

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**HABITUACIÓN A LA NOVEDAD Y SU IMPACTO SOBRE EL
DESENCADENAMIENTO DE LA CONDUCTA DE AUTO-
ACICALAMIENTO PRODUCTO DEL ESTRÉS AGUDO**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Cognoscitivas para optar por el grado de Maestría Académica en Ciencias
Cognoscitivas

MIJAIL ROJAS CARVAJAL

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A mi esposa Magally por su apoyo, comprensión y cariño incondicional. A mi madre, por su apoyo constante e incansable durante toda mi formación académica.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi mentor, colega y amigo Juan Carlos Brenes Sáenz por su constante apoyo y motivación a lo largo de los años. Además, agradezco mucho a Andrey Sequeira Cordero por haber sido un segundo mentor a lo largo de mi proceso de tesis. Grandes compañeros y amigos, en las buenas y en las malas. También agradezco a Odir Rodríguez Villagra por su apoyo y colaboración a lo largo de mi maestría, así como a Jaime Fornaguera por el impulso que, de una u otra forma, generó sobre este proyecto.

Finalmente, agradezco muy especialmente a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por haber galardonado a este trabajo de maestría con el Fondo de Apoyo a Trabajos de Posgrado 2019, mismo que permitió el financiamiento parcial del experimento realizado para esta tesis.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Cognoscitivas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Cognoscitivas”

SARA MARIA GONZALEZ CAMACHO (FIRMA) Firmado digitalmente por SARA MARIA GONZALEZ CAMACHO (FIRMA)
Fecha: 2020.09.03 14:24:44 -06'00'

Dra. Sara Gonzáles Camacho
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado
JUAN CARLOS BRENES SAENZ (FIRMA) Firmado digitalmente por JUAN CARLOS BRENES SAENZ (FIRMA)
Fecha: 2020.09.03 12:59:36 -06'00'

Dr. Juan Carlos Brenes Sáenz
Director de Tesis

ODIR RODRIGUEZ VILLAGRA (FIRMA) Firmado digitalmente por ODIR RODRIGUEZ VILLAGRA (FIRMA)
Fecha: 2020.09.03 13:30:04 -06'00'

Dr. Odir Rodríguez Villagra
Asesor

ANDREY SEQUEIRA CORDERO (FIRMA) Firmado digitalmente por ANDREY SEQUEIRA CORDERO (FIRMA)
Fecha: 2020.09.03 11:20:20 -06'00'

Dr. Andrey Sequeira Cordero
Asesor

REBECA MARIA VINDAS SMITH (FIRMA) Firmado digitalmente por REBECA MARIA VINDAS SMITH (FIRMA)
Fecha: 2020.09.03 11:52:22 -06'00'

M.Sc. Rebeca Vindas Smith
Representante del Programa de Posgrado en Ciencias Cognoscitivas

MIJAIL ROJAS CARVAJAL (FIRMA) Digitally signed by MIJAIL ROJAS CARVAJAL (FIRMA)
Date: 2020.09.03 08:19:33 -06'00'

Mijail Rojas Carvajal
Sustentante

Tabla de contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	ii
Hoja de aprobación	iii
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de tablas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas	ix
Introducción	1
Justificación.....	9
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Metodología	13
Evaluación conductual	14
Análisis de datos	19
Hipótesis.....	20
Desarrollo.....	22
Análisis de resultados.....	22
Discusión de los resultados	29
Conclusiones: Reflexión a la luz de las Ciencias Cognoscitivas	35
Apéndice	39
Referencias.....	42

Resumen

La habituación es una forma de aprendizaje no asociativo caracterizada por la reducción progresiva en una conducta producto de la presentación repetida del estímulo que la causa. Utilizando la prueba del campo abierto (CA), se ha observado que las ratas reducen progresivamente su locomoción y exploración vertical a lo largo de una evaluación, así como entre varias evaluaciones. La habituación de estas conductas de exploración y evaluación de riesgo (EER) coocurre con un incremento en secuencias particulares de auto-acicalamiento (AA). Dicho incremento es considerado como una respuesta de estrés, sin embargo, nueva evidencia sugiere que el AA podría actuar como una forma de retrocontrol que regula la magnitud de la respuesta emocional, o “arousal”, en los animales. Para estudiar la relación entre la habituación y el AA, distintos grupos de ratas Wistar macho fueron evaluados en una de las siguientes condiciones: un CA desconocido, un CA al que se han habituado previamente y en su jaula de alojamiento. Puesto que estas condiciones conforman un gradiente de habituación (de menor a mayor familiaridad), se utilizaron con el fin de estudiar cómo la familiaridad del contexto afecta las conductas de los animales. Adicionalmente, la mitad de los animales en cada grupo recibió una descarga eléctrica en sus patas antes de su evaluación. Lo anterior, para incrementar el nivel de estrés e identificar su efecto sobre la conducta en el CA. Se esperaba que la evaluación en ambientes más familiares favoreciera la reducción de las conductas de EER y el incremento de las secuencias complejas de AA. Además, que los animales estresados mostraran una tendencia opuesta: una reducción lenta de las conductas de EER y un menor incremento en las secuencias complejas de AA. Para obtener información adicional sobre el estado emocional de los animales, se evaluó también la emisión espontánea de vocalizaciones ultrasónicas (VUS), mismas que se encuentran relacionadas tanto con estados emocionales negativos (22-kHz) como positivos (50-kHz). Se observó que los choques eléctricos redujeron las secuencias complejas de AA e incrementaron el AA cefálico. Además, el estrés incrementó el estado emocional negativo en los animales, lo cual se observó mediante la reducción de las VUS de 50-kHz y el incremento en las de 22-kHz. Además, se observó una correlación positiva entre las VUS de 50-kHz y las secuencias complejas de AA. Si bien el estudio detallado del AA es necesario para dilucidar con mayor exactitud su asociación con el estrés y el *de-arousal*, el efecto de los tratamientos fue más débil que el esperado. Es posible que el tiempo entre la inducción de estrés y la evaluación conductual haya sido demasiado corto como para que se apreciara de forma robusta un incremento en las respuestas de estrés. Además, es posible que la experiencia en la cámara de choques impidiera la detección de efectos conductuales mayores al inducir una habituación a corto plazo que afectó la evaluación posterior.

Abstract

Habituation is a form of non-associative learning characterized by the progressive reduction of a behavioral response due to the repeated exposure to the eliciting stimuli. By using the open-field test (OF), it has been shown that rodents progressively reduce locomotion and rearing behavior thru single or repeated assessments. The habituation of these behaviors, known as exploratory and risk-assessment behaviors (ERA), cooccur with the increasing of certain grooming subtypes. Such grooming increasing is considered as a stress response, but new evidence suggests that grooming could be part of an arousal inhibiting system helping the animal to reduce emotional excitement. For studying the association between habituation and grooming, footshocked and non-footshocked rats were tested for 20 minutes on one of the following conditions: an unfamiliar open-field test, a familiar open-field test, and an individual home cage filled with bedding. Because such conditions encompass a certain gradient of habituation, they were used for studying how the familiarity with the testing context affected the animal's behavior. Footshocks were administered for assess the effects of increased stress on OF habituation. It was expected that animals tested in the familiar contexts showed a greater reduction of ERA and a greater increasing of complex grooming. Plus, that stressed rats showed the opposite trend: a slow reduction of ERA and leaser increment of complex grooming. For obtaining additional information about animal's inner emotional state, ultrasonic vocalizations (USVs) were also assessed due to their unequivocal association with negative (i.e., 22-kHz) and positive (i.e., 50-kHz) emotionality. It was found that footshocks slightly reduced complex grooming while increased cephalic grooming. Stress also increased negative emotionality as observed in the reduction of 50-kHz USVs and the increasing of the 22-kHz ones. Furthermore, there was a positive correlation between 50-kHz USVs and complex grooming. Altogether, the detailed analysis of grooming seems necessary for elucidating its diverse biological functions. Nevertheless, footshock stress and testing conditions produced weaker-than-expected effects, possibly because the time elapsed between footshocks and behavioral testing was too short for eliciting a full stress response, and because the simple footshock-chamber experience may have impeded detecting stronger effects of familiarity.

Lista de tablas

Tabla	Título	Página
1	Efectos del estrés y las condiciones de evaluación en los subtipos de AA	39
2	Efecto del estrés y las condiciones de evaluación en las VUS de 50-kHz	40
3	Contraste entre la evidencia obtenida y las hipótesis planteadas	41

Lista de figuras

Figura	Título	Página
1	Gráfico ilustrativo de la dinámica de las conductas en el CA	7
2	Diseño experimental y distribución de los grupos	16
3	Análisis detallado del auto acicalamiento y su posible relación con el <i>de-arousal</i> emocional durante la habituación a la novedad	18
4	Cinética y niveles acumulados de la locomoción la frecuencia de exploración vertical	22
5	Cinética de la locomoción y exploración vertical	24
6	Cinética conductual de la frecuencia y duración del AA total	25
7	Distribución del AA por subtipos	26
8	Cinética de las VUS durante las evaluaciones conductuales	28

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AA	Auto-acicalamiento
ANOVA	Análisis de varianza
CA	Prueba del Campo Abierto; animales evaluados en un único Campo Abierto
CA+CA	Animales evaluados en dos Campos Abiertos
Caud	Auto-acicalamiento caudal
Cef	Cefálico: Auto-acicalamiento cefálico
Cef.var	Auto-acicalamiento cefálico con variaciones
CIN	Centro de Investigación en Neurociencias, Universidad de Costa Rica
cm	Centímetros
Cuad.var	Auto-acicalamiento caudal con variaciones
EER	Exploración y evaluación del riesgo
g	Gramos
h	Hora u horas
JI	Jaula individual; animales evaluados en una jaula individual
kHz	Kilohertzio
LEBi	Laboratorio de Ensayos Biológicos, Universidad de Costa Rica
mA	Miliamperios
min	Minuto o minutos
mL	Mililitros
s	Segundos
Sec	Auto-acicalamiento secuencial
Sec.var	Auto-acicalamiento secuencial con variaciones
VUS	Vocalizaciones ultrasónicas



