



PAPEL DE LAS SUBUNIDADES ALFA DEL RECEPTOR GABA_A EN LA REGULACIÓN DE LA CONDUCTA AGRESIVA

ROLE OF α SUBUNITS OF THE GABA-A RECEPTOR IN THE REGULATION OF AGGRESSIVE BEHAVIOUR

Mercedes Martín-López; José Francisco Navarro

Universidad de Málaga

navahuma@uma.es

Receptor GABA_A - Agresión - Subunidades α - Modelos animales

GABA_A receptor - Aggression - α subunits - Animal model

RESUMEN:

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso, y ejerce sus principales acciones farmacológicas a través del receptor ionotrópico GABA_A, cuya composición más frecuente es la formada por la combinación de subunidades $(\alpha 1)_2(\beta 2)_2\gamma 2$. Las características farmacológicas del receptor GABA_A parecen depender de la subunidad α que esté presente en cada subtipo de receptor. Aunque numerosos estudios han implicado al receptor de GABA_A en la modulación de la conducta agresiva, aún no conocemos el papel preciso que las distintas subunidades α juegan en la agresión. La razón principal es la dificultad para conseguir ligandos que muestren selectividad específica por las subunidades α . La introducción de nuevas estrategias que incluyen el uso de modelos animales “knock-out” y “knock-in”, el empleo de ligandos con actividad agonista parcial vs. total y la existencia de nuevos compuestos con eficacia selectiva abren nuevos horizontes al estudio del grado de participación que tienen las distintas subunidades α del receptor GABA_A en la agresión.

ABSTRACT:

γ -Aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the brain and exerts its main actions via ionotropic GABA_A receptors, being $(\alpha 1)_2(\beta 2)_2\gamma 2$ the most abundant subunit combination. The pharmacological characteristics of GABA_A receptor appear to depend on α subunit that is present in each receptor subtype. Although numerous studies have involved to GABA-A receptors in the modulation of aggressive behaviour, the precise role of the different α subunits in aggression is not known. The main reason is the difficulty to obtain ligands that exhibit specific selectivity for the α subunits. The introduction of new strategies that include the use of animal models “knock-out” and “knock-in”, the use of ligands with partial vs total agonism activity, as well as the existence of new compounds with selective efficacy open new perspectives to the study of the implication degree of the different α subunits in aggression.

PAPEL DE LAS SUBUNIDADES α DEL RECEPTOR GABA_A EN LA REGULACIÓN DE LA CONDUCTA AGRESIVA

La conducta agresiva parece estar modulada por distintos sistemas de neurotransmisores cerebrales entre los que se encuentran el glutamato [1,2], la serotonina, la dopamina y el GABA [3]. La existencia de una relación clara entre el neurotransmisor GABA y la conducta agresiva ha quedado demostrada con distintos estudios farmacológicos empleando diferentes modelos de agresión, aunque la dirección de dicha relación no siempre es coincidente. Entre las razones que puedan explicar en parte esta situación podríamos considerar desde la propia complejidad de la conducta que estamos estudiando, el modelo de agresión empleado por los distintos autores, la diversa y amplia distribución de receptores GABA_A que han sido identificados y la poca disponibilidad, hasta ahora, de ligandos con la suficiente selectividad como para poder abordar de forma sistemática un estudio farmacológico de estos receptores sobre la agresión.

En este sentido, desde de la práctica clínica se observa la existencia de relación entre la modulación del GABA cerebral y la agresión. Así, sabemos que las benzodiazepinas se emplean frecuentemente para el control de la agitación y en los accesos agresivos [4,5], y que algunos fármacos que aumentan la acción de GABA, como el divalproato sódico, han sido propuestos para el tratamiento de la agresión y la irritabilidad [6]. Sin embargo, se han descrito reacciones paradójicas asociadas al consumo de benzodiazepinas que conllevan incrementos de la agitación, irritabilidad y hostilidad [7], habiéndose observado principalmente en sujetos con trastorno de personalidad límite y trastornos de pánico [8].

FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES GABA-A

El ácido Gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central, y en la mayoría de las neuronas cerebrales se expresan receptores para éste neurotransmisor. Se conocen tres receptores para el GABA: GABA_A, GABA_B y GABA_C. Mientras que los receptores GABA_A y GABA_C son ionotrópicos y están ligados a un canal de cloro, el GABA_B es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína G que media las respuestas de inhibición más

lenta y prolongada del GABA [9]. El receptor de GABA_A, es el que se encuentra más ampliamente distribuido a través del sistema nervioso de los mamíferos y parece jugar un papel importante en el desarrollo postnatal de la plasticidad sináptica [10], así como en diversas funciones cerebrales. En este sentido, se han observado déficits en la expresión funcional de estos receptores en trastornos de ansiedad, epilepsia, déficits cognitivos, esquizofrenia, depresión y en abuso de sustancias [9,11]. Esto, unido al hecho de presentar distintos lugares de reconocimiento para compuestos tales como las benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides, entre otros, han convertido al receptor GABA_A en centro de atención con el doble objetivo de descubrir la implicación de estos receptores en las distintas patologías, y de obtener dianas terapéuticas que permitan el tratamiento de las mismas.

