



## La conducta de acicalamiento en ratas estresadas y el efecto restaurador de la fluoxetina<sup>1,2</sup>

*Blandina Bernal-Morales<sup>3</sup>*  
*Juan Francisco Rodríguez-Landa*  
*Instituto de Neuroetología*  
*Facultad de Química Farmacéutica Biológica*  
*Universidad Veracruzana*

*Duby Randall Ayala-Saavedra*  
*Olga Lidia Valenzuela-Limón*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*Universidad Veracruzana*

*Gabriel Guillén-Ruiz*  
*Ana Karen Limón-Vázquez*  
*Instituto de Neuroetología*  
*Universidad Veracruzana*

### Resumen

El estrés crónico produce disrupción del acicalamiento y es desconocido si la fluoxetina, a través de su acción antidepresiva, puede restablecer el acicalamiento en sujetos estresados. El objetivo fue analizar el efecto de fluoxetina sobre el autoacicalamiento en ratas macho adultas estresadas crónicamente por restricción de espacio y nado forzado. Tres grupos de ratas recibieron Vehículo (sin restricción, n =10), Vehículo+Restricción de espacio (60 min, n =10) y Fluoxetina+Restricción de espacio (1mg/kg, n = 10) durante 21 días. Todas las ratas fueron forzadas a nadar una vez a la semana por tres semanas. El acicalamiento se registró en campo abierto los días 7, 14 y 21. El análisis estadístico reveló una disminución notable del tiempo de acicalamiento rostral y total, con mayor número de patrones de acicalamiento interrumpidos en las ratas con restricción de espacio ( $p < 0.05$ ). La fluoxetina impidió el efecto del estrés sobre el acicalamiento, alcanzando valores de acicalamiento semejantes al grupo sin restricción de espacio. Se concluye que la fluoxetina ejerce un efecto protector contra los efectos negativos de la restricción de espacio crónica sobre el acicalamiento, lo que podría ser de utilidad para el desarrollo de estrategias de cuidado emocional en animales en cautiverio.

**Palabras clave:** *Acicalamiento, desesperanza, estrés por restricción de espacio, fluoxetina*

<sup>1</sup> La referencia del artículo en la Web es: [https://www.conductual.com/articulos/La conducta de acicalamiento en ratas estresadas y el efecto restaurador de la fluoxetina.pdf](https://www.conductual.com/articulos/La_conducta_de_acicalamiento_en_ratas_estresadas_y_el_efecto_restaurador_de_la_fluoxetina.pdf)

<sup>2</sup> Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente apoyado por el CONACYT (Proyecto Cátedras N°1840 y el Programa de becas de posgrado Reg. 480040).

<sup>3</sup> Correspondencia: Dra. Blandina Bernal-Morales. Dirección postal: Av. Dr. Luis Castelazo s/n, Col. Industrial Ánimas, C.P. 91190 Xalapa-Enríquez, Ver. México. Email: [bbernal@uv.mx](mailto:bbernal@uv.mx)



## Abstract

Chronic stress disrupt grooming-behavior and it is unknown if fluoxetine would restore grooming in stressed subjects through its antidepressant actions. The objective was to analyze the effect of fluoxetine on self-grooming in adult male rats chronically stressed by restraint and forced swimming. Three groups received Vehicle (without restraint,  $n = 10$ ), Vehicle+Restraint (60 min,  $n = 10$ ) and Fluoxetine+Restraint (1mg / kg,  $n = 10$ ) for 21 days. All rats were forced to swim once a week for three weeks. Grooming was recorded in open field test on days 7, 14, and 21. Statistical analysis revealed a notable decrease of rostral and total grooming with higher number of interrupted grooming paths in rats with restraint ( $p < 0.05$ ). Fluoxetine prevented the chronic stress effect reaching grooming values similar to group without restraint. It is concluded that fluoxetine exerts a protective effect against negative effects of chronic restraint on grooming behavior, which might be useful for the development of therapeutic strategies to ameliorate emotional stress of animals in captivity.

**Key words:** *Grooming, despair, restraint stress, fluoxetine*

### La conducta de acicalamiento en ratas estresadas y el efecto restaurador de la fluoxetina

La fluoxetina es un antidepresivo Inhibidor Selectivo de la Recaptura de Serotonina (ISRS) que aumenta la disponibilidad de serotonina en la hendidura sináptica y es uno de los fármacos más recetados para el tratamiento de la depresión y algunos trastornos de ansiedad (Kepser y Homber, 2015). El estrés constante causa vulnerabilidad para el desarrollo de la depresión y otros trastornos neuropsiquiátricos (Holmes, 2008). A nivel preclínico se ha demostrado que el tratamiento con fluoxetina en ratas estresadas por restricción de espacio y ambiente frío, ejerce su efecto antidepresivo al disminuir las concentraciones séricas de corticosterona, las especies reactivas de oxígeno y aumentar las concentraciones de neurotransmisores monoaminérgicos como dopamina, serotonina y norepinefrina lo cual estuvo asociado al mejor desempeño en el aprendizaje de escape (Jayakumar et al., 2017). Además, la fluoxetina regresa a valores fisiológicos la producción excesiva de citocinas proinflamatorias en plasma y cerebro, aumenta la preferencia de sacarosa y disminuye la inmovilidad en la prueba de nado forzado, en ratas sometidas a un modelo de estrés crónico ligero (Lu et al., 2017), lo cual es interpretado como un efecto antidepresivo a nivel experimental. El estudio experimental de la depresión implica el uso de manipulaciones estresantes que inducen conductas que reflejan la falta de motivación y abandono en los sujetos experimentales ante tareas que demandan la búsqueda de una salida o la solución de una situación aversiva como el nado forzado, un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la depresión y el efecto de sustancias con potencial antidepresivo (Contreras, et al., 2003). Es evidente que el estrés crónico disminuye la neurotransmisión serotoninérgica modificando variables fisiológicas y conductuales relacionadas estrechamente con la depresión experimental. No obstante, hay otras conductas que han sido poco estudiadas, tal es el caso de aquellas conductas autodirigidas que se despliegan espontáneamente como el acicalamiento.