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Mijail Rojas Carvajal, con cédula de identidad 1-1379-0311, en mi condición de autor del TFG titulado Habitación a la novedad y su impacto sobre el desencadenamiento de la conducta de auto-acicalamiento producto del estrés agudo

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Mijail Rojas Carvajal

Número de Carné: A75588 Número de cédula: 1-1379-0311

Correo Electrónico: mijail.rojas.ca@gmail.com

Fecha: 02/09/2020 Número de teléfono: 8567-0334

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Juan Carlos Brenes Sáñez

MIJAIL ROJAS
CARVAJAL
(FIRMA)

Digitally signed by MIJAIL
ROJAS CARVAJAL (FIRMA)
Date: 2020.09.02 14:55:24
-06'00'

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

La habituación es una forma de aprendizaje no asociativo caracterizada por la reducción de respuestas motoras y/o sensoriales producto de la presentación repetida o prolongada del estímulo que las causa (Poon & Young, 2006). Dado que se encuentra presente en organismos de distintos reinos biológicos, la habituación es considerada una de las formas más elementales de aprendizaje y memoria en los seres vivos (Carew, Pinsky & Kandel, 1972; Groves & Thompson, 1970; Poon & Young, 2006; Purves et al., 2008). Su función principal es la de actuar como un mecanismo básico de compuerta atencional para la supresión selectiva de información irrelevante o redundante (Poon & Young, 2006). En este sentido, la habituación suele darse ante estímulos de baja intensidad que no constituyen una amenaza para la preservación de los organismos (Poon & Young, 2006; Rankin et al., 2009). Gracias a esto, el sistema nervioso es capaz de reducir sus recursos orientados hacia estímulos poco informativos.

En roedores, una de las formas más comunes de estudiar la habituación es a través del análisis de las respuestas de EER en el contexto de CA. Típicamente, esta prueba consiste en un cajón cuadrado rodeado por paredes sin salidas, descubierto e iluminado desde la parte superior (Stanford, 2007). Debido a que las ratas y ratones son presa de muchas especies en su hábitat natural, los espacios abiertos, altamente iluminados y sin salidas o escondites representan una gran amenaza. El CA reproduce efectivamente estos estímulos evocando una serie de conductas orientadas a reducir la incertidumbre sobre las posibles fuentes de amenaza (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011; Welker, 1957). En particular, la exposición al CA produce un incremento significativo de la locomoción y la exploración vertical (Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2006; Stanford, 2007). Estas conductas son denominadas como de EER (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011; Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2006), y suelen presentarse principalmente al inicio del CA cuando la incertidumbre respecto a las fuentes y grado de amenaza es mayor (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009). El despliegue de las conductas de EER decae rápida y progresivamente a lo largo de la exposición a la prueba, lo cual es considerado como un proceso a corto plazo de habituación a la novedad (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Welker, 1957). Cuando los animales son expuestos repetidamente al CA, también se observa una reducción de dichas conductas entre evaluaciones, lo que se considera como un proceso de habituación a la novedad, pero en este caso, que ocurre a largo plazo (Mora-Gallegos et al., 2015; Rojas-Carvajal et al., 2016; Rojas-Carvajal et al., 2018). En síntesis, la exposición al CA produce en roedores un incremento de las

conductas de EER, las cuales decaen por habituación tanto dentro de una misma evaluación (ej., en un mismo día) como entre exposiciones a la prueba (ej., entre días o semanas).

A través de la historia evolutiva de los organismos, la selección natural los ha dotado con un repertorio de conductas para responder a distintas fuentes de amenaza, y a las cuales se les conoce como respuestas defensivas (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011). En contextos en donde se posee poca información sobre las características y propiedades del entorno (ej., CA), la extracción de información al tiempo que se despliegan conductas defensivas permite el ajuste –en tiempo real– de los patrones de EER en curso, así como su transición hacia otros patrones más apropiados a las características del contexto (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011). Además de las respuestas conductuales defensivas, la percepción de amenaza generada por el CA pone en marcha una serie de mecanismos fisiológicos que facilitan hacerle frente a dicha amenaza (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011; McEwen & Wingfield, 2003). A este conjunto de mecanismos y procesos psicofisiológicos orientados a restablecer las condiciones óptimas del individuo se les denomina respuestas de estrés (Chrousos, 2009; McEwen & Wingfield, 2003). El estrés genera un gran costo o carga para los individuos, por lo que una respuesta “normal” de este tipo se encuentra acompañada de procesos de retrocontrol fisiológicos y conductuales que protegen al organismo de la acumulación de esta carga (McEwen & Wingfield, 2003). Un ejemplo de este proceso se observa en el CA, en donde el despliegue inicial de conductas de EER se reduce progresivamente gracias a que el grupo de estímulos que desencadenaba estas conductas pierde su valor amenazante (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011; Stanford, 2007). Es decir, las características del contexto pierden su capacidad para seguir evocando conductas de EER producto de la exploración inicial del CA (Blanchard & Blanchard, 2008; Blanchard et al., 2011). Este proceso de habituación permite, en consecuencia, reducir la carga generada por el despliegue de las conductas defensivas sobre el organismo (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018).

Además de los cambios observados en las conductas de EER, ratas y ratones suelen mostrar un incremento progresivo del AA durante el CA. La aparición del AA en contextos de amenaza potencial se explicó originalmente como un fenómeno que ocurre como resultado del conflicto emocional generado por el contexto (Tinbergen, 1952). Se describió que al producirse en los organismos una competencia por el despliegue de conductas que son antagónicas (ej., atacar o huir; explorar o descansar), se emiten por defecto otras conductas que son de alta aparición en la especie particular

(ej., AA en roedores): a estas se les denominó conductas por desplazamiento (Amselme, 2008; Tinbergen, 1953). Sin embargo, esta explicación entró en desuso años más tarde debido a que no detallaba los aspectos neurobiológicos ni cognitivos involucrados (Anselme, 2008). En estudios posteriores, se observó que contextos o situaciones potencialmente amenazantes desencadenaban el AA, razón por la que se le consideró como una respuesta de estrés (Katz & Roth, 1979; Roth & Katz, 1980; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kalueff & Tuohimaa, 2005). Estudios farmacológicos indicaron que la administración de sustancias que imitan la actividad hormonal del estrés (ej., factor liberador de corticotropina, adrenocorticotropina) incrementaban la aparición del AA (Gipsen & Isaacson, 1981; Jolles, Rompa-Barendregt & Gipsen, 1979). Sin embargo, se encontró que la eliminación de la glándula pituitaria (fundamental en la regulación neurofisiológica de la respuesta de estrés) producía poco o ningún cambio en el despliegue del AA (Roth & Katz, 1980). De hecho, la evidencia sugiere que el incremento del AA producto de la manipulación farmacológica de las vías de estrés podría deberse en algunos casos, a efectos locales en regiones del encéfalo no involucradas directamente con la respuesta de estrés (Argiolas et al., 2000; Füzési et al., 2016, Hong et al., 2014; Mu et al., 2020). Como una hipótesis alternativa a la concepción de AA como una respuesta de estrés, se planteó que dicha conducta podría estar involucrada en la regulación de la respuesta emocional en contextos de amenaza potencial (Spruijt, Van Hooff & Gipsen, 1992; Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009). Se ha reportado que la emisión de ciertos tipos de AA requiere que los animales reduzcan las actividades de vigilancia y exploración del contexto (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). Además, nueva evidencia ha señalado que la inducción experimental del AA produce una inhibición del despliegue de distintas conductas defensivas (Füzési et al., 2016; Hu et al., 2015; Mu et al., 2020). En virtud de lo anterior, se ha sugerido la posibilidad de que el AA forme parte de un sistema inhibitorio que favorece la reducción de la activación emocional (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). El grado de activación psicomotora y emocional, o “*arousal*”, se observa en la magnitud de las respuestas conductuales ante estímulos (de aquí en adelante, se utilizará el concepto “*arousal*” en idioma inglés debido a que su traducción al español no refleja con exactitud su significado) (Frijda, 2010). Por tanto, al observarse que el AA podría favorecer la reducción de las conductas de EER, se denominó a esta hipótesis como de reducción de la activación emocional, o de “*de-arousal*” (Spruijt, Van Hooff & Gipsen, 1992; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020; Mu et al., 2020).

Dado que la reducción progresiva de la EER suele coincidir con un incremento del AA, se ha sugerido una fuerte vinculación entre esta conducta y la habituación a la novedad (Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2006; Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016). Gracias a su estudio detallado se ha logrado identificar que el AA que incluye secuencias largas y complejas incrementa gradualmente a lo largo del CA, mientras el AA caracterizado por secuencias cortas dirigidas a la cabeza y las extremidades delanteras tiende a disminuir (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016; 2017; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). Dado que secuencias específicas podrían ser desencadenadas por elementos distintos (Berridge & Wishaw, 1992; Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kalueff & Tuohimaa, 2005; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016; Spruijt, Van Hooff & Gispen, 1992; Mu et al., 2020), se ha sugerido que el AA no debe ser interpretado como una conducta monolítica (Rojas-Carvajal et al., 2018). De hecho, se ha propuesto que el AA dirigido hacia las regiones cefálicas del cuerpo está principalmente relacionado con las respuesta de estrés (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016), mientras que el AA complejo dirigido a las regiones caudales del cuerpo podría estar principalmente relacionado con procesos auto-compensatorios de *de-arousal* emocional (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016; Spruijt, Van Hooff & Gispen, 1992; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). El despliegue de secuencias cortas dirigidas a la región cefálica de los roedores favorece el mantenimiento de los órganos sensoriales libres de obstrucción durante la exploración del contexto y, además, pueden ocurrir de forma concomitante con la EER (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016). En ese sentido, es probable que dichas secuencias estén emparentadas con las respuestas de estrés (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016; Veloso et al., 2016; Estanislau et al., 2019). Por el contrario, el desplegar secuencias largas dirigidas a las regiones caudales del cuerpo implica una reducción importante de la actividad exploratoria en los roedores (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016, Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). Es decir, la exploración es desplazada por la autoestimulación mediante el AA (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016), lo cual podría entenderse también como una forma de retrocontrol.