El receptor de GABA_A pertenece a la familia de receptores ligados a canales iónicos. Está formado por cinco subunidades, cada una de las cuales tiene cuatro dominios transmembranales (TM1-4), donde el TM2 parece formar la pared del canal iónico, presentado también un dominio intracelular largo entre TM3 y TM4 donde se cree que se localiza un lugar de regulación del receptor, al que se unen proteincinasas [9]. El extenso dominio N-terminal extracelular presenta el sitio de unión del GABA, y también contiene el lugar de reconocimiento para otros compuestos como las benzodiazepinas y ligandos no benzodiazepínicos que se unen al mismo lugar (nos referiremos al lugar de benzodiazepinas independientemente de la familia química a la que pertenezca el compuesto). Se han identificado 16 subunidades diferentes clasificadas en siete familias que pueden conformar este receptor α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π , aunque algunos autores incluyen también a la subunidad ρ como un tipo más de receptor GABA, en lugar de catalogarlo como receptor GABA_C [12]. A pesar de la gran variedad de subunidades del receptor GABA_A, la mayoría de los receptores de GABA_A expresados en el cerebro están compuestos por dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ , pudiéndose reemplazar ésta última por δ , ϵ , θ ó π . Además, se cree que la mayoría de los receptores GABA_A portan una sola variante de subunidad α , β y γ . Recientemente, Olsen y Sieghart [12] han realizado una clasificación de los subtipos de receptores GABA_A y han incluido en la categoría de receptores “inequívocamente localizados en el cerebro”, a nueve subtipos: $\alpha 1-6\beta\gamma 2$, $\alpha 4\beta\delta$, $\alpha 6\beta\delta$, ρ . El receptor GABA_A es, por tanto, un complejo receptor en el

que el ensamblaje de las cinco subunidades permite la construcción de un canal iónico de Cl^- que atraviesa la membrana celular, que está controlado por un lugar de reconocimiento para el neurotransmisor GABA, y que presenta también otros lugares de modulación del receptor [13]. El lugar de unión del neurotransmisor GABA se produce en la interfase entre la subunidad α y β , y conduce a la apertura del canal, permitiendo la entrada rápida de Cl^- al interior de la célula [9]. El lugar de reconocimiento para las benzodiazepinas se produce en la interfase entre la subunidad α y γ . Puesto que se ha podido constatar que la γ_2 es la subunidad predominante en los receptores nativos, las distintas características farmacológicas del receptor GABA_A parecen depender de la subunidad α que esté presente en cada subtipo de receptor. De este modo, sólo aquellos receptores GABA_A compuestos por las subunidades α_1 , α_2 , α_3 o α_5 , junto con dos subunidades β y una γ , son sensibles a benzodiazepinas, mientras que los que presentan las subunidades α_4 ó α_6 son “insensibles a benzodiazepinas [12,14]. También se han observado diferencias en cuanto a su distribución en la membrana celular, puesto que la mayoría de los receptores GABA_A compuestos por las subunidades α_1 , α_2 o α_3 presentan una localización predominantemente sináptica, siendo los responsables de la inhibición fásica cerebral, mientras que los que presentan la subunidad α_5 , así como los insensibles a benzodiazepinas α_4 y α_6 , están presentes en las zonas extrasinápticas, donde mediarían la inhibición tónica GABAérgica [9,15].

El subtipo de receptor de GABA_A que más abunda en el sistema nervioso central es el formado por las subunidades $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (60%), seguido por $\alpha_2\beta_2/3\gamma_2$ (15-20%), $\alpha_3\beta_n\gamma_2/3$ (10–15%), $\alpha_5\beta_3\gamma_2/\gamma_3$ (5%) [14,16]. Aunque pueda parecer que algunos de estos receptores no son muy abundantes, debido a la amplia distribución y a la cuantitativa importancia del sistema GABérgico, incluso el menor subtipo de receptores GABA_A tiene una abundancia comparable con aquellos de los receptores de noradrenalina, dopamina, serotonina o receptores opioides [12]. En cuanto a su distribución, los diferentes estudios realizados con técnicas inmunocitoquímicas [17] y de hibridación in situ [18] indican que las subunidades α_1 , β_1 , β_2 , β_3 y γ_2 , están distribuidas a lo largo de todo el cerebro, mientras que las subunidades α_2 , α_3 , α_4 , α_5 y α_6 , se localizan en regiones más específicas. Así, la subunidad α_1 se localiza prácticamente en todas las áreas cerebrales a excepción de la capa de celular granular del bulbo olfatorio, núcleo reticular talámico, y motoneuronas de la médula

espinal [19], y está presente por ejemplo en la amígdala basolateral [20], corteza cerebral (interneuronas y células principales), células de Purkinje del cerebelo, hipocampo (interneuronas y células principales) [14], núcleo hipotalámico ventromedial, núcleo rojo y núcleos del rafe dorsal y medial [21]. La subunidad $\alpha 2$, por su parte, está presente en la amígdala central [21,22], corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, sustancia gris periacueductal, núcleos del rafe, núcleos pontinos y neuronas motoras [16,21]. La presencia de la subunidad $\alpha 3$ es importante en la corteza cerebral, septum, amígdala, hipotálamo, formación reticular medular, bulbo olfatorio y también en neuronas colinérgicas del cerebro basal, en el locus coeruleus y núcleos del rafe (neuronas serotoninérgicas y catecolaminérgicas), así como en la sustancia gris periacueductal y el área tegmental ventral, habiéndose asociado su presencia también con las neuronas dopaminérgicas del tronco encéfalo [23]. Y, por último, la distribución de la subunidad $\alpha 5$ se haya más concentrada en regiones del hipocampo, estando presente también en amígdala, hipotálamo y corteza cerebral [16,21].