El acicalamiento es una conducta dirigida al mantenimiento de la higiene, el cuidado de la salud y el aspecto físico, previene el desarrollo de infecciones y malos olores, elimina ectoparásitos, reduce las infecciones bacterianas asociadas a la lactancia, estimula la curación de heridas y ayuda en la termorregulación y el esparcimiento de secreciones en el pelaje (Kalueff et al., 2010; 2016). En las ratas de laboratorio se despliega un patrón conductual céfalo-caudal, con una serie de movimientos secuenciales,



con un alto nivel de complejidad y organización (Kalueff y Tuohimaa, 2004). Sin embargo, el acicalamiento ante el estrés se altera en forma y cantidad, caracterizado por frecuentes ráfagas de actividad rápida, progresión anormal, desorganizada e interrumpida (Kalueff y Tuohimaa, 2005; Kalueff et al., 2016). Esta conducta disminuye cuando los animales son sometidos a choques eléctricos en las patas, estrés gestacional y/o postparto, estrés por alojamiento en cajas metabólicas, estrés crónico impredecible, el modelo agudo de estrés postraumático o con la administración de corticosterona (Asaloo et al., 2017; Zeni et al., 2017; Boero et al., 2018; Gemmel et al., 2018; Sahin et al., 2018; Van Camp et al., 2018). Por el contrario, el acicalamiento puede aumentar durante la abstinencia a benzodiazepinas, la exposición a choques eléctricos en los bebederos y la deshidratación (Acikmese et al., 2012; Corda et al., 2018; Mitchell et al., 2018). Ante estos hallazgos, se observa que los estresores modifican en diferente dirección el acicalamiento, pero sin duda una modificación en esta conducta puede revelar información valiosa del estado de bienestar del animal dado que se ejecuta en un ambiente libre de estímulos que la desencadenen.

No obstante, se desconoce si la fluoxetina durante su acción antidepresiva, evidente por el aumento de la motivación en situaciones de conflicto, también restablece el acicalamiento en ratas adultas estresadas crónicamente. Por lo tanto, la hipótesis del estudio fue que la administración de fluoxetina previene los cambios en el acicalamiento inducidos por la exposición crónica a estrés en la rata Wistar. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de fluoxetina sobre el acicalamiento en ratas macho adultas estresadas por restricción de espacio y nado forzado. La prueba de nado forzado es ampliamente conocida porque permite evaluar el efecto antidepresivo de sustancias y detectar desesperanza inducida por falta de escape a una situación aversiva, sin embargo, en este estudio se utilizó sólo como un estresor adicional, siendo un desafío para la fluoxetina el poder revertir las alteraciones ocasionadas por un protocolo de estrés crónico intenso (restricción de espacio diaria más nado forzado intermitente). La combinación de estresores continuos e intermitentes es común en animales que viven expuestos a las necesidades de reorganización jerárquica, forrajeo, reproducción y cuidado parental en la naturaleza. Por ello, es pertinente mencionar que las conductas registradas en la presente investigación pueden simular lo que podría acontecer en escenarios reales de cautiverio o semicautiverio.

## Método

### Ética

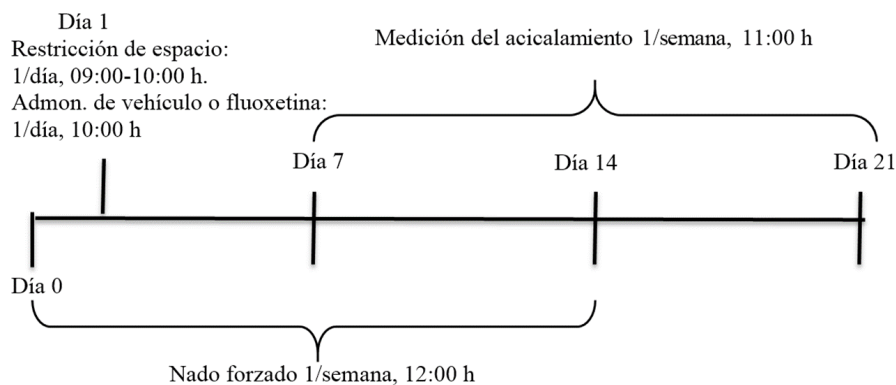
El presente estudio se realizó de acuerdo con los códigos éticos internacionales (*Guide for Care and Use of Laboratory Animals* publicado por el *National Research Council*, No. 85-23, 1999) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. Todas las manipulaciones fueron realizadas evitando el sufrimiento innecesario de los animales. Todas las ratas incluidas en este estudio se alojaron en un bioterio con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas con libre acceso al agua y alimento. Los animales se alojaron en grupos de 5 animales, en cajas de acrílico transparente de 43 cm x 53 cm de base y 20 cm de altura. Las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo entre las 10:00 y 13:00 h del día.

### Grupos experimentales

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de edad que tuvieron un peso entre 180 y 260 g al inicio del experimento y fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos experimentales:



Vehículo (n=10), Vehículo+Restricción de espacio (n=10) o Fluoxetina+Restricción de espacio (n=10). El grupo Fluoxetina+Restricción de espacio recibió 1 mg/kg de fluoxetina, dosis que produce efectos anti-desesperanza (Contreras et al., 2001). Tanto el vehículo (agua purificada) como la fluoxetina fueron administrados por vía oral en un volumen de 2 ml/kg durante 21 días consecutivos. Las ratas fueron pesadas semanalmente para realizar el ajuste correspondiente de la dosis. A las ratas de los grupos Vehículo+Restricción de espacio y Fluoxetina+Restricción de espacio, la administración se les realizó inmediatamente después de ser sometidas individualmente al estrés por restricción de espacio (Hartmann et al., 2019). En la Figura 1 se muestra la línea de tiempo del experimento.