Estudios recientes han brindado valiosa evidencia respecto la relación antagónica entre el AA y el despliegue de distintas conductas defensivas (Füzesi et al., 2016; Hong et al., 2014). A través de un

modelo denominado “residente/intruso”, la introducción de un ratón “intruso” en la jaula de un ratón “residente” evoca en este último una activación conductual defensiva caracterizada por la emisión de ataques (Hong et al., 2014). Sin embargo, la inducción de AA mediante foto-estimulación intracerebral produce en el animal “residente” una reducción de los ataques contra el “intruso”, lo cual sugiere que el AA tiene un papel importante en la inhibición de conductas defensivas como el ataque a conspecíficos (Hong et al., 2014). Se ha reportado también que, tras un evento de estrés, la inducción de AA mediante foto-estimulación reduce la aparición de conductas de EER en ratones (Füzesi et al., 2016). Además, se encontró que la magnitud en la que dichos animales se auto-acicalaban fue dependiente de la familiaridad con el contexto: los animales evaluados en sus propias jaulas después de ser expuestos a un evento de estrés mostraron mayor AA y menores conductas de EER, mientras que aquellos que fueron evaluados en un CA mostraron una tendencia opuesta (Füzesi et al., 2016). Interesantemente, animales previamente habituados al CA mostraron niveles de AA y de conductas de EER similares a las de los animales evaluados en sus jaulas (Füzesi et al., 2016). Esta evidencia indica que la aparición del AA es dependiente del contexto, y que su efecto antagónico sobre las conductas de EER ocurre principalmente en contextos familiares (Füzesi et al., 2016). Esto refuerza la hipótesis de que el AA actúa como un mecanismo de regulación emocional, y brinda un mayor sustento para afirmar que la seguridad y el grado de habituación al contexto de evaluación influyen en el despliegue del AA (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016; Mu et al., 2020).

En roedores, el uso del CA ha brindado valiosa evidencia para el estudio de la habituación a la novedad (Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2006; Stanford, 2007). Mediante su utilización se ha podido identificar la cinética de las conductas de EER, y se ha brindado información relevante sobre el posible papel del AA en esta prueba (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016). Adicionalmente, el estudio de la dinámica de las conductas defensivas en distintas situaciones de estrés ha aportado evidencia importante para el entendimiento de la aparición del AA en dichos contextos (Füzesi et al., 2016; Hong et al., 2014; Mu et al., 2020). Debido a que esta conducta se utiliza como un parámetro central dentro de múltiples modelos animales, el entender su papel en tanto una forma de retrocontrol y regulación emocional, posee implicaciones importantes para la validez de dichos modelos y respecto a su valor translacional (Fernandez-Teruel & Estanislau, 2016; Kalueff et al., 2015; Song, Berridge & Kalueff, 2016). En este sentido, surgen dos interrogantes de particular relevancia. La primera se refiere al impacto que tienen

la familiaridad y el grado de habituación al contexto de evaluación sobre el despliegue del AA. Es decir, en qué medida el contexto afecta el despliegue del AA. La segunda se refiere al papel del estrés en el despliegue del AA. En particular, cómo el estrés influye en el desencadenamiento de ciertos tipos de AA a lo largo de un periodo de evaluación. Respecto a la primera interrogante, se ha argumentado que, si el contexto influye sobre el AA, debería producirse un cambio en su dinámica a lo largo del CA debido a que la notoriedad del contexto cambia en función de la habituación (Rojas-Carvajal et al., 2018). En pruebas como el CA, la percepción de amenaza es mayor al inicio de la evaluación, por lo que debería observarse una disminución del AA en caso de que este tenga relación con el despliegue defensivo. Por otro lado, el incremento progresivo de la conducta indicaría una mayor relación con procesos posteriores de retrocontrol y auto-regulación emocional (**Figura 1.A**). Una particularidad que aún se encuentra pendiente de estudiar en detalle es si el análisis pormenorizado de las secuencias del AA podría aportar información para entender las distintas interpretaciones que se han realizado sobre esta conducta en distintos modelos experimentales (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). En ese sentido, es posible que, si alguno de los tipos de secuencias desplegadas compite con el despliegue de conductas de EER, se produzca un retrocontrol negativo entre ambas (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). Ahora bien, si algunas secuencias de AA se vieran incrementadas como consecuencia de un nivel incrementado de estrés, estas podrían vincularse principalmente con las respuestas defensivas (**Figura 1.B**; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020).

Una posible estrategia para estudiar cómo el grado de habituación y familiaridad con el contexto de evaluación modifica el despliegue conductual de animales previamente expuestos a un evento de estrés agudo, es manipular los contextos de evaluación para generar un gradiente de habituación. Si en efecto los ambientes más familiares promueven una rápida reducción de las conductas de EER y un incremento de secuencias de secuencias complejas de AA, la evaluación en contextos de mayor a menor familiaridad debería producir un cambio conductual coherente con dicho gradiente. Además, se podría inducir estrés agudo en los animales antes de su evaluación, lo cual facilitaría la discriminación del efecto del estrés sobre el AA (**Figura 1.B**). Dado que la naturaleza amenazante de un evento de estrés agudo (ej., una descarga eléctrica en las patas) posee la misma dirección defensiva de las conductas de EER, se esperaría que el estrés previo al CA produjera un efecto sinérgico. Dicha potenciación debería afectar también la aparición de las secuencias de AA relacionadas con la

activación conductual defensiva, e inhibir o retrasar la aparición de las secuencias relacionadas con el retrocontrol emocional (**Figura 1.B**).

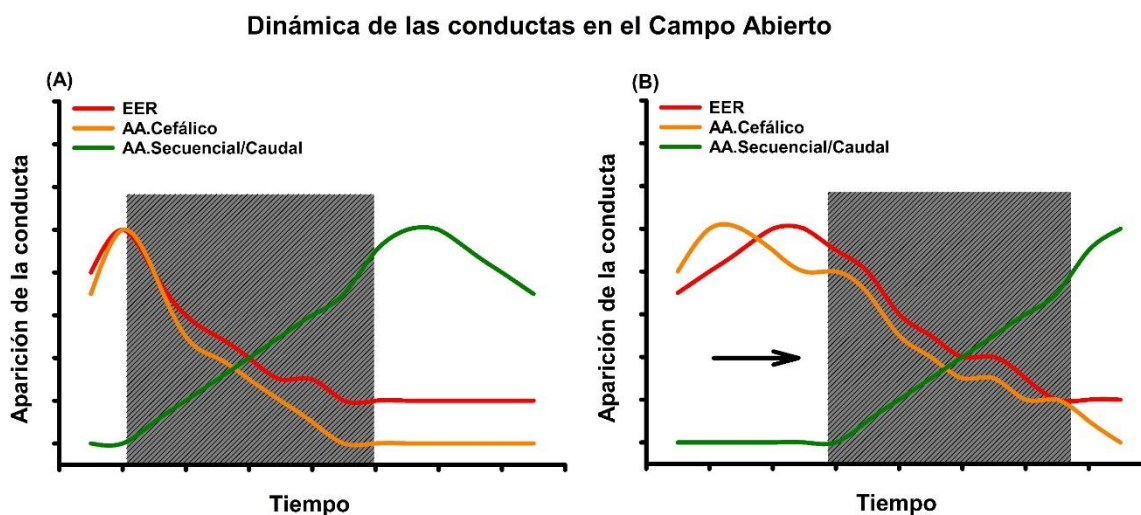


Figura 1. (A) Gráfico ilustrativo de la dinámica de las conductas en el CA generado a partir de la evidencia provista por Brenes, Padilla & Fornaguera (2009), Rojas-Carvajal et al. (2016), Rojas-Carvajal et al. (2018) y Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes (2020). En este gráfico se describe el comportamiento típico de la habituación de las conductas de EER, así como la reducción del AA dirigido a la cabeza y patas delanteras (AA cefálico), y el incremento del AA encadenado dirigido a las regiones caudales del cuerpo (AA secuencial). El área sombreada indica el traslape entre las curvas de incremento y decremento de las conductas, lo cual ilustra cómo la EER es desplazada por el incremento del AA secuencia. (B) Al inducir estrés agudo antes de la evaluación en el CA, se espera un fortalecimiento de las conductas de EER, así como un retraso en la aparición de mecanismos de retrocontrol como el AA. Si por el contrario el AA cefálico se viera fortalecido, esto aportaría evidencia a favor de la disociación del carácter informativo del AA en función de sus subtipos o secuencias. Nota: Para la confección de los gráficos se utilizaron unidades arbitrarias cuya única finalidad es resumir ilustrativamente alguna de la evidencia que antecede la presente propuesta científica.