En cuanto al funcionamiento del receptor $GABA_A$, el neurotransmisor GABA al unirse a su receptor provoca la apertura de un canal iónico de cloro, mientras que la unión de los distintos compuestos al lugar de reconocimiento de las BZD, produce una modulación del flujo de Cl^- a través del canal producido por la acción del GABA. Se trata, por tanto, de una modulación alostérica, que en este caso produce una modificación de la frecuencia de apertura del canal iónico [24]. De este modo, los ligandos del lugar de reconocimiento para BZD en el receptor $GABA_A$ pueden actuar como agonistas totales (moduladores alostéricos positivos), que es como actúa la mayoría de las benzodiazepinas, produciendo un aumento de la conductancia al Cl^- provocada por GABA y ocasionando una hiperpolarización de la membrana. Y en el extremo opuesto nos encontramos con los agonistas inversos (moduladores alostéricos negativos) como el DMCM (6,7-dimethoxy-4-ethyl-3(methoxy-carbonyl)-b-carbolina), que disminuyen la frecuencia de apertura del canal de Cl^- y se traduce al final en una despolarización [25]. Por otra parte, los ligandos que actúan como antagonistas (moduladores cero), tienen la propiedad de unirse con alta afinidad a su receptor, pero no generan ningún tipo de modificación en él, es decir, no afectan a la acción del GABA sobre el canal de Cl^- ; además, estos compuestos no han mostrado tener efectos in vivo

[26]. Un ejemplo lo tenemos con el Ro 15-1788 (flumacenilo). Sin embargo, el espectro de eficacia de los ligandos sobre el receptor GABA_A no acaba aquí, puesto que la actividad intrínseca de los compuestos puede ser total o parcial, cubriendo el intervalo que existe entre los dos extremos (agonista total-agonista inverso total). De este modo, el bretazenil fue desarrollado como agonista parcial que posee entre un 20-40% de eficacia sobre receptores que contienen las subunidades α 1, α 2, α 3 y α 5 en pruebas electrofisiológicas, en comparación con benzodiazepinas clásicas [27].

El conocimiento de la composición de subunidades que conforman el receptor GABA_A, y el descubrimiento de que las propiedades farmacológicas de los ligandos benzodiazepínicos parecen depender de la afinidad que presenten por las distintas subunidades α del receptor GABA_A, ha favorecido la aparición de nuevos compuestos farmacológicos cada vez más selectivos, así como el desarrollo de modelos de animales transgénicos “knock-out” y “knock-in” para las distintas subunidades α del receptor GABA_A. El objetivo de ambas aproximaciones es el de vislumbrar el grado de participación que puedan tener estas subunidades en la modulación de la ansiedad, la acción anticonvulsiva, sedantes y miorelajante de los compuestos benzodiazepínicos que se unen al receptor GABA_A.

Así, en relación a la ansiedad, sedación, y efecto anticonvulsivo, se han realizado numerosos trabajos, y aunque los resultados obtenidos en estudios con ratones “knock-out” y “knock-in” para subunidades α , y los obtenidos con el abordaje farmacológico no siempre son coincidentes (en parte debido a las limitaciones propias de cada aproximación), podemos afirmar que la subunidad α 1 está especialmente implicada en los efectos sedantes y anticonvulsivos observados en ligandos [28-30], las subunidades α 2 y α 3 parecen estar más relacionadas con la acción ansiolítica [31-34] y la subunidad α 5 estaría involucrada en el aprendizaje [35,36], y posiblemente también en la ansiedad [37].

RECEPTORES GABA-A Y CONDUCTA AGRESIVA

Sin embargo, las investigaciones relacionadas con la agresión no se han dirigido aún a realizar un análisis detallado del receptor de GABA_A. En este sentido, la mayoría de estudios realizados en investigación animal ha empleado fármacos clásicos, con poca

selectividad por las subunidades α del receptor GABA_A. Así, benzodiazepinas clásicas como el diazepam y clordiazepóxido han mostrado ejercer una acción antiagresiva en el modelo de agresión inducida por aislamiento [38-40], aunque acompañada a veces de efectos motores [41], así como una reducción de la agresión en el modelo intruso-residente [42]. Asimismo, se ha descrito reducción de la agresión con otras benzodiazepinas como clobazam [43], bentazepam [44] o midazolam [45]. Otros compuestos no benzodiazepínicos como la zopiclona (ciclopirrolona), que tampoco exhibe selectividad por las distintas subunidades α , ha mostrado una acción antiagresiva específica en el modelo de agresión inducida por aislamiento [46,47], habiéndose demostrado también su acción antiagresiva en los modelos de agresión inducida por shock eléctrico [48] y en conducta muricida de ratas [49]. El zolpidem, por su parte, una imidazopiridina que presenta entre 10-20 veces más afinidad por los receptores α 1-GABA-A que por los que presentan la subunidad α 2 y α 3, y es insensible a los receptores que presentan la subunidad α 5 [50], ha reducido la conducta agresiva de ratones en el modelo de residente-intruso tanto cuando se administraba sólo, como cuando se hacía tras el tratamiento con alcohol, aunque algunos trabajos atribuye este efecto a su acción sedante [51]. Sin embargo, se ha podido comprobar que el zolpidem, a dosis no sedantes, también consigue reducir las conductas agresivas en el modelo de agresión inducida por aislamiento [47]. De modo que, aunque no sabemos en qué grado, los receptores α 1-GABA_A sí parecen contribuir en la regulación de la conducta agresiva evaluada en modelos animales.