**Figura 1.** Línea de tiempo del experimento.

#### Estrés por restricción de espacio

El estrés por restricción de espacio se aplicó únicamente a los grupos Vehículo+Restricción de espacio y Fluoxetina+Restricción de espacio y consistió en colocar diariamente a las ratas en cajas de acrílico transparente individuales de 16 cm x 7 cm de base y 7 cm de altura durante 60 min, del día 1 al 21 del experimento. Cada sesión de restricción de espacio se realizó antes de la administración de vehículo o fluoxetina. Los sujetos no tuvieron contacto visual con sus conespecíficos (Bernal-Morales et al., 2009; Hartmann et al., 2019). Entre cada sesión, las cajas de restricción de espacio fueron limpiadas con solución de etanol al 15% y se secaron para eliminar cualquier estímulo odorífero, ya que se ha demostrado que los olores de ratas estresadas modifican el comportamiento de otras ratas (Gutiérrez-García et al., 2006).

#### Cuantificación del acicalamiento

Se realizó la sesión de preprueba el día 0 sin valor estadístico. Para evaluar el efecto del estrés y de la fluoxetina sobre el acicalamiento los sujetos fueron colocados en el campo abierto, los días 7, 14 y 21 del experimento, una hora después de la administración de vehículo o fluoxetina. Durante el transcurso de esa hora los animales estuvieron alojados en el cuarto de evaluación conductual. La prueba de campo abierto consistió en colocar individualmente a cada rata en una caja de acrílico opaco (44 cm x 33 cm de base y 20 cm de altura) durante 5 min. En el campo abierto se puede evaluar el componente motor y la exploración de un entorno novedoso producidos por efecto de tratamientos y estresores, al mismo tiempo que permite evaluar conductas motivadas como el acicalamiento (Crawley, 1985). Para propósitos de este



estudio, sólo se evaluaron siete variables de acicalamiento que representan un registro más cercano a la microestructura del acicalamiento (Kalueff et al., 2007) que fueron: latencia y tiempo de acicalamiento rostral, latencia y tiempo de acicalamiento corporal, tiempo total de acicalamiento (suma de tiempo de acicalamiento rostral más tiempo de acicalamiento corporal), frecuencia de patrones de acicalamiento completos y de patrones incompletos. El patrón de acicalamiento se registró siguiendo la descripción de Kalueff y Tuohimaa (2004, 2005) que incluye aquellas conductas de aseo autodirigidas secuenciales iniciando con el movimiento elíptico de amplitud pequeña limitado a las vibrisas de forma unilateral o bilateral, la emisión de giros elípticos amplios de las extremidades anteriores sobre las orejas y la cabeza, el lamido del cuerpo, el lamido de las extremidades posteriores, de la región ano-genital y de la cola. Después de finalizada cada prueba, la caja fue limpiada con solución acuosa de etanol al 15% para eliminar cualquier estímulo odorífero emitido por la rata.

Todas las sesiones de prueba de campo abierto fueron videograbadas (MixMart, Camcorder FHD 1080p, 30FPS, 24 MP) y analizadas posteriormente por dos observadores independientes con un programa elaborado *ex profeso* para el registro de las variables, hasta obtener una concordancia > 95%.

#### Nado forzado

El nado forzado se aplicó a todos los grupos después de la sesión de campo abierto y sirvió como un estresor intermitente, por lo que no fue evaluada la conducta en esta prueba. Consistió en colocar individualmente a las ratas en un estanque rectangular de cristal (34 cm x 51 cm de base y 60 cm de altura), con agua a temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y donde no existía la posibilidad de escape. El nivel de agua fue >20 cm de manera que la rata tocara el fondo de estanque con la cola o la punta de las patas posteriores manteniendo la nariz por arriba del nivel de agua. Los animales fueron sometidos a tres sesiones de estrés por nado; la primera sesión de nado se realizó el día 0 del experimento con duración de 15 min tal como lo establece el fundamento de este modelo de desesperanza (Porsolt et al., 1977). Sesiones posteriores de nado (5 min) se realizaron los días 7, 14 del experimento, inmediatamente después de la prueba de campo abierto donde se evaluó el acicalamiento. Es decir, el efecto sumado de este estrés intermitente por nado se evalúa una semana después de aplicarlo para reducir el efecto agudo del nado. Estas sesiones de nado se realizaron para seguir el protocolo que tenemos de nado forzado semanal en el que el efecto anti-inmovilidad de la fluoxetina aparece gradualmente hasta hacerse significativo el día 14 (Lozano-Hernández et al., 2010; Rodríguez-Landa et al., 2018). Es ampliamente conocido que el nado es una situación estresante en la rata, por ello todos los grupos fueron sometidos al nado, para mantener la uniformidad del estrés por nado forzado y solo comprobar la hipótesis del efecto de la restricción de espacio y el efecto de fluoxetina en el acicalamiento. Considerando que el nado se realizó después del campo abierto, la evaluación del acicalamiento, bajo este protocolo, no tiene el efecto agudo del nado sino de las sesiones de nado de los días anteriores.

#### Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza de dos vías para medidas repetidas, teniendo como primer factor el grupo, con tres niveles (Vehículo, Vehículo+Restricción de espacio y Fluoxetina+Restricción de espacio) y como segundo factor los días de tratamiento en que se realizaron las pruebas, con tres niveles (día 7, día 14 y día 21). Cuando se detectaron valores de



significancia de  $p \leq 0.05$  en el análisis de varianza se utilizó la prueba *post hoc* de Student Newman-Keuls. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de cada variable evaluada.

## Resultados

La rapidez con la que se empezó a desplegar el acicalamiento fue semejante en los tres grupos de estudio, es decir, fue independiente del estrés y del tratamiento con el antidepresivo fluoxetina. Este resultado fue demostrado con el análisis de varianza de dos vías de las variables latencia de acicalamiento rostral y latencia de acicalamiento corporal, ya que no se modificaron estadísticamente por grupo, día de tratamiento, ni interacción de factores (Tabla 1). En cambio, las variables que reflejan la duración y la estructura del acicalamiento se modificaron estadísticamente como se observa en la Tabla 1.

