Erp y Miczek (2000), los niveles de serotonina bajaron inmediatamente después de la agresión, pero estos niveles fueron obtenidos directamente del sitio de la liberación. Esto podría sugerir que los niveles de dichos neurotransmisores pudieron variar en base al momento exacto de la toma de la muestra en algunos animales los cuales afectaron los resultados finales. Además, lo anterior podría deberse también a que los niveles de ambos neuroquímicos obtenidos a través de este procedimiento de homogenado de tejidos en fresco representan a los niveles obtenidos tanto en el espacio extracelular, como intracelular (en la vesículas pre y post-sinápticas). Datos que sirven para sugerir cuales estructuras neurales fueron afectadas por la manipulación temprana, pero no nos indican el estado funcional de la actividad del sistema serotoninérgico. Para ello se propone realizar mediciones directas y con mayor resolución temporal de serotonina extracelular a través de microdialisis. También se propone la ejecución de otros experimentos para conocer el curso temporal de este fenómeno colectando muestras en diferentes momentos después del encuentro agresivo.

De similar manera, los resultados obtenidos en animales aislados y CA que fueron privados de conespecíficos por 24 hrs son similares a los niveles basales. Sin embargo, como se observa en la figura 16, los niveles de serotonina en el Rafé en todos los grupos fueron menores, aunque no significativos, a los obtenidos en las muestras basales. Lo cual sugiere que el aislamiento social cuando son adultos afecta a todos los individuos, como se ha reportado en ratas machos y hembras la privación en la edad adulta tiene un efecto sobre la conducta (Varlinskaya y cols., 2008), en nuestro caso se destaca la afectación en la serotonina, aunque el efecto es mayor en los animales del grupo CA-Aislado.

Se ha reportado mayor potencial de unión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza prefrontal en sujetos con altos niveles de agresión. Esta alta capacidad para mantener la unión entre receptor metabolito puede ser tal vez la razón del cambio en el metabolismo por lo que como se mencionó afirmar cual es el significado del cambio en el metabolismo requiere de nuevos experimentos (Witte et al., 2009).

En los resultados del presente estudio se reporta que, para las ratas CA-Social, en el contenido de 5-HIAA (metabolito de serotonina) es menor en las áreas del Rafé y la corteza prefrontal media, resultado que puede estar relacionado a la naturaleza propia de este grupo en el establecimiento de las jerarquías al interior de su estructura social.

En conclusión, estos datos confirman la importancia de los estímulos sociales que proveen los compañeros de camada en el desarrollo de conductas agonistas y su participación en el contenido de serotonina y su metabolito en algunas áreas neurales que modulan la agresión. Además, estos datos sugieren que el aislamiento temprano altera negativamente los procesos de síntesis y/o liberación basales de la serotonina en algunas estructuras neurales involucradas en la regulación de la agresión probablemente debido técnica de homogenados de tejidos que no discrimina la ubicación de la serotonina y su metabolito, ya que se determina tanto el contenido en la vesículas pre y post-sinápticas, como en el espacio extracelular.

## 9. Perspectivas

Los resultados actuales no permiten conocer la concentración de serotonina liberada si bien dan algunos indicios o pistas de cómo se podría estar dando el metabolismo de ésta en las ratas CA-Aisladas. Además, aun cuando se conoce la disminución del neurotransmisor en determinadas áreas neurales estudiadas es difícil atribuir a esta baja un funcionamiento inadecuado del sistema regulador de la agresión en las ratas CA-Aisladas. Así, lo más conveniente será hacer primero un análisis *in vivo* de las concentraciones de serotonina en las áreas cerebrales de las que se tiene indicios de un cambio, la corteza prefrontal media y el Rafé, a través de microdiálisis para reconocer el funcionamiento del recambio metabólico y los cambios en la concentración de serotonina liberada, la que se vierte al espacio sináptico. Segundo, realizar manipulaciones farmacológicas (por medio de agonistas y antagonistas selectivos) para evaluar la participación de los receptores serotoninérgicos en fenómeno del incremento de la conducta agresiva inducidos por la separación materna en etapas tempranas de desarrollo.