Respecto a las subunidades α 2, α 3 y α 5, tan sólo hay dos trabajos que hayan evaluado su posible participación en la regulación de la agresión. Nuestro grupo ha sometido a examen un compuesto con afinidad selectiva por la subunidad α 3 (SB-205384) en el modelo de agresión inducida por aislamiento [52]. Se trata de una sustancia perteneciente al grupo de los benzotiopeenos que actúa como un modulador alostérico positivo del receptor GABA_A [53]. Con las dosis empleadas en este trabajo (0.5-4 mg/kg, ip) no se observó efecto alguno sobre la conducta agresiva, a pesar de que sus receptores están presentes en áreas cerebrales implicadas en la regulación de la agresión (tales como amígdala, hipotálamo, septum, sustancia gris periacueductal) [19,20], lo cual puede interpretarse de varias formas, bien porque el receptor GABA_A con la subunidad α 3 no esté implicado en la modulación de la agresión, que sería la

interpretación más sencilla pero difícil de entender por la localización de sus receptores, bien porque este compuesto presente un mecanismo de acción nuevo, algo diferente al de los que se ligan al lugar de reconocimiento de benzodiazepinas en el receptor GABA_A [53], o bien, porque se requieran dosis más altas para conseguir una mayor ocupación del receptor para poder observar efectos. Por otra parte, nuestro grupo también ha evaluado, en el modelo de agresión inducida por aislamiento, los efectos de la administración aguda de L-655,708 (0.625-5 mg/kg, ip) [54], un potente y selectivo ligando para el lugar de reconocimiento de benzodiazepinas del receptor $\alpha 5$ -GABA_A. Es un agonista parcial inverso que muestra unas 100 veces más selectividad por los receptores $\alpha 5$ -GABA_A que por los $\alpha 1$ -GABA_A [55]. Los resultados mostraron una reducción significativa de conductas agresivas sólo con la dosis más alta (5 mg/kg), sin que se observara reducción en la actividad motora. Sin embargo, no podemos hablar de una acción antiagresiva específica porque esta reducción de la agresión se vio acompañada de incrementos en conducta de evitación/huida y de exploración no social, que tradicionalmente se ha empleado como buen predictor de la acción ansiogénica de un fármaco [56], y que concuerda con el efecto ansiogénico descrito con éste fármaco en el test elevado en cruz [37], efecto que podría estar mediado por los receptores $\alpha 5$ -GABA_A del hipocampo, región que está involucrada también en la modulación de la ansiedad [57]. Aunque no hay más estudios que hayan evaluado la acción de un ligando específico del receptor $\alpha 5$ -GABA_A en un modelo de agresión, sí tenemos datos del efecto de compuestos que, como el L-655,708, son agonistas parciales inversos (pero con afinidad por todas las subunidades α del receptor GABA_A), en los que también se ha descrito una reducción de las conductas agresivas junto con incrementos en conductas de evitación/huida en distintos modelos animales de laboratorio, como agresión maternal [58], conflicto social [59] y agresión inducida por aislamiento [60]. Así, la mayoría de los compuestos probados parecen tener un efecto antiagresivo, aunque también se han descrito incrementos de agresión inducido por benzodiazepinas en ratones y en primates no humanos, similar al efecto “paradójico” descrito en humanos [4,61].

Otras evidencias que apoyan la relación entre el receptor de GABA_A y la agresión proceden de estudios realizados por Siegel et al. [62], quienes han demostrado la implicación de las neuronas GABAérgicas en el control de las conductas agresivas

inducidas por la estimulación del hipotálamo, una de las estructuras más estudiadas, especialmente en gatos y en ratas, por su participación en la expresión de la conducta agresiva. En gatos, se ha postulado la existencia de neuronas GABAérgicas tanto en hipotálamo medial como en el lateral, que mantienen relaciones recíprocas y cuya función sería la de inhibir el ataque predatorio o el ofensivo [62], mientras que en rata se ha identificado una densidad importante de neuronas GABAérgicas en la denominada “área hipotalámica de ataque” (HAA), un área delimitada del hipotálamo desde la cual se pueden generar estas conductas [63]. Asimismo, la administración de antagonistas del receptor GABA_A en esta región ha sido suficiente para provocar la aparición de conductas de ataque [64,65]. Y, en este mismo sentido, la destrucción quirúrgica del hipotálamo posteromedial consigue eliminar las conductas violentas en humanos [66], demostrando que el área hipotalámica implicada en el ataque está presente también en humanos y que, por tanto, el hipotálamo contiene un área que controla el ataque en todas las especies de mamíferos [63].