Con el objetivo de obtener evidencia cualitativa y cuantitativamente distinta sobre los estados emocionales y motivacionales en roedores, ha habido un creciente interés por el estudio de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas (VUS), principalmente en ratas. En el reino animal, múltiples especies

utilizan señales acústicas para la señalización emocional y motivacional tanto de forma intra- (dentro de la misma especie) como hetero-específica (entre distintas especies) (Nyby & Whitney, 1978; Portfors, 2007). En las ratas, las VUS sirven para la señalización de diferentes estados afectivos los cuales pueden variar dependiendo del contexto (Knutson et al., 2002; Jelen et al., 2003; Kim et al., 2010). Animales jóvenes y adultos emiten llamadas de alta frecuencia (denominadas de 50-kHz) durante el juego intra- y hetero-específico (Panksepp & Burgdorf, 2000; Burgdorf et al., 2008), en anticipación a la obtención de una recompensa (Brenes & Schwarting, 2014; Brenes & Schwarting, 2015), durante actividades relacionadas con la cópula (Börner et al., 2016; Burgdorf et al., 2008), así como durante la exploración de contextos familiares y poco familiares (Natusch & Schwarting, 2010; Whör et al., 2008; Brenes et al., 2016). Por otro lado, las llamadas de alarma (denominadas de 22-kHz) se emiten comúnmente ante situaciones aversivas como durante la agresión por un conspecífico (Burgdorf et al., 2008), ante señales olfatorias de un depredador (Litvin et al., 2007), así como producto del estrés social (Kim et al., 2010) y la administración de choques eléctricos en las patas (Borta et al., 2006). Dado que las VUS de 22-kHz indican un estado emocional negativo y las de 50-kHz corresponden a llamadas prosociales emitidas en situaciones emocionalmente neutras o bien asociadas con emocionalidad positiva, la evidencia obtenida de estas señales acústicas contribuye enormemente a la interpretación los efectos del estrés y la habituación a la novedad sobre la emisión del AA.

Justificación

La aparente discrepancia en la identificación de los factores desencadenantes del AA ha generado un gran interés en la comunidad científica, lo cual se ha visto reflejado en los distintos modelos animales que utilizan esta conducta como principal parámetro de análisis (Kalueff et al. 2016). Además de sus implicaciones dentro del estudio del estrés, el AA posee múltiples funciones tales como la limpieza (Amador & Hu, 2015), la termo-regulación (Almeida, Vizin & Carreteiro, 2015; Roberts, 1988; Thiessen, 1988), el manejo del dolor (Spradley, Davoodi, Carstens & Carstens, 2012), y el fortalecimiento de lazos sociales (Carter & Wilkinson, 2015; Seyfarth, 1980). Esto, lejos de ser una desventaja, se traduce en un reto: detallar las condiciones y eventos que desencadenan esta conducta, así como su función particular en el contexto de estudio. La larga trayectoria en la investigación del AA desemboca actualmente en múltiples debates sobre la interpretación de la conducta (Fernandez-Teruel & Estanislau, 2016; Kalueff et al., 2015; Song, Berridge & Kalueff, 2016; Timberge, 1952), lo cual revela con toda claridad que este es un tema cuyo marco de referencia se encuentra aún en construcción. En virtud de lo anterior, surge la importante necesidad de realizar una indagación experimental que permita aportar evidencia sobre los principales factores desencadenantes del AA. Cabe destacar que a pesar de que existen distintas publicaciones que destacan dicha discusión (Fernandez-Teruel & Estanislau, 2016; Kalueff et al., 2015; Song, Berridge & Kalueff, 2016), no existen trabajos recientes orientados a estudiar en detalle las distintas hipótesis entorno a la interpretación del AA (Spruijt, Van Hooff & Gispen, 1992). Por este motivo, la discusión en torno al tema podría enriquecerse mediante un abordaje experimental dirigido sobre hipótesis específicas.

En la actualidad, se ha identificado que en trastornos como el déficit atencional con hiperactividad (Jansiewicz, Newschaffer, Denckla & Mostofsky, 2004; Massa & O'Doskey, 2011; Zhuang et al., 2001), el trastorno obsesivo-compulsivo (Olatunii et al., 2009) y en Trastornos del Espectro Autista (Guiraud et al., 2011; Kohl et al., 2014; Swartz et al., 2013), existe una afectación de la capacidad de habituación. Por ejemplo, se ha observado un déficit en la habituación a la novedad en distintos modelos roedores de Autismo (Schneider & Przewłocki, 2005; Silverman et al., 2010). Además, se ha descrito que los ratones utilizados para modelar dicho trastorno también presentan un patrón anormal de AA (Schneider & Przewłocki, 2005). De hecho, un bajo desempeño en la capacidad de habituación y características anormales de AA convergen en varios de los modelos antes mencionados (Alonso et al., 2015; Kalueff et al., 2016; Taylor et al., 2010), lo cual produce una duda justificada a

la hora de indagar en el tema en términos de su impacto sobre modelos pre-clínicos. En seres humanos, se ha encontrado que pacientes con esquizofrenia poseen una baja capacidad de habituación a estímulos de distintas modalidades sensoriales (Ludweig & Vollenweider, 2002; Ludewig et al., 2002), y que algunos tratamientos con antipsicóticos son capaces de aminorar ese rasgo (Aggneraes et al., 2010; Oranje & Glenthøj, 2012). Dada la heterogeneidad sintomática observada en pacientes con esquizofrenia, se vuelve fundamental ofrecer una mejor descripción de conductas consideradas como endofenotipos tanto en estudios clínicos como pre-clínicos (ej., baja habituación). En ese sentido, este trabajo se orientó al estudio de las implicaciones del AA dentro del proceso de habituación a la novedad en la prueba del CA, lo cual se constituye como un aporte con posibles implicaciones para el estudio de trastornos como la esquizofrenia. Por otro lado, la capacidad de habituación se encuentra involucrada en distintos procesos de aprendizaje asociativo (ej., Singh et al., 2015), y ha sido utilizada para predecir la inteligencia general en infantes (CI; McCall & Carriger, 1993). Producto de esto, su estudio para el entendimiento de distintas deficiencias cognitivas y neuroconductuales es de gran importancia (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016). Sin embargo, a pesar de la aparente relación entre la habituación y el AA, la investigación orientada a indagar el posible papel de las capacidades de aprendizaje no asociativo en la auto-regulación emocional es reducida.

Este trabajo se orienta al estudio de la relación entre el AA y la habituación, así como a la investigación sobre el impacto del estrés sobre el despliegue conductual en el CA. Si bien ya se encuentra tipificado que el proceso de habituación a la novedad se caracteriza por la reducción de las conductas de EER (Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2006; Stanford, 2007), no se tiene claro como este proceso podría facilitar el despliegue de otras conductas compensatorias como el AA. Dado que alguna evidencia indica que el AA aparece conforme las conductas de EER se reducen (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Füzesi et al., 2016), cabe la posibilidad de que el cumplimiento de algunos criterios internos de información en el animal pongan en marcha el despliegue de conductas auto-compensatorias. Es decir, la reducción de la incertidumbre sobre las propiedades del contexto podría desencadenar mecanismos que faciliten la reducción de la actividad emocional incrementada (Rojas-Carvajal et al., 2018). Esto se traduciría en una reducción de las conductas exploratorias y el incremento de otras conductas como el AA. Si bien esta suposición es plausible a la luz de la evidencia actual (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020), el presente trabajo abordó algunos elementos que aún se encontraban

pendientes de ser tratados en detalles. Primero, se analizó cómo los distintos sub-tipos de AA podrían estar relacionados con la habituación de la EER. Luego, se indagó sobre cómo el estrés afecta el despliegue de estas conductas, tomando en consideración la posible modulación del contexto. Finalmente, se analizaron las posibles asociaciones entre el AA y las conductas de EER en función del estrés y del contexto. A partir de la evidencia analizada, es posible decir que los aspectos antes mencionados son de carácter novedoso, así como científicamente pertinentes. Además, producto de la amplia utilización del CA, el AA y la habituación dentro de distintos modelos, los resultados obtenidos a partir de este trabajo tienen el alcance de impactar un rango más amplio de ámbitos de estudios, incluyendo aquellos que se encuentran fuera del ámbito de la investigación básica.

Objetivo general

Examinar el papel de la habituación y familiaridad al contexto de las pruebas (i.e., jaula o campo abierto), en el despliegue conductual evaluado después de un evento de estrés agudo.

Objetivos específicos

1. Describir la manera en la que el estrés agudo modifica el proceso de habituación de la locomoción y la exploración vertical desplegados en contextos con distintos gradientes de habituación y familiaridad.
2. Examinar el papel del contexto de evaluación y el estrés agudo en el despliegue de los distintos sub-tipos de AA.
3. Estudiar la posible asociación entre la locomoción, la exploración vertical y distintos subtipos de AA.

Metodología

Sujetos: Se utilizaron 54 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de ~250 g a la llegada al Centro de Investigación en Neurociencias (CIN), lugar donde se ejecutó el experimento. Los animales fueron provistos por el Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) de la Universidad de Costa Rica (CICUA-047-17).

Condiciones de alojamiento: Todos los animales fueron alojados bajo un ciclo luz- oscuridad 12:12 horas (se encienden luces a las 6 h), con acceso libre al alimento y al agua. Todas las jaulas fueron cambiadas y rellenas con burucha de madera (5000 mL, LEBi) dos veces por semana, y se llevó un control semanal del peso de los animales durante todo el periodo de alojamiento en el CIN. En el LEBi, los animales se alojaron con sus hermanos desde el destete (DPN-21) en jaulas de alojamiento estándar (plexiglás transparente; 56 x 35 x 20 cm) con un máximo de 5 animales por jaula. Las mismas condiciones de alojamiento se mantuvieron a lo largo del experimento excepto cuando los procedimientos requirieron de su modificación.