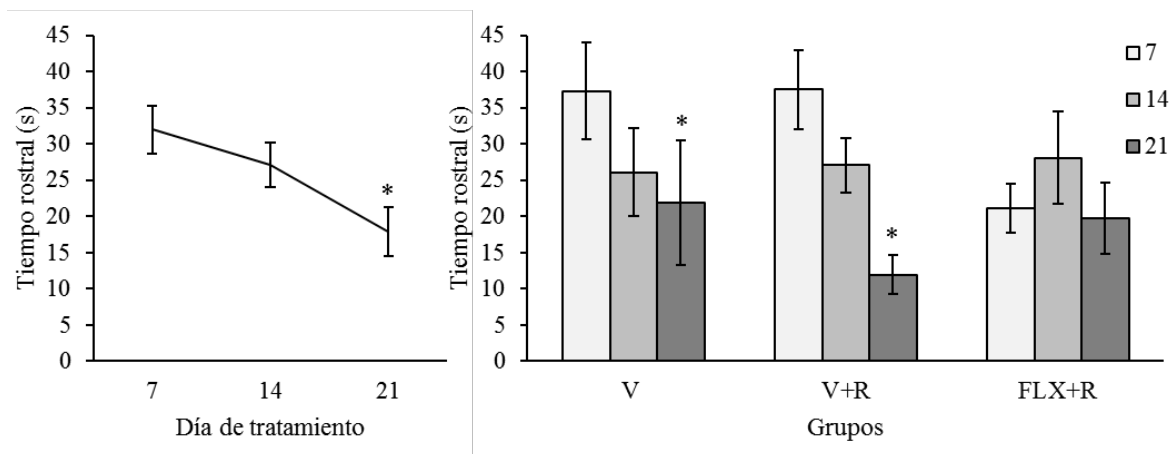
**Tabla 1**

*Resultados estadísticos del análisis de varianza de dos vías para medidas repetidas del acicalamiento en ratas crónicamente estresadas y administradas con fluoxetina.*

Variables	Análisis		
	Factor Grupo	Factor Día	Grupo x Día
Latencia rostral (s)	F <sub>(2,54)</sub> = 2.163, p = 0.135	F <sub>(2,54)</sub> = 0.128, p = 0.881	F <sub>(4,54)</sub> = 0.677, p = 0.611
Latencia corporal (s)	F <sub>(2,54)</sub> = 0.0316, p = 0.969	F <sub>(2,54)</sub> = 0.925, p = 0.403	F <sub>(4,54)</sub> = 1.395, p = 0.248
Tiempo rostral (s)	F <sub>(2,54)</sub> = 0.345, p = 0.712	F <sub>(2,54)</sub> = 10.574, <b>p &lt; 0.001</b>	F <sub>(4,54)</sub> = 3.253, <b>p = 0.018</b>
Tiempo corporal (s)	F <sub>(2,54)</sub> = 0.430, p = 0.655	F <sub>(2,54)</sub> = 2.622, p = 0.082	F <sub>(4,54)</sub> = 1.163, p = 0.337
Tiempo total acicalamiento (s)	F <sub>(2,54)</sub> = 0.400, p = 0.674	F <sub>(2,54)</sub> = 8.576, <b>p &lt; 0.001</b>	F <sub>(4,54)</sub> = 2.643, <b>p = 0.043</b>
Patrones completos (n)	F <sub>(2,54)</sub> = 1.217, p = 0.312	F <sub>(2,54)</sub> = 4.415, <b>p = 0.017</b>	F <sub>(4,54)</sub> = 0.280, p = 0.889
Patrones incompletos (n)	F <sub>(2,54)</sub> = 4.488, <b>p = 0.021</b>	F <sub>(2,54)</sub> = 3.077, p = 0.054	F <sub>(4,54)</sub> = 1.530, p = 0.207

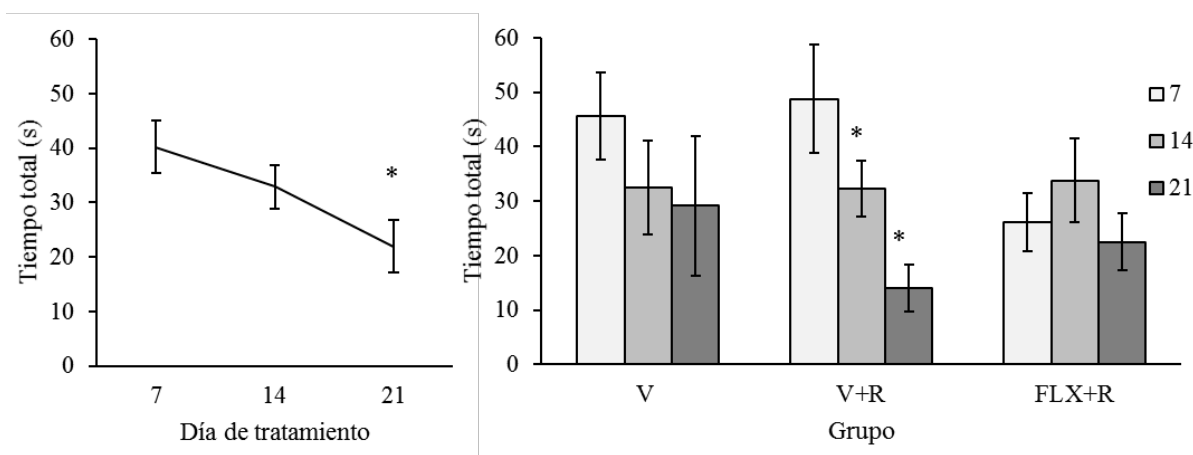
Nota. Ver detalles en el texto.