## 10. Bibliografía

- Albert, D. J., Walsh, M. L., Longley W. 1985. *Medial hypothalamic and medial accumbens lesions which induce mouse killing enhance biting and attacks on inanimate objects.* *Physiol Behav.* 35:523-7.
- Alcázar-Córcoles, M. A., Verdejo-García, A., Bouso-Saiz, J. C., Bezos-Saldaña, L. (2010). *Neuropsicología de la agresión impulsiva.* *Rev Neurol.* 50: 291-9.
- Nakamura, K., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2003). *The influence of early weaning on aggressive behavior in mice.* *J. Veterinary. Med. Sci.* 65:1347-1349.
- Alfonso V. M., King S. J., Novakov M., Burton C. L., Fleming A. S. (2011). *Accumbal dopamine function in postpartum rats that were raised without their mothers.* *Horm Behav.* 60(5):632-43.
- Andersen S. L., Lyss P. J., Dumont N. L., Teicher M. H. (1999). *Enduring Neurochemical Effects of Early Maternal Separation on Limbic Structures.* *Annals New York Academy of Sciences.* 877:756-9.
- Blair, R. J. (2004). *The roles of orbital frontal cortex in the modulation of antisocial behavior.* *Brain Cogn.* 55:198-208.
- Blanchard, R. J., Wall, P. M. Blanchard, C. (2003). *Problems in the study of rodent aggression.* *Hormones and Behavior.* 44:161–170.
- Beery, A. K., Francis, D. D. (2011). *Adaptive significance of natural variations in maternal care in rats: A translational perspective.* *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 35:1552-1561.
- Brenes J. C., Rodríguez O., Fornaguera J. (2008). *Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum.* *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 89:85–93.
- Brown, G.L., Goodwin, F.K., Ballenge, J.C., Goyer, P.F. Mayor LF. (1979) *Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites.* *Psychiatry Res* 1: 131-139.

- Brunner, D., Hen, R. (2007). *Insights into the Neurobiology of Impulsive Behavior from Serotonin Receptor Knockout Mice*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 836:81-105.
- Champagne, F. A., Curley, J. P. (2005). *How social experiences influence the brain*. *Neurobiology*. 15:704–709.
- Champagne, F. A., Curley J. P. (2011). *Epigenetic Influence of the Social Environment*. En: Petronis and J. Mill (eds.), Brain, Behavior and Epigenetics, Epigenetics and Human Health, Chapter 10 DOI 10.1007/978-3-642-17426-1\_10, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 201.
- Coccaro, E. F. (1989) *Central serotonin and impulsive aggression*. *Br.J. Psychiatry*, 155: 52-62.
- Curley, J. P., Champagne, F. A., Bateson, P., Keverne, E. B. (2008). *Transgenerational effects of impaired maternal care on behaviour of offspring and grandoffspring*. *Animal Behaviour*. 75:1551-1561.
- Cushing, B. S., Kramer, K. M. (2005). *Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: The role of neuropeptides and steroids*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 29:1089-1105.
- Ferrari, P. E., van Erp, A. M. M., Tornatzky, W. K. A., Miczek, K. A. (2003). *Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats*. *Eur. J. Neurosci*. 17: 371–378.
- Greig, T. R. (2003). *Cortical and limbic neural circuits mediating aggressive behavior*. En: *Neurobiology of aggression: Understanding and preventing violence*. M. P. Mattson (Ed). Human Press. pp.1-20.
- Gariépy, J. L., Gendreau, P. L., Mailman, R. ., Tancer, M., Lewiss, M. H. (1995). *Rearing Conditions Alter Social Reactivity and D<sub>2</sub> Dopamine Receptors in High- and Low-Aggressive Mice*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 51:767-773.
- Giacalone, E., Tansella, M., Valzelli, L., Garattini, S. (1968) *Brain serotonin metabolism in isolated aggressive mice*. *Biochem. Pharmacol*. 17: 1315-1327.