Procedimientos generales: A su llegada al CIN, se colocó a los animales en un cuarto ventilado por un lapso de 1 h. Durante ese periodo, no se les realizó ningún tipo de procedimiento con el fin de permitirles una breve recuperación tras el transporte. Posteriormente, las ratas fueron marcadas para su identificación, pesadas y trasladadas al bioterio.

Para su distribución en los grupos experimentales, se evaluó a los animales en una prueba de actividad espontánea (modificado de Brenes et al., 2016; Rojas-Carvajal, Quesada-Yamasaki & Brenes, en preparación). Esta prueba consistió en exponer a los animales a una jaula de alojamiento individual (plexiglás transparente; 38 x 19 x 22 cm) con burucha (1000 mL) durante 5 min. La jaula se iluminó con luz blanca a 8-10 lúmenes, y la actividad de los animales fue grabada con cámaras digitales (GoPro, CA, EEUU) desde un costado (~40 cm). Se utilizó la actividad locomotora (evaluada automáticamente por Any Maze, Stoelting, IL, EEUU), así como la exploración vertical, el AA y las VUS (evaluadas manualmente) para contrabalancear los grupos según el grado de reactividad inducido por la manipulación y la primera exposición al cuarto de experimentación. La asignación y balanceo de los grupos se realizó a partir del criterio de que en los promedios y en los mínimos y máximos de las cuatro variables (ej., distancia, exploración vertical, AA y VUS) no existiera una diferencia superior al 5%. Además, se redujo al mínimo el número de hermanos asignados a cada

condición experimental y se controló el peso promedio de los animales por cada una de estas condiciones.

Grupos: Con el propósito de estudiar cómo el grado de habituación al contexto de evaluación modifica el AA emitido tras un evento de estrés agudo, los animales fueron asignados a tres grupos según sus condiciones de evaluación: contexto novedoso después del estrés, contexto pre-habituado después del estrés y contexto familiar después del estrés (**Figura 2**). Los animales del grupo “(1) Contexto novedoso” fueron evaluados en el CA después del evento de estrés agudo y sin ninguna experiencia previa en dicho contexto. Los animales de este grupo desconocen las características de la prueba, por lo que el proceso de habituación a la novedad tendrá lugar justo después de haber sido expuestos a un evento de estrés agudo. Los animales del grupo “(2) Contexto pre-habituado” fueron expuestos al CA durante 30min 24h antes de la evaluación, la cual se realizó en esos mismos CA después del evento de estrés agudo. Los elementos del contexto de evaluación son novedosos, sin embargo, se esperaba que la exposición previa al CA brindara a los animales un mayor grado de habituación a ese entorno. Los animales del grupo “(3) Contexto familiar” fueron colocados en jaulas de alojamiento individual 24h antes de la evaluación. Posteriormente, fueron evaluados en sus mismas jaulas individuales (JI) después de experimentar el evento de estrés agudo. Estos animales fueron evaluados bajo dichas condiciones debido a que los elementos presentes en las JI (ej., burucha, forma de la jaula, olor) también se encuentran presentes en sus jaulas de vivienda, razón por la que se encuentran fuertemente asociados con mayor seguridad y protección. Cada grupo contó con su respectivo grupo control, el cual fue sometido exactamente al mismo procedimiento, pero sin recibir ninguna descarga eléctrica (sin estrés agudo): “Contexto novedoso sin estrés”, “Contexto pre-habituado sin estrés” y “Contexto familiar sin estrés”. Se utilizarán 9 animales por grupo (**Figura 2**).

Evaluación conductual

Procedimientos generales: Las evaluaciones conductuales iniciaron una semana después de la llegada de los animales al CIN. Para su traslado, las ratas se colocaron individualmente en jaulas de transporte (1000 mL de burucha) ~2 min antes de ser llevadas al cuarto donde se administró el procedimiento de estrés agudo.

Procedimiento de estrés agudo: Para inducir estrés, los animales se colocaron individualmente en una cámara de condicionamiento (Automatic Reflex Chamber, Ugo Basile, VA, Italia), la cual se

encontraba en un cuarto adyacente al cuarto de experimentación. En dicha cámara, los animales recibieron tres descargas eléctricas de 0.8 mA en sus patas, con una duración de 1 s y con un intervalo entre choques de 5 s. Después de la última descarga, los animales permanecieron 120 s en la cámara de condicionamiento. Luego, fueron colocados en sus jaulas de transporte para ser llevados al cuarto de experimentación. Después de 60 s de espera en esas jaulas, los animales se colocaron en los distintos contextos de evaluación durante 20 min. La cámara de condicionamiento fue desinfectada con etanol (70%) después de cada prueba. Todos los animales fueron expuestos a todos los procedimientos relacionados con la exposición a la cámara de condicionamiento, independientemente de si reciben o no la descarga eléctrica en las patas.

Prueba de Campo Abierto: Solo los animales pertenecientes al grupo de Contexto pre-habituado después del estrés, Contexto novedoso después del estrés, Contexto pre-habituado sin estrés, y Contexto novedoso sin estrés, fueron evaluados en el CA. El CA consiste en una caja de 55 x 55 x 40 cm, recubierta con melamina negra y con la cara superior descubierta para la colocación del animal y la grabación de las conductas. Los CA se iluminaron con luz blanca de entre 8-10 lúmenes. Las conductas fueron grabadas desde la parte superior (1.4 m) mediante cámaras digitales (GoPro, CA, EEUU) para su posterior análisis. La prueba dio inicio al colocar al animal en el centro del aparato, donde se le dejó explorar libremente durante 20 min. En esta prueba se evaluó la locomoción de forma automática (Any Maze; Stoelting, IL, EEUU), mientras que la exploración vertical y el AA se evaluaron de forma manual (ver Análisis conductual del Auto-acicalamiento). A partir de esta prueba se evaluó la habituación de la locomoción y la exploración vertical, así como el AA.

Cage-test: Solo los animales del grupo (1) Contexto familiar después del estrés y (4) Contexto familiar sin estrés fueron evaluados en esta prueba. Las jaulas utilizadas para su evaluación fueron las mismas en las que permanecieron de forma individual durante las ~24 h previas a la evaluación (plexiglás transparente; 38 x 19 x 22 cm). La prueba tuvo una duración de 20 min. Se utilizó una iluminación de 8-10 lúmenes de luz blanca dentro de la jaula. La actividad de los animales fue grabada con cámaras digitales (GoPro, CA, EEUU) desde un costado (~40 cm) para su posterior análisis. Se evaluaron las mismas conductas que las descritas para el CA.

Grupos de evaluación (n= 18 por grupo)	Condiciones de pre-evaluación	Día de evaluación	
		Sesión de choques eléctricos (n= 9 por grupo)	Evaluación Duración: 20 minutos
CA		No estresados Estresados	CA
CA+CA	CA Duración: 30 minutos	No estresados Estresados	CA
Jl	Alojamiento individual Duración: 24 horas	No estresados Estresados	Jl

Intervalo
●
●
24 horas
1 minuto

Figura 2. Diseño experimental y distribución de los grupos. Los animales fueron divididos en tres grupos: (1) aquellos evaluados por una única vez en un campo CA, (2) aquellos evaluados en un CA tras una experiencia previa (30 minutos) en esa prueba 24 h antes (CA+CA), y (3) aquellos evaluados en una jaula individual (JI) después de haber sido alojados durante 24 h en esa misma jaula. La mitad de los animales en cada uno de los grupos fue expuesta a tres choques eléctricos antes de la evaluación.

Análisis conductual: La evaluación de la locomoción se realizó de forma automática mediante el programa especializado Any Maze (Stoelting, IL, EEUU). El análisis de la conducta de exploración vertical se realizó de forma manual. Para ello, se consideró como exploración vertical toda conducta en la que el animal tomó una postura bípeda con el torso en posición $\geq 45^\circ$. Se contabilizó dicha conducta tanto si el animal la ejecutó apoyado contra las paredes del aparato o bien, si lo hizo de forma libre. La conducta de AA fue analizada en detalle a partir del protocolo descrito por Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes (2020). A continuación, se describe brevemente el método de análisis.

Auto-acicalamiento: Para ambas pruebas se utilizaron los siguientes parámetros de evaluación. El AA consistió en toda aquella conducta en la que el animal se lamiera cualquier parte de su cuerpo, así como los casos en los que utilizara cualquiera de sus extremidades para rascarse y luego lamerse la pata con la que se rascó. Cuando el animal se rascó, pero sin lamerse la pata, esto fue considerado

como una conducta de rascado. Basado en estos parámetros, el AA se clasificó de la siguiente forma (**Figura 3**):

- Cefálico (1.1-1.3): El animal se frota y chupa sus patas delanteras, y luego las utiliza para limpiarse el morro, la cabeza y las orejas. Eventos de micro AA en los que el animal se frota rápidamente sus patas delanteras se incluyen dentro de esta categoría.
- Cefálico con variaciones (3.1-3.2): Incluye lo observado en el AA cefálico en conjunto con alguna de las siguientes variantes: (1) Se rasca la cabeza con las patas traseras y se las chupa; (2) se rasca la cabeza con las patas traseras y no se las chupa.
- Caudal (2.1; 2.2): Corresponde al lamido de alguna parte del torso, incluyendo el lomo, el pecho, el abdomen, los costados, el ano, los genitales, la cola y los muslos traseros.
- Caudal con variaciones (4.1-4.2): Incluye lo observado en el AA caudal en conjunto con alguna de las siguientes variantes: (1) se rasca el cuerpo con las patas traseras y se las chupa; (2) se rasca el cuerpo con las patas traseras y no se las chupa.
- Secuencial (1.1-2.2): Constituye un evento de AA donde exista una transición entre un evento cefálico y un evento caudal.
- Secuencial con variaciones (1.1-4.2): Incluye eventos de AA cefálico con o sin variaciones en donde se rasque el cuerpo con las patas traseras, ya sea que las chupe o no.
- Rascado (3.1; 4.1): El animal se rasca la cabeza y/o el cuerpo de forma aislada y sin chuparse la pata con que se rascó. Al ser considerado como rascado y no como AA, no se incluyó en el análisis.