La variable tiempo de acicalamiento rostral, pero no corporal, mostró diferencias significativas por día de tratamiento y por la interacción de factores. La prueba *post hoc* reveló que el tiempo de acicalamiento rostral disminuyó gradualmente, y esa disminución fue significativa en comparación con los días previos 7 y 14, independientemente del grupo (Figura 2). En la interacción de factores, se observó que el tiempo de acicalamiento rostral en el grupo Vehículo disminuyó en el día 14 y 21 comparado con el día 7. En el caso del grupo Vehículo+Restricción de espacio esta variable presentó el cambio más notable, ya que disminuyó en el último día de prueba comparado con los días previos 7 y 14, alcanzando sólo una tercera parte del valor desplegado en el primer día de prueba (día 7; Figura 2). Este patrón de disminución gradual del acicalamiento rostral a lo largo del experimento como ocurrió en los grupos con vehículo, no se observó en el grupo de Fluoxetina+Restricción de espacio, ya que este acicalamiento fue semejante entre las tres sesiones de prueba.



**Figura 2.** Variable tiempo de acicalamiento rostral. El análisis de varianza mostró reducción del acicalamiento rostral con el transcurso del tiempo y de manera más intensa en el grupo estresado (V+R) que en grupo vehículo (V), sin diferencias en el grupo estresado más fluoxetina (FLX+R) \* $p < 0.05$  vs día 7.

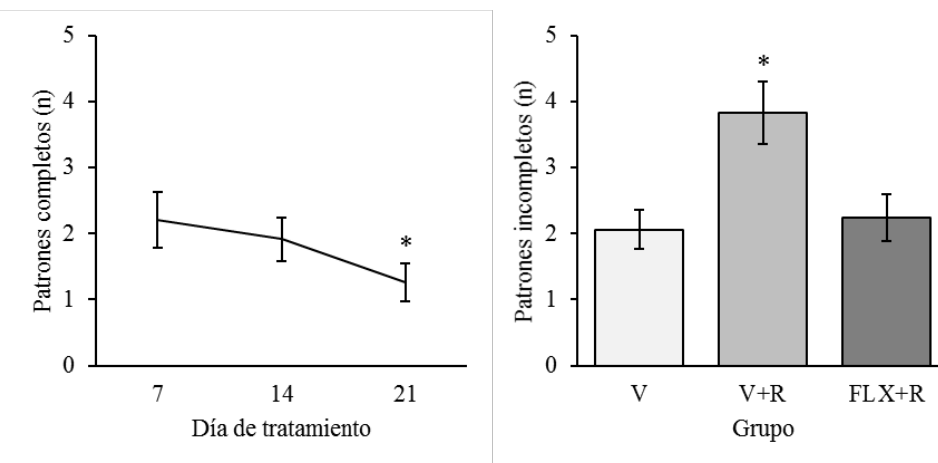
Aunque el acicalamiento corporal no sufrió cambios significativos, el acicalamiento total resultado de sumar el acicalamiento rostral y corporal, mostró cambios semejantes a los del acicalamiento rostral. Es decir, el resultado del tiempo total de acicalamiento se modificó por día y por interacción de factores (Tabla 1). Se puede observar que el acicalamiento total disminuyó significativamente el último día del experimento, aparentemente sin importar el grupo. Pero en el análisis de la interacción de factores se observó que la disminución gradual del tiempo total de acicalamiento sólo se presentó en los dos grupos que recibieron vehículo y que la diferencia estadística únicamente se observó en el grupo Vehículo+Restricción de espacio a partir del día 14 y se redujo hasta casi una quinta parte en el día 21 comparado con el día 7 (Figura 3).



**Figura 3.** Variable tiempo total de acicalamiento. El análisis de varianza mostró reducción del acicalamiento total con el transcurso del tiempo y que sólo se redujo significativamente en el grupo estresado (V+R) pero no en grupo vehículo (V), ni en el grupo estresado más fluoxetina (FLX+R) \* $p < 0.05$  vs día 7.



Al analizar las variables que reflejan la organización del acicalamiento, se observó un cambio sutil pero significativo en el número de patrones de acicalamiento completos, en contraste con el cambio notable en los patrones incompletos de acicalamiento que desplegó el grupo estresado por restricción de espacio comparado con el grupo vehículo sin restricción y el grupo fluoxetina con restricción de espacio. El análisis de varianza de dos vías reveló que el número de patrones completos de acicalamiento se modificó significativamente por día de tratamiento, pero no por grupos, ni por la interacción de factores (Tabla 1). Este cambio consistió en la disminución del número de patrones completos de acicalamiento el día 21 con respecto a los días anteriores (Figura 4), lo cual es consistente con la reducción de los tiempos de acicalamiento descritos anteriormente. Por su parte, el análisis del número de patrones de acicalamiento incompletos mostró una tendencia ( $p < 0.054$ ) a disminuir a lo largo del experimento. No hubo diferencias en la interacción de factores, pero se observa de manera cualitativa que el número de patrones incompletos de acicalamiento se duplicó claramente en cada día de registro en el grupo de Vehículo+Restricción de espacio con respecto a los otros dos grupos. Al comparar por grupos sí hubo diferencias estadísticas (Tabla 1) y éstas consistieron en que en el número de patrones incompletos de acicalamiento en el grupo Vehículo+Restricción de espacio se duplicó significativamente comparado con el grupo que no fue sometido a la restricción ni con el grupo que fue estresado y que recibió el tratamiento con fluoxetina (Figura 4).



**Figura 4.** Patrones completos e incompletos de acicalamiento. El análisis de varianza mostró reducción del número de patrones completos de acicalamiento con el transcurso del tiempo. Sólo el estrés crónico produjo mayor número de patrones incompletos de acicalamiento en el grupo estresado (V+R). La fluoxetina (FLX+R) bloqueó el efecto del estrés. \* $p < 0.05$  vs V y FLX+R.

## Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de la fluoxetina sobre el acicalamiento en ratas macho adultas estresadas crónicamente por restricción de espacio y nado forzado. Los resultados mostraron que se produjo una reducción gradual de la duración del acicalamiento a lo largo del estudio en los grupos con vehículo siendo más notable en el grupo estresado por restricción de espacio. Por su parte, la fluoxetina impidió la disminución del acicalamiento y evitó el incremento de los patrones incompletos del acicalamiento inducido por estrés crónico.