- Gonzalez, A., Lovic, V., Ward, G. R., Wainwright, P. E., Fleming, A. S. (2001). *Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats*. Dev.Psychobiol. 38: 11-32.
- Gonzalez-Mariscal, G., Poindron, P. (2002). *Parental care in mammals: Immediate internal and sensory factors of control*. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Farbach S, Rubin R, eds. Hormones, Brain and Behavior. New York: Academic Press. pp 215-298.
- González-Marisca, G., Melo A.I. (2013). *Parental behavior en: Neuroscience in the 21st century*. Ed. Pfaff, D.W. Springer-Verlag. New York.
- Han, X., Wang, W., Shao, F., Li, N. (2011). Isolation rearing alters social behaviors and monoamine neurotransmission in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of adult rats. Brain Research 1385:175-181.
- Hennig, J., Reuter, M., Netter, P., Burk, C. (2005). *Two Types of Aggression Are Differentially Related to Serotonergic Activity and the A779C TPH Polymorphism*. Behavioral Neuroscience. 119: 16–25.
- Heimming, R. S., Bodden, C., Jansen, F., Lewejohann, L., Kaiser, S., Lesch, k. P., Palme, R., Sachser, N. (2011). *Living in dangerous world decreases maternal care: A study in serotonin transporter knockout mice*. Hormones and Behavior. 60: 397-407.
- Lenz, K. M., Graham, M. D., Parada, M., Fleming, A. S., Sengelaub, D. R., Monks, D. A. (2008). *Tactile stimulation during artificial rearing influences adult function and morphology in a sexually dimorphic neuromuscular system*. Dev Neurobiol. 68(4):542-57.
- Lesch, K.P. (2003). *The serotonergic dimension of aggression and violence*. En: *Neurobiology of aggression: Understanding and preventing violence*. M. P. Mattson (Ed). Human Press. pp. 33-63.
- Lévy, F., Melo, A. I., Galef Jr., B. G., Madden, M., Fleming, A.S. (2003). *Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats*. Dev. Psychobiol. 43:177-191.
- Linnoila, M., Virkkunen, M., Scheinin, .M., Nuutila, A., Rimon, R., Goodwin, F. K. (1983) *Low cerebrospinal fluid 5-hidroxyindoleacetic acid concentration differentials impulsive from nonimpulsive violent behavior*. Life Sci., 33: 2609-2614.

- Lomanowska, A. M., Chatterjee-Chakraborty, M., Steiner, M., Kraemer, G. W. (2011). *Effects of motherless rearing on basal and stress-induced corticosterone secretion in rat pups*. *Stress*. 146: 685-96.
- Lovic, V., Fleming, A. S. (2004). *Artificial-rearing female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task-reversal of effects with maternal-like licking stimulation*. *Behav. Brain Res*. 148: 209-219.
- Lovic, V., Fleming, A. S., Fletcher, P. J. (2006). *Early life tactile stimulation changes adult rat responsiveness to amphetamine*. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 84: 497-503.
- Lovic, V., Palombo, D. J., Fleming, A. S. (2011). *Impulsive rats are less maternal*. *Dev. Psychobiol*. 53:13-22.
- Luigia T., Zotti M., Colaianni M., Morgese M. G., Schiavone S., Paolo Tucci, Harvey B. H., Wegener G., Cuomo V. (2011). *Neurochemical differences in two rat strains exposed to social isolation rearing*. *Acta Neuropsychiatrica*. 24: 286–295.
- Mattson, M. P. (2003). *Neurobiology of aggression*. Human Press Inc. Totowa, New Jersey, USA.
- Melo, A. I., Lovic, V., Gonzalez, A., Madden, M., Sinopoli, K. & Fleming, A. S. (2006) *Maternal and littermate deprivation disrupt maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: Tactile stimulation, Nest odor, and social rearing prevent these effects*. *Dev. Psychobiol*. 48: 209-219.
- Melo, A. I., Hernández-Curiel, M. & Hoffman, K. L. (2009). *Maternal and peer contact during the postnatal period participate in the normal development of maternal aggression, maternal behavior, and the behavioral response to novelty*. *Behav. Brain Res*. 201: 14-21.
- Melo A. I., Ochoa I., Marquez-Portillo M., Toriz C. G., Aguilar C., Corona F., Hoffman K. L., Fleming A S. (2011). *Effect of early maternal separation and artificial rearing on the development of anxiety responses in an elevated plus maze task in the adult male rat: social cues ameliorate this effect*. 15<sup>th</sup> Annual Meeting for Society for Behavioral Neuroscience. Queretaro, Qro. México. Junio:23-26, 2011.