Dicho sistema de clasificación permite identificar los cambios en la sintaxis del AA. Los componentes cefálicos de esta conducta han sido relacionados principalmente con las respuestas defensivas, mientras que los eventos caudales se han relacionado con procesos de *de-arousal* emocional (Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). Por ello, se prestó especial atención a dichos subtipos de AA. En virtud de lo anterior, y dado que el grado de flexibilidad en el despliegue de estos patrones motores complejos se ha vinculado con distintas habilidades de regulación emocional (Kalueff et al., 2016), la utilización de métodos de clasificación conductual con alto nivel de detalle ofrece un importante medio para entender el involucramiento de los distintos subcomponentes del AA en los constructos teóricos a los que se les asocia.

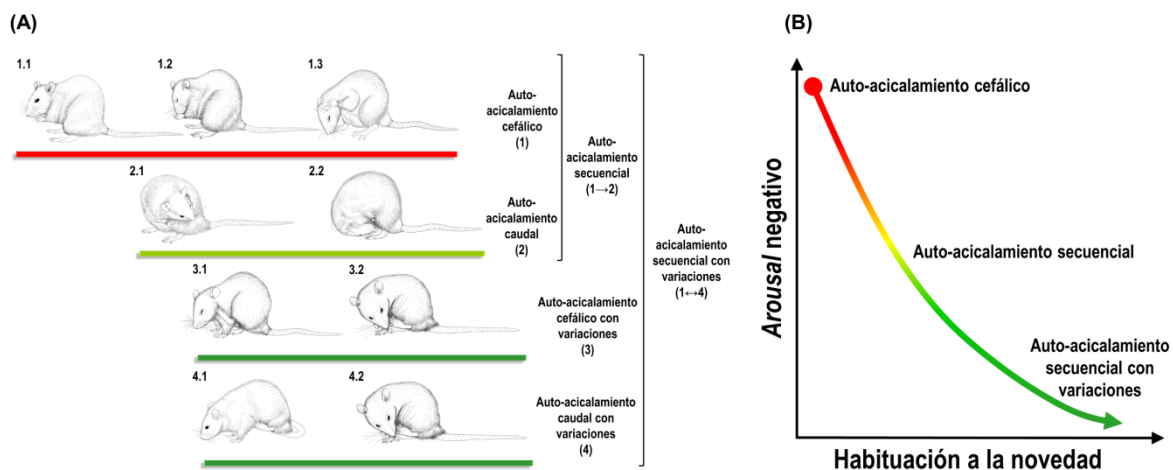


Figura 3. Análisis detallado del auto-acicalamiento (A) y su posible relación con el *de-arousal* emocional durante la habituación a la novedad (B). Las secuencias dirigidas a la cabeza (A1.1-3) son emitidas durante las fases iniciales de exploración. Gradualmente, tanto las secuencias céfálicas como caudales (A1-2) se complejizan producto de la incorporación de las patas traseras dentro de dichas secuencias motoras (A3-4). El AA secuencial (A1-2) consiste en secuencias céfálicas y caudales encadenadas. Por lo tanto, el AA secuencial, así como aquellas secuencias que incluyen variaciones (A1-4), comienzan a emerger durante las fases más tardías del proceso de exploración y conforme el proceso de habituación toma lugar (B). Dado que el AA es una conducta autodirigida, esta debe cumplir un propósito diferente al de la exploración y la recopilación de información sobre posibles fuentes de amenaza. Esta función parece ser tan esencial para las ratas que el AA es emitido a pesar de que compite con la emisión de conductas de EER durante situación de estrés. Por tanto, se propone que el AA forma parte de un sistema de inhibición de la activación emocional negativa que facilita la transición desde estados emocionales defensivos hacia estados emocionales no defensivos (Brenes et al., 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Spruijt et al., 1992; Rojas-Carvajal & Brenes, 2020; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020). Notas: Las barras de colores debajo de los subtipos de AA en A corresponden con el curso hipotético que siguen en B.

Análisis de las Vocalizaciones Ultrasónicas (VUS): Las VUS fueron monitoreadas mediante micrófonos condensadores UltraSoundGate (CM16; Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) y grabadas con el software Avisoft Recorder 2.7 (tasa de muestreo: 214, 285 Hz; formato: 16 bit). Se obtuvieron espectrogramas de alta resolución (resolución de la frecuencia: 0.488 kHz, resolución del

tiempo: 0.512 ms) se obtuvieron mediante una transformación rápida de Fourier (512 FFT-longitud, marco del 100%, ventana de Hamming, 75% de traslape de la ventana de tiempo) y mediante el software Avisoft SASLabPro 5.2. En primer lugar, las VUS fueron detectadas automáticamente mediante la utilización de la función “rastreo de trinos” del Avisoft SASLabPro, ajustando la duración mínima, el tiempo de espera y la amplitud de los picos. Las VUS emitidas en un rango de frecuencia de los 19-32 kHz fueron categorizadas como de 22-kHz, mientras que aquellas emitidas en el rango de los 33-96 kHz fueron definidas como de 50-kHz (Brenes et al., 2016). Este último tipo de VUS también fue filtrado y seleccionado manualmente a partir de protocolos reportados previamente (Brenes & Schwarting, 2015; Brenes et al., 2016). Además, las VUS de 50-kHz también fueron analizadas según su nivel de modulación y clasificadas en los siguientes subtipos: (1) vocalizaciones planas, (2) vocalizaciones planas y escalonadas, (3) trinos simples, y (4) trinos escalonados. Debido a que la tasa de VUS fue muy variable entre animales, se seleccionó el minuto con el mayor número de llamadas por animal para realizar dicha clasificación.

Análisis de datos

Todos los análisis se realizaron mediante el programa IBM SPSS v20 (IBM, EEUU). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para el análisis minuto a minuto de la locomoción, a frecuencia de exploración vertical y la duración total del AA evaluado en la preexposición al CA del grupo CA+CA, utilizando los Minuto como factor intra-sujeto (1-30). Los primeros 20 minutos de esas variables se sumaron para luego ser comparadas con los puntajes acumulados durante la sesión de evaluación mediante un ANOVA mixto, con Estrés (estresados y no estresados) como factor entre grupos, y CA (preexposición al CA y CA de evaluación) como factor intra-grupo. La locomoción, exploración vertical, AA y VUS medidas durante la evaluación se analizaron mediante ANOVAs factoriales mixtos, utilizando la Condición de Evaluación (CA, CA+CA y JI) y Estrés (estresados y no estresados) como factores entre grupos. Debido a que alguna evidencia en roedores sugiere que los animales escalan su nivel de actividad de acuerdo con el tamaño de la prueba en la que se evalúan (Eilam, 2003; Eilam et al., 2003), se aplicó una corrección a la distancia acumulada por el grupo de JI mediante la multiplicación de dicha distancia por la razón del área del CA/JI ($[\text{área del CA (3025 m}^2) / \text{área de la JI (825 m}^2) = 3.67]$ x distancia total acumulada por los animales JI). A pesar de que no existe una solución convencional para homogenizar las diferencias en la actividad desplegada en pruebas con distintos tamaños, se implementó esta

corrección con el objetivo de realizar una comparación más justa entre las condiciones de prueba. A pesar de esto, tanto los datos originales como los corregidos son presentados en los gráficos y análisis. La duración de la exploración vertical fue excluida del análisis debido a que los animales tendieron a sostenerse de la rejilla que cubría la JI, lo que causó una sobreestimación de la duración de la conducta en esos animales. Además, se realizó un ANOVA de tres vías sobre los puntajes acumulados del AA, utilizando las Condiciones de evaluación, Estrés y los Subtipos de AA como factores entre grupos (**Tabla 1**). Los puntajes acumulados de las variables fueron analizados mediante ANOVAs de dos vías, utilizando las Condiciones de Evaluación y Estrés como factores entre sujetos. Adicionalmente, se computó la variable de AA complejo mediante la sumatoria de los puntajes de todas las variaciones de AA cefálico, caudal y secuencial, y se analizó mediante un ANOVA de una vía utilizando Estrés como factor entre sujetos. Cuando fue requerido, se utilizó el ajuste de Bonferroni a las comparaciones por pares. El tamaño del efecto fue estimado mediante el coeficiente de eta parcial cuadrado (η^2_p). Finalmente, para estudiar la asociación entre los parámetros conductuales, se realizaron análisis de correlación de Pearson de una cola sobre los puntajes acumulados. Debido al mal funcionamiento de las cámaras, los datos de tres animales pertenecientes a distintos grupos se perdieron parcialmente. Sin embargo, los puntajes acumulados de esos animales fueron calculados de forma automática mediante el método de Imputación Múltiple del IBM SPSS. Por dicha razón, se observa una discordancia entre los grados de libertad entre los análisis correspondientes a los puntajes acumulados y aquellos minutos por minuto. La significancia estadística fue definida como $P < 0.05$.