Es ampliamente conocido que los modelos animales relacionados con el estrés, han ayudado a la identificación de mecanismos de acción farmacológica y al descubrimiento de nuevas sustancias con potenciales efectos clínicos (Campos et al, 2013). Así, el empleo de animales de laboratorio para el estudio del estrés es útil para el reanálisis de los fármacos ya existentes como la fluoxetina, empleada en este trabajo. Es decir, no se trató de evaluar el efecto tipo antidepresivo (o incluso ansiolítico) ya conocido de la fluoxetina, sino saber si su administración crónica también modifica los efectos del estrés crónico sobre otras conductas motivadas auto dirigidas como el acicalamiento.

El presente estudio empleó el estresor de nado forzado de manera intermitente porque es un estresor inescapable, independientemente de que la prueba de nado forzado sirva para evaluar conducta de desesperanza o conducta de afrontamiento (Molendijk y de Kloet, 2019). Por su parte, la restricción de espacio ampliamente utilizada en roedores, es un estresor que estimula el sistema autónomo aumentando la presión arterial y la frecuencia cardíaca en la rata (Sikora et al., 2016). Estos dos estresores pueden inducir conductas tipo ansiedad o desesperanza. Los resultados del presente estudio revelaron un impacto sobre otras conductas como el acicalamiento. Estas manipulaciones estresantes pueden arrojar información que complementa el entendimiento de los cambios en la conducta asociada a fármacos.

La latencia al acicalamiento fue la primera variable que se midió y no se modificó entre los grupos, lo que significa que al menos bajo las condiciones del presente estudio, la reactividad de los animales para desplegar el autoacicalamiento no revela información del efecto del estrés o el efecto antidepresivo. El algoritmo de la microestructura del acicalamiento tiene un correlato elevado con las mediciones clásicas de acicalamiento como la latencia, frecuencia y duración (Pires, 2013). En el presente estudio, la hipótesis fue demostrada con las variables frecuencia y duración del acicalamiento independientemente de la latencia, ya que la restricción de espacio diaria durante 21 días sumada con sesiones semanales de estrés por nado forzado, redujeron el acicalamiento evaluado en ratas macho adultas en una prueba de campo abierto breve. Este resultado significa, que la observación del acicalamiento durante 5 min es de utilidad y permitió detectar cambios ante el estrés crónico intenso y coincide con otros autores que han demostrado que ante estresores intensos como los choques eléctricos, la privación de sueño o la inmovilización, el acicalamiento disminuye en duración y se fragmenta en su microestructura (Kalueff y Tuohimaa, 2005; Nin et al., 2012).

El resultado del análisis de varianza en el tiempo de acicalamiento rostral, el tiempo total y el número de patrones completos de acicalamiento por el factor día independientemente del tratamiento, sugiere un efecto de habituación de la conducta de acicalamiento. Se sabe que ante la repetición de la prueba hay posibilidad de habituación locomotriz y que el estrés crónico no impide que se despliegue dicha conducta (Dubovicky y Jezova, 2004). Los resultados del presente estudio también muestran que la habituación ocurrió, pero en la conducta de acicalamiento de los animales estresados, y el estrés más intenso disminuyó aún más el acicalamiento. Esa disminución del acicalamiento sólo en los grupos Vehículo y Vehículo+Restricción de espacio indican la respuesta natural al estrés, las ratas están dejando de lado la conducta autodirigida de atención en su propio cuerpo para atender o estar alertas por el entorno. De estos dos grupos que no recibieron la fluoxetina, la disminución del acicalamiento fue más marcada en el grupo estresado por restricción de espacio y nado que recibió vehículo porque solo se acicaló una tercera parte del valor del primer día de experimentación y el grupo que solo recibió el estrés intermitente del nado disminuyó el acicalamiento un 50%. Estos hallazgos coinciden parcialmente con



animales controles que redujeron su acicalamiento en la segunda prueba de campo abierto con intervalo de 30 días y, por el contrario, aumenta en animales con ambiente enriquecido concluyendo que esta condición ambiental disminuiría la respuesta defensiva (Brenes et al., 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018). Por lo tanto, es consistente que el aumento de la cautividad por la restricción de espacio y la falta de escape en los animales disminuye el tiempo de acicalamiento y aumenta los patrones incompletos de acicalamiento (presente estudio) porque están en un estado de alerta y reactividad máxima. Por otro lado, el ambiente enriquecido incrementa el acicalamiento porque acicalarse no se consideraría un comportamiento similar a la ansiedad, sino que se facilita cuando el desafío de una amenaza ha sido superado (Rojas-Carvajal et al., 2018). Por lo tanto, la fluoxetina a través de sus acciones antidepressivas bloquea el efecto del estrés crónico (presente estudio) y provoca que las ratas no disminuyan su atención en el acicalamiento, que es una conducta que refleja bienestar y hasta puede incrementarse con el mismo régimen de administración (Rodríguez-landa et al., 2018). De hecho, fluoxetina restaura la tasa de habituación perdida en ratas bulbectomizados en campo abierto con iluminación intensa (Mar et al., 2002). Se sugiere por lo tanto, que la fluoxetina no bloqueó el desarrollo de la habituación del acicalamiento, sino que desde la primera prueba con 7 días de tratamiento, la valoración del contexto del campo abierto fue de un ambiente neutro que no representaba peligro y que se mantuvo hasta las tres semanas de tratamiento.

El menor tiempo de acicalamiento producido por la suma de los estresores restricción de espacio y nado forzado, similar a lo reportado con estresores intensos (Kalueff y Tuohimaa, 2005; Nin et al., 2012), no se observó con la administración de fluoxetina. Al parecer el antidepressivo protegió contra los efectos negativos del estrés, manteniendo los tiempos de acicalamiento estables durante los días 7, 14 y 21 en el mismo grupo, en lugar de ser reducidos por efecto del estrés crónico. Al comparar entre grupos, el efecto protector de fluoxetina fue más claro en el número de patrones incompletos de acicalamiento, el antidepressivo bloqueó el incremento del acicalamiento desordenado inducido por el estrés. En otros estudios donde la fluoxetina se ha empleado como el fármaco de referencia en ratas macho adultas, la fluoxetina a la misma dosis de 1 mg/kg aumenta el acicalamiento total entre los días 7, 14 y 21 de tratamiento (Rodríguez-Landa et al., 2018). La diferencia se explicaría porque la aplicación adicional de restricción de espacio diaria podría ser tal que demandaría una mayor dosis para superar el estrés.