Asimismo, en un estudio reciente en el que compara la actividad cFos en la corteza prefrontal de ratas que pasaban por encuentros agresivos frente a otras que sólo mantenían contacto sensorial con el intruso, se ha observado que las áreas infralímbicas y medial orbital de la corteza prefrontal, se activan sólo en ratas que habían pasado por el encuentro agresivo. Los autores encontraron un aumento en la actividad de neuronas piramidales glutamatérgicas, y en las ratas que mostraron una agresión más violenta observaron una reducción significativa en la actividad de neuronas GABAérgicas tanto en el área infralimbica y medial orbital (activadas sólo en las ratas agresivas), como en zonas de la ínsula agranular y corteza orbital ventral, planteando que, tal vez, la disminución de la inhibición local podría desorganizar los circuitos de la corteza prefrontal, conduciendo a una disminución de la inhibición que la corteza prefrontal debería ejercer sobre la agresión [67]. Y en estudios previos realizados para evaluar la participación del lugar de reconocimiento para benzodiazepinas del receptor GABA_A en la agresión, se observó que en animales que habían sido seleccionado por manifestar un mayor nivel de agresión se apreciaba una reducción significativa de lugares de unión para 3H-Ro-15, 1788 (flumacénilo) en corteza cerebral, hipotálamo e hipocampo, al ser comparados con ratones que exhibían niveles más bajos de agresión [68].

NUEVAS PERSPECTIVAS FARMACOLÓGICAS

En suma, parece claro que el neurotransmisor GABA, a través de su receptor $GABA_A$, está implicado en la modulación de la conducta agresiva, pero lo que no sabemos aún es el grado de participación que tiene cada subtipo de receptor α - $GABA_A$ en su control. El abordaje farmacológico de su estudio se encuentra con la gran dificultad de conseguir compuestos con afinidad selectiva por los distintos subtipos de receptor α - $GABA_A$. En un principio fue relativamente fácil encontrar ligandos que distinguieran entre el denominado receptor de benzodiazepinas tipo I ($\alpha 1$ - $GABA_A$) y el receptor de benzodiazepinas tipo II (que se corresponden con receptor de $GABA_A$ que contienen las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$) [69], pero ha resultado muy difícil obtener compuestos que presenten afinidad selectiva por las distintas subunidades del segundo grupo ($\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$), por lo que se ha optado por buscar otros medios para conseguir la selectividad por los subtipos de receptor [70]. Así, se han conseguido compuestos que muestran eficacia selectiva (selectividad funcional), es decir, se trata de ligandos que presentan afinidad similar por las distintas subunidades α (no son selectivos en términos de afinidad por el receptor), pero que muestran distinta actividad intrínseca [27]. En este sentido, disponemos de compuestos como SL-651498, que presenta un agonismo total sobre receptores $\alpha 2$ - $GABA_A$ y $\alpha 3$ - $GABA_A$, y un perfil de agonista parcial sobre los receptores de $GABA_A$ que contienen la subunidad $\alpha 1$ y $\alpha 5$ [71], TPA023, que muestra agonismo parcial sobre los receptores $\alpha 2$ - $GABA_A$ y $\alpha 3$ - $GABA_A$, y no presenta actividad intrínseca (antagonista) sobre los receptores $\alpha 1$ - $GABA_A$ y $\alpha 5$ - $GABA_A$ [27], o TP003, que exhibe un agonismo casi total (83%) por la subunidad $\alpha 3$ y menos del 15 % por la subunidad $\alpha 2$ [33], entre otros compuestos.

Otra estrategia útil para estudiar el nivel de participación de un subtipo de receptor es tener en cuenta el grado de actividad intrínseca que produce el compuesto (agonismo total vs. parcial) sobre su receptor [27,72]. En este sentido, mientras que los estudios farmacológicos que han empleado ligandos agonistas totales con afinidad selectiva por $\alpha 1$ - $GABA_A$, como zolpidem y zaleplon, encuentran escasos efectos ansiolíticos [73], y los modelos genéticos que anulan la subunidad $\alpha 1$ siguen observando efectos ansiolíticos al administrar benzodiazepinas clásicas como diazepam, llevándonos a pensar que el receptor $\alpha 1$ - $GABA_A$ no participa en la ansiedad, otros compuestos con actividad intrínseca parcial y afinidad selectiva por la subunidad $\alpha 1$ como el CL-218,872 han demostrado poseer actividad ansiolítica en distintos modelos

de ansiedad sin mostrar sedación [74,75]. Y lo mismo ocurre con el oncinaplon, un ligando con afinidad por la subunidad $\alpha 1$, que produce efectos ansiolíticos [76]. De este modo, algunos autores se están planteando que, tal vez, la disparidad de resultados obtenidos en los distintos estudios de agresión pueda deberse a la afinidad que presenten los compuestos por las distintas subunidades alfa y/o al grado de actividad intrínseca (eficacia) que presenten [51].