Hipótesis

Esta investigación se orientó a estudiar la relación entre el AA y la habituación, así como a indagar el impacto del estrés sobre el despliegue conductual en el CA. Originalmente, se propusieron las siguientes hipótesis: (H1) Las secuencias cortas dirigidas a la cabeza y las extremidades delanteras aparecerían en conjunto con las conductas de EER, mientras que el incremento de las secuencias complejas de AA correspondería con la reducción de las conductas de EER. Respecto a la influencia del contexto sobre el despliegue conductual, se esperaba que (H2) el grado de habituación o familiaridad con el contexto facilitara la reducción de las conductas de EER, así como el incremento de las secuencias complejas de AA. A partir de dicha hipótesis se desprendió que: (H3) Después de un evento de estrés agudo, los animales evaluados en contextos familiares o a los que se les ha habituado previamente, desplegarían niveles de EER menores que los de las ratas evaluadas en un

contexto novedoso. Finalmente, (H4) los animales evaluados en ambientes en los que había una menor incertidumbre sobre una amenaza potencial mostrarían un incremento en las secuencias complejas de AA. Posteriormente, se especificaron las siguientes hipótesis: (H3.1) que la inducción de estrés generaría un incremento en las secuencias cortas dirigidas a la cabeza y (H3.2) que las secuencias complejas de AA se verían inhibidas por el estrés. Dado que durante las pruebas conductuales también se evaluó la emisión de VUS, se establecieron las siguientes hipótesis: (H5) que el estrés suprimiría la emisión de vocalizaciones prosociales de 50-kHz y que (H6) favorecería las vocalizaciones de alarma de 22-kHz. Además, (H7) que la emisión de vocalizaciones de 50-kHz se vería potenciada en los ambientes más familiares, mientras que (H8) las vocalizaciones de 22-kHz se vería incrementadas en los ambientes menos familiares.

Desarrollo

Análisis de resultados

1. La habituación de las conductas de EER observada a lo largo de la preexposición al CA no produjo una habituación entre las pruebas en los animales CA+CA

Durante la preexposición al CA, los animales CA+CA mostraron una reducción progresiva de la locomoción (Minutos: $F(29, 493)=25.78$, $P<.001$, $\eta^2_p =.60$) y la frecuencia de exploración vertical (Minutos: $F(29, 493)=8.24$, $P<.001$, $\eta^2_p=.33$) a lo largo de los minutos de evaluación, lo que muestra la ocurrencia de la habituación a lo largo de la prueba (**Figura 4A, 4C**). Por el contrario, el AA total incrementó a lo largo de los minutos, mostrando un patrón irregular caracterizado por tres picos de mayor actividad, de los cuales el primero fue el más prolongado con un crecimiento gradual del minuto 1 al 12 (Minutos: $F(29,493)=2.35$, $P<.05$, $\eta^2_p =.12$) (**Figura 4E**). También se analizó la habituación entre las evaluaciones comparando los primeros 20 min de la preexposición al CA con los puntajes acumulados durante el CA de evaluación, sin que se observara ninguna diferencia significativa (**Figura 4B, 4D, 4F**).

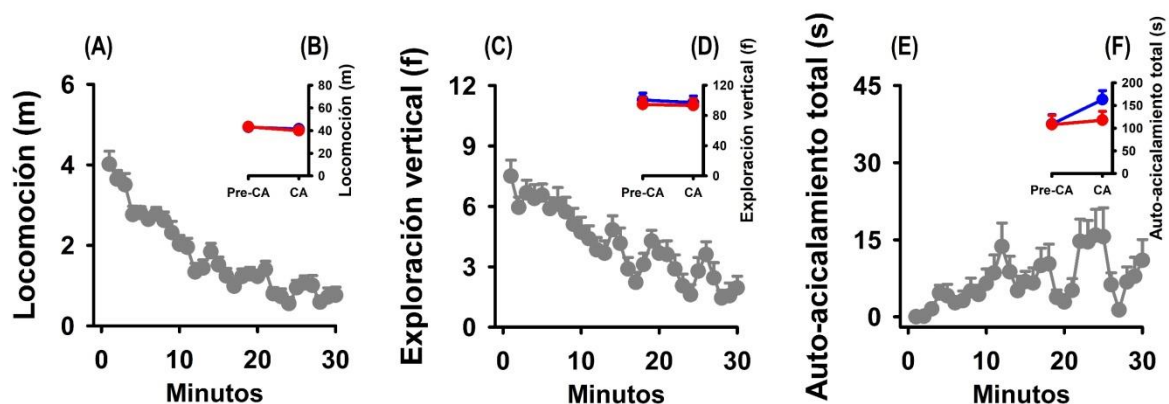


Figura 4. Cinética y niveles acumulados de la locomoción (A-B), la frecuencia de exploración vertical (C-D) y la duración total del acicalamiento durante la preexposición al CA. Los datos mostrados en los gráficos insertos corresponden con la sumatoria de los primeros 20 min de evaluación. Las líneas grises muestran los puntajes conjuntos de ambos grupos CA+CA durante la preexposición al CA. Las líneas azules y rojas muestran la comparación entre los puntajes acumulados durante la preexposición al CA y la evaluación en el CA tanto en los animales no estresados como en los estresados, respectivamente.

2. El estrés no afectó la habituación de la locomoción y la exploración vertical

La distancia recorrida y la frecuencia de exploración vertical no se vieron afectadas por la inducción de estrés. Se encontró que la locomoción (Minutos: $F(11.10,477.49)=32.29$, $P<.001$, $\eta^2_p=.43$) y la exploración vertical (Minutos: $F(11.12,489.45)=14.85$, $P<.001$, $\eta^2_p=.20$) disminuyeron a lo largo de los minutos, siendo este cambio dependiente de las condiciones de evaluación y respecto a las pendientes de decaimiento (Minutos*Contexto de evaluación para la locomoción: $F(22.21, 477.49)=2.75$, $P<.001$, $\eta^2_p=.11$; Minutos*Contexto de evaluación para la exploración vertical: $F(22.24,489.45)=20.05$, $P<.01$; $\eta^2_p=.08$). Los grupos de CA (**Figura 5A**) y CA+CA (**Figura 5B**) redujeron progresivamente la locomoción del minuto 1 al 10 (Bonferroni: $P<.05$), sin mostrar cambios significativos a partir de entonces. Por otro lado, los animales de JI mostraron una única reducción del minuto 1 al 4 (Bonferroni: $P<.01$). De hecho, al comparar la actividad locomotora entre las pruebas, el grupo de JI mostró una mayor distancia por minuto que los otros grupos ($F(2,45)=123.83$, $P<.001$, $\eta^2_p=.85$; Bonferroni: $P<.001$) (**Figura 5C**). Debido a que el tamaño de la prueba pudo afectar qué tanta distancia se desplazaron los animales (Eilam, 2003; Eilam et al., 2003), se corrigieron las distancias acumuladas mediante su ajuste respecto al área de los aparatos. Lo anterior, con el fin de evitar un reporte inexacto de las diferencias entre grupos. Después de esta corrección, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (**Figure 5D**) y la distancia fue ahora descriptivamente superior en el grupo de JI. En el caso de la exploración vertical, los grupos de CA y de CA+CA mostraron niveles similares de esta conducta, con excepción de los animales no estresados del grupo CA durante los primeros 5 min. El grupo de JI mostró una reducción levemente más pronunciada, sin embargo, la frecuencia de exploración vertical no difirió entre las condiciones de evaluación. En general, la pre-habituación y la familiaridad con el contexto de evaluación no afectaron significativamente los parámetros tradicionales evaluados en el CA.

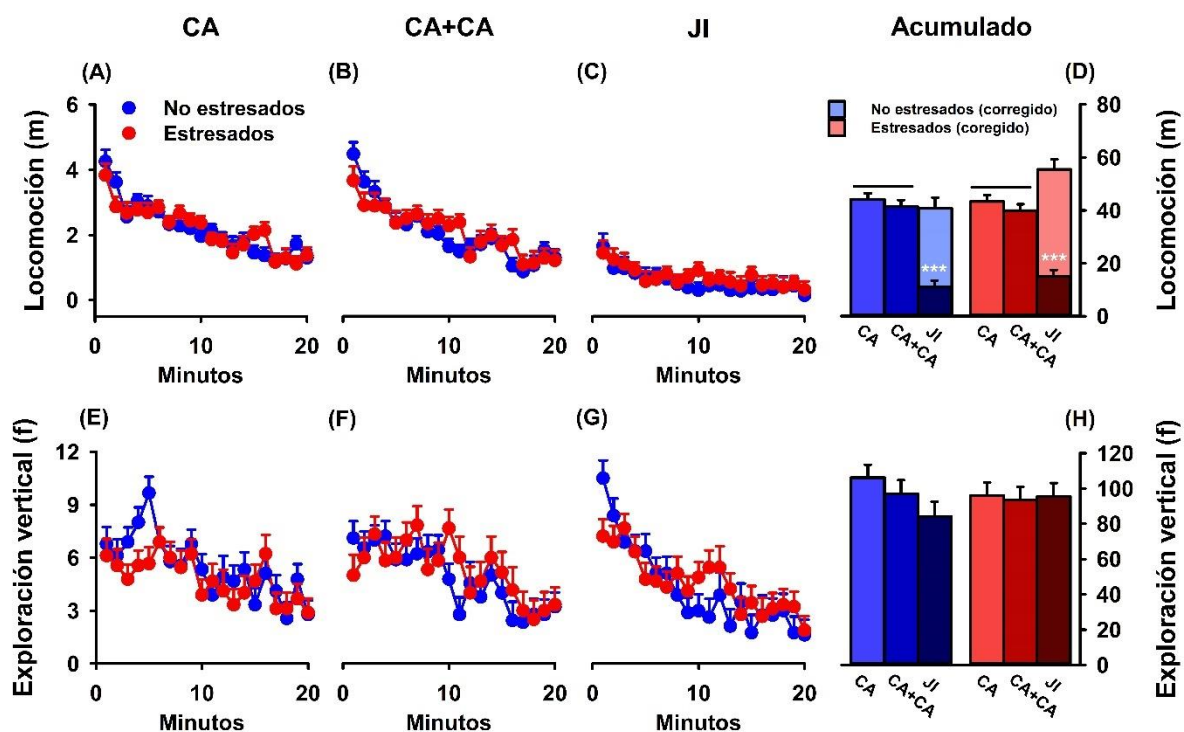


Figura 5. Cinética de la locomoción (A-C) y la exploración vertical (E-G). Distancia total recorrida (D) y frecuencia total de la exploración vertical (H) desplegada durante las evaluaciones. CA: Animales evaluados una única vez en el campo abierto. CA+CA: animales evaluados en dos campos abiertos separados por 24h. JI: Animales evaluados una única vez en una jaula de alojamiento individual rellena de material de cama. Las barras insertas dentro de la columna de JI en D muestran la distancia total recorrida. Las líneas horizontales indican un efecto principal de las condiciones de evaluación para los puntajes de locomoción no corregidos. *** $P < .001$.