La serotonina es un neurotransmisor ampliamente estudiado para comprender su papel en el estrés, puede actuar como un modulador fino o ser notablemente afectado dependiendo de la actividad/nivel de excitación del individuo; los cambios en la serotonina son complejos y los primeros estudios indican que la elevación inducida por el estrés en la síntesis de 5-HT, es un proceso clave contra regulador que permite la homeostasis serotoninérgica y está mediada por mecanismos neuroendocrinos específicos (Chaouloff et al., 1999). Con protocolos de estrés crónico impredecible por 3 a 7 semanas, la actividad de las enzimas monoaminooxidasas aumenta provocando una degradación excesiva de serotonina (Lin et al., 2005; Bhutani et al., 2009) y la consecuente disminución de la actividad serotoninérgica (Bekris et al., 2005). Por su parte, el tratamiento crónico con fluoxetina disminuye las alteraciones de los circuitos neuronales relacionados con el estrés y atenúa la respuesta defensiva del congelamiento (Zienowicz et al., 2007; McMurray et al., 2019), restablece la disminución de serotonina en la corteza cerebral (Sakr et al., 2015) e inhibe la excitación de la alerta y le permite al animal desplegar su repertorio conductual normal a niveles basales, incluida la conducta de acicalamiento (presente estudio). Por lo tanto, el acicalamiento se restableció con fluoxetina, un fármaco que además de producir efecto antidepressivo tiene potencia



ansiolítica, y este cambio en el acicalamiento también se ha observado con fármacos que incluso ejercen sus acciones a través de mecanismos de acción GABAérgica como el clonazepam (Nin et al., 2012).

Una limitación del estudio es que no se evaluó el efecto de la restricción sin nado y de la condición de un grupo intacto, para dimensionar el tamaño del efecto de cada uno de los estresores por separado. Pero el diseño experimental abordado aporta escenarios más probables de experimentar combinaciones de estrés en condiciones más naturales. No se evaluaron otras conductas como ansiedad o desesperanza porque está ampliamente documentado el efecto inductor del estrés sobre ellas. Finalmente, este estudio comprobó el efecto protector de la fluoxetina sobre la conducta del acicalamiento en ratas Wistar macho de dos meses de edad estresadas crónicamente por restricción de espacio y nado forzado. Este hallazgo implica un espectro más amplio de acciones de un antidepresivo de referencia como la fluoxetina en estudios preclínicos, demostrando que puede restablecer conductas disminuidas por efectos del estrés, aunque no se trate de un modelo de depresión experimental. El acicalamiento espontáneo medido en un periodo de observación relativamente corto es sensible al estrés y a fármacos moduladores del estado de ánimo a pesar de su duración y frecuencia inferiores a otras conductas desplegadas en el campo abierto. La contribución de los resultados de este trabajo pudiera tener una aplicación en el desarrollo y evaluación de estrategias que pudieran disminuir los efectos negativos del estrés, particularmente de aquellos individuos que se encuentran en condiciones de restricción de espacio, como ocurre en los animales en cautiverio. Una posibilidad que debe ser evaluada en beneficio del bienestar animal en condiciones de estrés.

## Referencias

- Acikmese, B., Haznedar, S., Hatipoglu, I., & Enginar, N. (2012). Evaluation of anxiolytic effect and withdrawal anxiety in chronic intermittent diazepam treatment in rats. *Behavioural Pharmacology*, 23(2), 215-219.
- Asalgoo, S., Tat, M., Sahraei, H., & Jahromi, G.P. (2017). The psychoactive agent crocin can regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 668.
- Bekris, S., Antoniou, K., Daskas, S., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005). Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behavioural Brain Research*, 161(1), 45-59.
- Bernal-Morales, B., Contreras, C.M., & Cueto, E.J. (2009). Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behavioral Processes*, 82(2), 219 – 222.
- Boero, G., Biggio, F., Pisu, M.G., Locci, V., Porcu, P. & Serra, M. (2018). Combined effect of gestational stress and postpartum stress on maternal care in rats. *Physiology & Behavior*, 184, 172-178.
- Brenes, J.C., Padilla, M., & Fornaguera, J. (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 125-137



- Bhutani, M. K., Bishnoi, M., & Kulkarni, S. K. (2009). Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(1), 39-43.
- Campos, A.C., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., & Guimaraes, F.S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 35(2), S101-S111.
- Chaouloff, F., Berton, O., & Mornède, P. (1999). Serotonin and stress. *Neuropsychopharmacology*, 21(25), 28S-32S.
- Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., Gutiérrez-García, A.G. & Bernal-Morales, B. (2001). The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurons in the rat. *Journal Psychopharmacology*, 15, 231-6.
- Contreras, C.M., Rodríguez-Landa, J.F., Gutiérrez-García, A.G., Bernal-Morales, B., & Saavedra, M. (2003). Estudio experimental de la ansiedad y la depresión. *Ciencia*, 29 – 39.
- Corde, M.G., Piludu, M.A., Sanna, F., Piras, G., Boi, M., Sanna, F. & Giorgi, O. (2018). The Roman high- and low-avoidance rats differ in the sensitivity to shock-induced suppression of drinking and to the anxiogenic effect of pentylenetetrazole. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 167, 29-35.
- Crawley, J.N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9(1), 37-44.
- Dubovicky, M., & Jezova, D. (2004). Effect of chronic emotional stress on habituation processes in open field in adult rats. *Annals New York Academy of Sciences*, 1018, 199-206.
- Gemmel, M., Harmeyer, D., Bögi, E., Fillet, M., Hill, L.A., Hammond, G.L. & Pawluski, J.L. (2018). Perinatal fluoxetine increases hippocampal neurogenesis and reverses the lasting effects of pre-gestational stress on serum corticosterone, but not on maternal behavior, in the rat dam. *Behavioural Brain Research*, 339, 222-231.
- Gutiérrez-García, A.G., Contreras, C.M., Mendoza-López, M.R., Cruz-Sánchez, S., García-Barradas, O., & Rodríguez-Landa, J.F. (2006). A single session of emotional stress produces anxiety in Wistar rats. *Behavioral Brain Research*, 167(1), 30-35.
- Hartmann, A., Fassini, A., Scopinho, A., Correa, F.M., Guimarães, F.S., Lisboa, S.F. & Resstel, L.B. (2019). Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 33(5), 606-614.
- Holmes, A. (2008). Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(7), 1293-1314.
- Jayakumar, S., Raghunath, G., Ilango, S., Vijayakumar, J. & Vijayaraghavan, R. (2017). Effect of Fluoxetine on the hippocampus of Wistar albino rats in cold restraint stress model. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(6), AF01.