Además, en la práctica clínica, el desarrollo de tolerancia a los efectos de moduladores alostéricos clásicos tales como diazepam, lorazepam o alprazolam, que actúan como agonistas totales de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$, en general, tiene lugar en primer lugar a sus efectos sedantes, después a su acción anticonvulsiva y, por último, a su acción ansiolítica [71,77]. Y, por otra parte, las investigaciones que se han centrado en el estudio de los mecanismos que subyacen al desarrollo de tolerancia y/o dependencia a los efectos de las benzodiazepinas que actúan como moduladores alostéricos totales del $GABA_A$ sobre diferentes subtipos de receptores, parecen demostrar que esos cambios conductuales están más relacionados con las características farmacodinámicas de los compuestos que con sus características farmacocinéticas [77-79]. En este sentido, Aota et al. [79] utilizaron diazepam (agonista total con afinidad similar por $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$), imidazenil (agonista total con alta afinidad por la subunidad $\alpha 5$) y bretazenil (agonista parcial con afinidad similar por las distintas subunidades) en el estudio del desarrollo de tolerancia a la acción anticonvulsiva de estos compuestos, y comprobaron que las diferencias observadas entre ellos no podía ser atribuida a sus diferencias farmacocinéticas, puesto que las concentraciones cerebrales de esos compuestos y de sus metabolitos no mostraban diferencias entre los animales con tratamiento agudo y los que recibían el tratamiento crónico. En esta línea, distintos trabajos ponen de manifiesto de forma cada vez más clara que el efecto observado tras la administración crónica de los distintos compuestos, va a depender tanto de su actividad intrínseca (total vs. parcial), como de la selectividad (funcional o por afinidad) que presenten [80]. Así, Mirza y Nielsen [80], tras evaluar la potencia in vitro/in vivo, del tiempo de exposición/ocupación del receptor, selectividad y eficacia, como factores potenciales para que los moduladores positivos del lugar de benzodiazepinas generen dependencia física, llegaron a la conclusión de que la combinación de una baja actividad intrínseca y una mayor selectividad por las

subunidades α , haría más probable reducir la dependencia física producida por algunos de estos compuestos.

En definitiva, la aproximación que se plantea es necesaria para comprender los matices farmacológicos que no son fácilmente discernibles cuando se emplea la aproximación genética, puesto que tanto los modelos transgénicos “knock-out”, que inactivan la subunidad α objeto de estudio, como los “knock-in”, que convierten a la subunidad α en insensible a benzodiazepinas, impiden observar la acción del fármaco sobre su receptor, no permitiendo evaluar el nivel de eficacia funcional (total-parcial) que se requiere, además de la selectividad (afinidad) necesaria para observar eficacia in vivo.

REFERENCIAS

1. Navarro JF, Postigo D, Martín-López M, Burón E. Antiaggressive effects of MPEP, a selective antagonist of mGlu5 receptors, in agonistic interactions between mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 551: 67-70.
2. Navarro JF, De Castro V, Martín-López M. JNJ16259685, a selective mGlu1 antagonist, suppresses isolation-induced aggression in male mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 586: 217-220.
3. Miczek KA, Fish EW, Bold JF, De Almeida RM. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology* 2002; 163: 434-458.
4. Gourley SL, DeBold JF, Yin W, Cook J, Miczek KA. Benzodiazepines and heightened aggressive behaviour in rats: reduction by GABA_A/alpha1 receptor antagonists. *Psychopharmacology* 2005; 178: 232-240.
5. Siegel A, Bhatt S, Bhatt R, Steven S, Zalzman S. The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. *Curr Neuropharmacol* 2007; 5: 135-147.
6. Kavoussi RJ, Coccaro EF. Divalproex sodium for impulsive aggressive behavior in patients with personality disorder. *J Clin Psychiatry* 1998; 59: 676-680.
7. Robin C, Trieger N. Paradoxical reactions to benzodiazepines in intravenous sedation: a report of 2 cases and review of the literature. *Anesth Prog* 2002; 49: 128-132.
8. Weinbroum, A, Szold O, Ogorek D, Flaishon R. The midazolam-induced paradox phenomenon is reversible by flumazenil. *Epidemiology, patient characteristics and review of the literature. Eur J Anaesthesiol* 2001; 18: 789–797
9. Jacob TC, Moo SJ, Jurd R. GABA-A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 331-343.
10. Foeller E, Feldmann DE. Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14: 89-95.
11. Möhler H. Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABA_A receptors. *J Neurochem* 2007; 102: 1-2.
12. Olsen RW, Sieghart W. GABA-A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 2009; 56: 141-148.