- Messer, M., Thoman, E. B., Terrassa, A. G., Dalman, P.R. (1969). *Artificial feeding of infant rats by continuous gastric infusion*. J. Nutrition. 98: 404-410.
- Miczek, K. A., Faccidomo, S., De Almeida, R. M. M., Bannai, M., Fish, E. W., Debold, J. F. (2004). *New Pharmacotherapeutic Approaches and Opportunities*. Annals New York Academy of Sciences. 1036: 336–355.
- Ochoa I., (2023). *Efecto de la separación maternal y social de los compañeros de camada durante el período postnatal en el desarrollo de la agresión en ratas macho*. Escuela de Biología de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Olivier, B. (2004). *Serotonin and aggression*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1036:382-392.
- Potegal M. (2012). *Temporal and frontal lobe initiation and regulation of the top-down escalation of anger and aggression*. Behav Brain Res. 231:386-95. doi: 10.1016/j.bbr.2011.10.049.
- Quadros, M.I., Takahashi, A. & Miczek, A. (2010). *Serotonin and Aggression Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin* DOI: 10.1016/B978-0-12-374634-4.00038-1.
- Rosales, M. G., Martinez-Fong, D., Morales, R., Nunez, A., Flores, G., Gongora-Alfaro, J. L., Floran, B., Aceves, J., (1997). *Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study*. Neuroscience. 80, 803-810.
- Rosenblatt, J. S and Lherman, D.S. (1963). *Maternal behavior in the laboratory rat*. En: Maternal Behavior in mammals. Rheingold H.L (ed) John Wiley & Sons NY. 8-57.
- Siegel, A., Suresh, B., Rekha, B., Steven, S. Z. (2007). *The Neurobiological Bases for Development of Pharmacological Treatments of Aggressive Disorders*. Neuropharmacology. 5:135-147.
- Takahashi, A., Quadros, I. M., De Almeida, R.M.M. & Miczek, K.A. (2011). *Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression*. Psychopharmacology. 213:183-212.
- Van Erp A.M.M., Miczek, K.A. (2000) *Aggressive behavior, increased accumbal dopamine and decreased cortical serotonin in rats*. J. Neurosciences 15:9320–9325.
- Van Hasselt, F. N., Tieskens, J. M., Trezza, V., Kruggers, H. J., Vanderschuren, L. J. M. J., Joëls, M. (2012). *Within-litter variation in maternal care received by individual pups*

*correlates with adolescent social play behavior in male rats.* Physiology and Behavior. 106:701-706.

Varlinskaya E I., Spear L. P. (2008). *Social interactions in adolescent and adult Sprague–Dawley rats: Impact of social deprivation and test context familiarity.* Behavioural Brain Research. 188:398–405.

Westergaard, G.C., Suomi, S.J., Higley, J.D. & Mehlman, P.T. (1999) *CSF 5-HIAA and aggression in female macaque monkeys: species end interindividual differences.* Psychopharmacology, 146:4 440-446.

Winstanley, C. A. (2007). *The Orbitofrontal Cortex, Impulsivity, and Addiction. Probing Orbitofrontal Dysfunction at the Neural, Neurochemical, and Molecular Level.* Annals of the New York Academy of Sciences. 1121: 639–655.