- Kalueff, A.V. & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13, 151 – 158.
- Kalueff, A.V. & Tuohimaa, P. (2005). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *European Journal of Pharmacology*, 508, 147 – 153.
- Kalueff, A.V., Aldridge, J.W., LaPorte, J.L., Murphy, D.L., & Tuohimaa, P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nature Protocols*, 2, 2538–2544.
- Kalueff, A.V., LaPorte, J.L. & Bergner, C.L. (2010). *Neurobiology of grooming behavior*. New York: Cambridge University Press.
- Kalueff, A.V., Stewart, A.M. & Song, C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45 – 59.
- Kepser, L.J. & Homberg, J.R. (2015). The neurodevelopmental effects of serotonin: a behavioural perspective. *Behavioural Brain Research*, 277, 3-13.
- Lin, Y. H., Liu, A. H., Xu, Y., Tie, L., Yu, H. M., & Li, X. J. (2005). Effect of chronic unpredictable mild stress on brain–pancreas relative protein in rat brain and pancreas. *Behavioural Brain Research*, 165(1), 63-71.
- Lozano-Hernandez, R., Rodríguez-Landa, J. F., Hernández-Figueroa, J. D., Saavedra, M., Ramos-Morales, F. R., & Cruz-Sánchez, J. S. (2010). Antidepressant-like effects of two commercially available products of *Hypericum perforatum* in the forced swim test: a long-term study. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 131-137.
- Lu, Y., Ho, C. S., Liu, X., Chua, A. N., Wang, W., McIntyre, R. S., & Ho, R. C. (2017). Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. *PloS one*, 12(10), e0186700.
- Mar, A., Spreekmeester, E., & Rochford, J. (2002). Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(3), 703-712.
- McMurray, K.M.J., Strawn, J.R., & Sah, R. (2019). Fluoxetine modulates spontaneous and conditioned behaviors to carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) inhalation and alters forebrain-midbrain neuronal activation. *Neuroscience*, 396, 108-118.
- Mitchell, N.C., Gilman, T.L., Daws, L.C., & Toney, G.M. (2018). High salt intake enhances swim stress-induced PVN vasopressin cell activation and active stress coping. *Psychoneuroendocrinology*, 93, 29-38.
- Molendijk, M.L. & de Kloet, E.R. (2019). Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. *Behavioural Brain Research*, 17(364), 1-10.



- Nin, M.S., Cuoto-Pereira, N.S. & Souza M.F. (2012). Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: Grooming microstructure and elevated plus maze tests. *European Journal of Pharmacology*, 684, 95–101.
- Pires, G.N., Tufik, S., & Andersen, M.L. (2013). Grooming analysis algorithm: Use in the relationship between sleep deprivation and anxiety-like behavior. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 41, 6-10.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *European Journal of Pharmacology*, 51, 291–294.
- Rodríguez-Landa, J.F., Cueto-Escobedo, J., Flores-Aguilar, L.Á., Rosas-Sánchez, G.U., Rovirosa-Hernández, M.D.J., García-Orduña, F., & Carro-Juárez, M. (2018). The aqueous crude extracts of *Montanoa frutescens* and *Montanoa grandiflora* reduce immobility faster than fluoxetine through GABAA receptors in rats forced to swim. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 23, 2515690X18762953.
- Rojas-Carvajal, M., Fornaguera, J., Mora-Gallegos, A., y Brenes, J.C. (2018). Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. *Animal Behaviour*, 137, 225-235.
- Sakr, H. F., Abbas, A. M., Elsamanoudy A. Z., & Ghoneim, F. M. (2015). Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(4), 515-527.
- Sahin, Z., Solak, H., Koc, A., Ozen-Koca, R., Ozkurkculer, A., Cakan, P. & Kelestimur, H. (2018). Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-6.
- Sikora, M., Konopelski, P., Pham, K., Wyczalkowska-Tomasik, A., & Ufnal, M. (2016). Repeated restraint stress produces acute and chronic changes in hemodynamic parameters in rats. *Stress*, 19(6), 621-626.
- Tiddi, B., Aureli, F. y Schino, G. (2012). Grooming up the hierarchy: the exchange of grooming and rank-related benefits in a new world primate. *PLoS One*, 7(5), e36641.
- Van Camp, G., Cigalotti, J., Bouwalerh, H., Mairesse, J., Gatta, E., Palanza, P., & Morley-Fletcher, S. (2018). Consequences of a double hit of stress during the perinatal period and midlife in female rats: Mismatch or cumulative effect? *Psychoneuroendocrinology*, 93, 45-55.
- Zeni, A.L.B., Camargo, A., & Dalmagro, A.P. (2017). Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids*, 125, 131-136.
- Zienowicz, M., Wisłowska-Stanek, A., Lehner, M., Taracha, E., Skórzewska, A., & Bidziński, A. (2007). Fluoxetine attenuates the effects of pentylenetetrazol on rat freezing behavior and c-Fos expression in the dorsomedial periaqueductal gray. *Neuroscience Letters*, 414(3), 252-6.