13. Sarto-Jackson I, Sieghart W. Assembly of GABA-A receptors. *Mol Membr Biol* 2008; 25: 302-310.
14. Mckernan RM, Whiting PJ. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends Neurosci* 1996; 116: 475-482.
15. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptor and channels (GRAC), 3rd edn. *Br J Pharmacol* 2008; 153 (suppl. 2): S1-S09.
16. Möhler H. GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 505-516.
17. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA-A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 2000; 101: 815-850
18. Persohn E, Malherbe P, Richards JG. Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABA_A receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* 1992; 326: 193-216.
19. Fritschy JM, Brüning I. Formation and plasticity of GABAergic synapse: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 299-323.
20. Fritschy JM, Möhler H. GABA(A)-receptor heterogeneity in the adult rat brain: Differential regional and cellular distribution of seven major subunits *J Comp Neurol* 2005; 35: 154-194.
21. Heldt SA, Ressler KJ. Forebrain and midbrain distribution of major benzodiazepine-sensitive GABA_A receptor subunits in the adult C57 mouse as assessed with in situ hybridization. *Neuroscience* 2007; 150: 370-385.
22. Kaufmann WA, Humpel C, Alheid GF, Marksteiner J. Compartmentation of alpha 1 y alpha 2 GABA_A receptor subunits within rat extended amygdala: implications for benzodiazepine action. *Brain Res* 2003; 964: 91-99.
23. Gao B, Hornung JP, Fritschy JM. Identification of distinct GABA_A receptor subtypes in cholinergic and parvalbumin-positive neurons of the rat and marmoset medial septum-diagonal band complex. *Neuroscience* 1995; 65: 101-117.
24. Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2: 795-816.
25. Haefely WE, Martin JR, Richards JG, Schoch P. The multiplicity of actions of benzodiazepine receptor ligands, *Can J Psychiatry* 1993; 38 (suppl, 4): 102-108.
26. Haefely WE. The preclinical pharmacology of flumazenil. *Eur J Anaesthesiol* 1988; 2: 25-36.

27. Reynolds DS The value of genetic and pharmacological approaches to understanding the complexities of GABA_A receptor subtype functions: the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 37-42.
28. McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* 2000; 3: 587-92.
29. Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, et al. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 1999; 401: 796-800.
30. Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABA_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 475-498.
31. Atack JR, Hutson PH, Collison N, Marshall G, Bentley G, Moyes C, et al. Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha3 subunit-containing GABA_A receptors. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 357-366.
32. Morris HV, Dawson GR, Reynolds DS, Atack JR, Stephens DN. Both α 2 and α 3 GABA_A receptors subtypes mediate the anxiolytic properties of benzodiazepine site ligands in the conditioned emotional response paradigm. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 2495-2504.
33. Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ. et al. Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABA_A receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J Neurosci* 2005; 25: 10682-8.
34. Navarro JF, Burón E, Martín-López M. Anxiolytic-like activity of SB 205384 in the elevated-plus maze test in mice. *Psicothema* 2006; 18: 100-104.
35. Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, et al. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the α 5 subunit of the GABA_A receptor. *J Neurosci* 2002; 22: 5572-5580.
36. Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L et al. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8980-8985.
37. Navarro JF, Burón E, Martín-López M. Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABA_A receptors which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 1389-1392.

38. Da Vanzo JP, Daugherty M, Ruckart R, Kang L. Pharmacological and biochemical studies in isolation-induced fighting mice. *Psychopharmacologia* 1966; 9: 210-219.
39. Krsiak M. Effects of drugs on behaviour of aggressive mice. *Br J Pharmacol* 1979; 65: 525-533.
40. Sulcova A, Krsiak M. Differences among nine 1,4-benzodiazepines: an ethopharmacological evaluation in mice. *Psychopharmacology* 1989; 97: 157-159.
41. Martín-López M, Navarro JF. Acute and chronic effects of diazepam on agonistic encounters between male mice. *Med Sci Res* 1997; 25: 667-669.
42. Mitchell PJ, Redfern PH. Acute and chronic antidepressant drug treatments induce opposite effects in the social behaviour of rats. *J Psychopharmacol* 1992; 6: 241-257.
43. Martín-López M, Navarro JF. Behavioral profile of clobazam in agonistic encounters between male mice. *Med Sci Res* 1996; 24: 89-91.
44. Martín-López M, Navarro JF. Behavioral profile of bentazepam, an anxiolytic benzodiazepine, in agonistic encounters between male mice. *Med Sci Res* 1998; 25: 335-337.
45. Martín-López M, Navarro JF. Efectos de la administración de midazolam sobre la conducta agonística en ratones machos. *Psicothema* 1999; 11: 367-374
46. Martín-López M, Caño A, Navarro JF. Effects of zopiclone on social encounters between male mice. *Med Sci Res* 1994; 22: 729-730.
47. Martín-López M, Navarro JF. Antiaggressive effects of zolpidem and zopiclone in agonistic encounters between male mice. *Aggressive Behav* 2002; 28: 416-425.
48. Julou L, Bardone MC, Blanchard JC, Garret C, Stutzmann JM. Pharmacological studies on zopiclone. *Pharmacology* 1983; 27: 46-58.
49. Ueki S. Behavioral pharmacology of zopiclone. *Sleep* 1987; 10:1-6.
50. Wingrove PB, Safo P, Wheat L, Thompson SA, Wafford KA, Whiting PJ. Mechanism of α subunit selectivity of benzodiazepine pharmacology at γ -aminobutyric acid type A receptors. *Eur J Neurosci* 2002; 14: 31-39.
51. De Almeida RMM, Rowlett JK, Cook JM, Yin W, Miczek KA. GABAA/ α 1 receptor agonists and antagonists: effects on species-typical and heightened aggressive behavior after alcohol self-administration in mice. *Psychopharmacology* 2004; 172: 255-263,
52. Navarro JF, Burón E, Martín-López M. Effects of SB-205384, a positive modulator of α 3-subunit-containing GABA_A receptors, on isolation-induced aggression in male mice. *Psicothema* 2008; 21: 144-147.

53. Meadows HJ, Kumar CS, Pritchett DB, Blackburn TP, Benham CD. SB-205384: A GABA-A receptor modulator with novel mechanism of action that shows subunit selectivity. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 1253-1259
54. Navarro JF, Burón E, Martín-López M. Behavioral profile of L-655,708, a selective ligand for benzodiazepine site of GABA_A receptors which contain the alpha-5 subunit, in social encounters between male mice. *Aggressive Behav* 2004; 30: 319-325.
55. Casula MA, Bromidge FA, Pillai GV, Wingrove PB, Martin K, Seabrook GR, et al. Identification of amino acid residues responsible for the alpha5 subunit binding selectivity of L-655,708, a benzodiazepine binding site ligand at the GABA(A) receptor. *J Neurochem* 2001; 77: 445-451.
56. Brain PF, Kusumorini N, Benton D. "Anxiety" in laboratory rodents: a brief review of some recent behavioural developments. *Behav Processes* 1991; 25: 71-80.
57. DeGroot A, Treit D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience* 2003; 117: 493-501.
58. Mos J, Olivier B, van Der Piel AM. Modulatory actions of benzodiazepine receptor ligands on agonistic behavior. *Physiol Behav* 1987; 41: 265-278.
59. Sulcova A, Krsiak M, Donát P. b-CCE and FG 7142 increase defensiveness during intraspecies encounters in mice. *Psychopharmacology* 1992; 108: 205-209.
60. Beltrán D, Navarro JF. Efectos de la administración de N-metil-beta-carbolina-3-carboxamida sobre la conducta agonística en ratones machos. *Psicothema* 2002; 14: 205-208.
61. DiMascio A. The effects of benzodiazepines on aggression: reduced or increased. *Psychopharmacology* 1973; 30: 95-102
62. Siegel A, Roeling TA, Gregg TR, Kruk MR. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23: 359-389.
63. Hrabovszky E, Halász J, Meelis W, Kruk MR, Liposits ZS, Haller J. Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behaviour: Glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience* 2005; 133: 657-666.
64. Adams DB, Boudreau W, Cowan CW, Kokonowski C, Oberteuffer K, Yohay K. Offense produced by chemical stimulation of the anterior hypothalamus of the rat. *Physiol Behav* 1993; 53: 1127-1132.

65. Roeling TA, Kruk MR, Schuurmans R, Veening JG. Behavioural responses of bicuculline methiodide injections into the ventral hypothalamus of freely moving, socially interacting rats. *Brain Res* 1993; 615: 121–127.
66. Sano K, Yoshioka M, Ogashiwa M, Ishijima B, Ohye C. Posteromedial hypothalamotomy in the treatment of aggressive behaviors. *Conf Neurol* 1966; 27: 164-167.
67. Halász J, Tóth M, Kalló I, Liposits Z, Haller J. The activation of prefrontal cortical neurons in aggression. A double labeling study. *Behav Brain Res* 2006; 175: 166–175.
68. Weerts E, Miller L, Hood K, Miczek K. Increased GABA_A dependent chloride uptake in mice selectively bred for low aggressive behavior. *Psychopharmacology* 1992; 108: 196–204
69. Squires RF, Benson DI, Braestrup C, Coupet J, Klepner CA, Myers V, et al. Some properties of brain specific benzodiazepine receptors: new evidence for multiple receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 10: 825-830.
70. Lewis RT, Blackaby WP, Blackburn T, Jennings ASR, Pike A, Wilson RA, et al. A pyridazine series of $\alpha 2/\alpha 3$ subtype selective GABA-A agonists for the treatment of anxiety. *J Med Chem* 2006; 49: 2600-2610.
71. Licata SC, Rowlett JK. Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA-A receptor modulation and beyond. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 74-89.
72. Mathiasen LS, Mirza NR, Rodgers RJ. Strain-and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-383,417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 19-36.
73. Griebel G, Sanger DJ, Perrault G. Further evidence for differences between non-selective and BZ-1 selective, benzodiazepine receptor ligands in murine models of “state” and “trait” anxiety. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1081-1091.
74. Lippa AS, Coupet J, Greenblatt EM, Klepner CA, Beer B. A synthetic non-benzodiazepine ligand for benzodiazepine receptors: a probe for investigating neuronal substrates of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 11: 99-106.
75. Pellow S, File S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24: 525-529.
76. Basile AA, Lippa AS, Skolnick P. Anxiolytic effects of benzodiazepines: can less be more? *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 441-451.

77. Auta J, Impagnatiello F, Kadriu B, Guidotti A, Costa E. Imidazenil: a low efficacy agonist at $\alpha 1$ -GABAA but high efficacy at alpha5-GABA-A receptors fail to show anticonvulsant cross tolerance to diazepam or zolpidem. *Neuropharmacology* 2008; 55: 148-153.
78. Woods J, Katz J, Winge, G. Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 151-347.
79. Auta J, Giusti P, Guidotti A, Costa E. Imidazenil, a positive allosteric modulator of GABA-A receptors, exhibits low tolerance and dependence liabilities. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 1262-1269.
80. Mirza NR, Nielsen E. Do subtype-selective γ -Aminobutyric AcidA receptor modulators have a reduced propensity to induce physical dependence in mice? *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1378-1385.