3. El estrés redujo el tiempo total de AA pero incrementó el AA cefálico

La frecuencia (Estrés: $F(1,45)=5.96$, $P < .05$, $\eta^2_p=.12$) y duración (Estrés: $F(1,45)=5.89$, $P < .05$, $\eta^2_p=.12$) del AA total mostraron una leve reducción como consecuencia del estrés independientemente de las condiciones de evaluación (**Figura 6**). El análisis minuto a minuto reveló que la frecuencia (Minutos: $F(10.05, 442.38)=3.50$, $P < .001$, $\eta^2_p=.07$) y duración (Minutos: $F(8.73, 392.91)=4.17$, $P < .001$, $\eta^2_p=.08$) del AA mostró un patrón irregular en el que se observa un leve incremento a lo largo de la prueba. Un ANOVA de tres vías mostró que los subtipos de AA se

distribuyeron diferencialmente en los grupos (Subtipos: $F(5,270)=7.11$, $P<.001$, $\eta^2_p=.12$). Un análisis detallado reveló que en las ratas estresadas, el AA cefálico fue más frecuente que los otros subtipos de AA (Subtipos*Estrés: $F(5,270)=2.52$, $P<.05$, $\eta^2_p=.04$), mientras que en las ratas no estresadas, la frecuencia de AA estuvo distribuida de forma más homogénea entre los subtipos (**Figura 7**). Ni el estrés ni las condiciones de evaluación afectaron la emisión de las secuencias típicas de AA (cefálico, caudal y secuencial) (**Figura 7A**). Sin embargo, el estrés sí indujo una reducción en la frecuencia de las secuencias más complejas de AA ($F(1, 45)=10.42$, $P<.01$, $\eta^2_p=.19$) (**Figura 7B**), sin que esto afectara la duración de las conductas (**Figura 7C, 7D**).

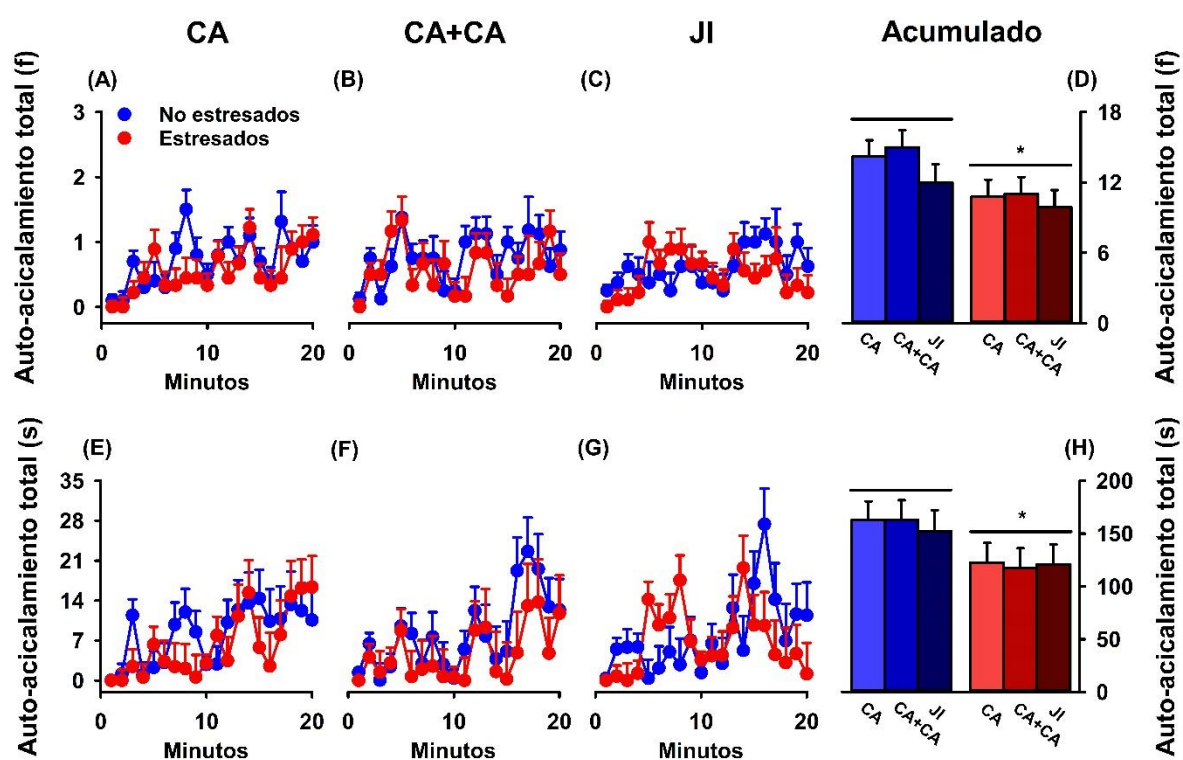


Figura 6. Cinética conductual de la frecuencia (A-C) y duración (E-G) del AA total. Frecuencia (D) y duración (H) acumulada del AA. CA: Animales evaluados una única vez en el campo abierto. CA+CA: animales evaluados en dos campos abiertos separados por 24h. JI: Animales evaluados una única vez en una jaula de alojamiento individual rellena de material de cama. Las líneas horizontales indican el efecto principal de Estrés. * $P<.05$.

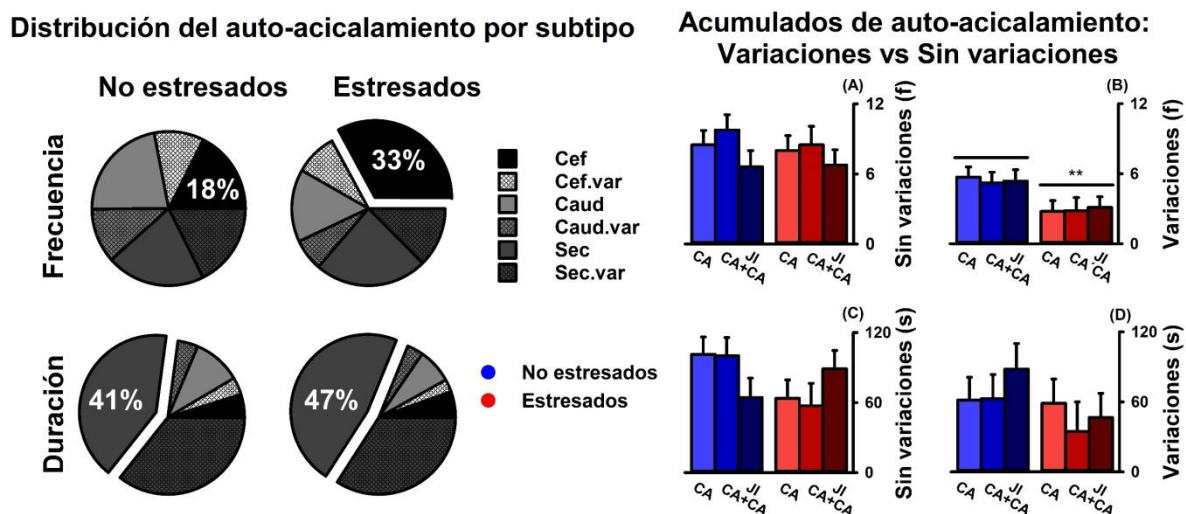


Figura 7. Distribución del AA por subtipos. Los gráficos de pastel en el panel izquierdo muestran la distribución de los subtipos de AA en los animales estresados y no estresados. Las secciones desprendidas de estos gráficos muestran el subtipo significativamente más frecuente ($P < .05$). Los gráficos de barras en el panel derecho (A-D) muestran la distribución acumulada del AA con y sin variaciones. CA: Animales evaluados una única vez en el campo abierto. CA+CA: animales evaluados en dos campos abiertos separados por 24h. JI: Animales evaluados una única vez en una jaula de alojamiento individual rellena de material de cama. Cef: Cefálico. Cef.var: Cefálico con variaciones. Caud: Caudal. Caud.var: Caudal con variaciones. Sec: Secuencial. Sec.var: Secuencial con variaciones. La línea horizontal muestra el efecto principal de Estrés. $**P < .01$.

4. El estrés incrementa la emisión de VUS de 22-kHz y reduce la emisión de las de 50-kHz en todas las condiciones experimentales

El estrés produjo un incremento significativo de las llamadas de 22-kHz (Estrés: $F(1,49)=6.47$, $P < .05$, $\eta^2_p=.12$), especialmente durante los primeros 5 minutos de evaluación (Minuto*Estrés: $F(1.4, 67.42)=5.09$, $P < .05$; $\eta^2_p=.10$). Sin embargo, las condiciones de evaluación no afectaron la emisión de VUS 22-kHz. Además, el estrés suprimió la emisión de VUS de 50-kHz en los animales CA y CA+CA, reduciendo además la tasa de vocalizaciones en los animales evaluados en la JI (Estrés: $F(1,50)=6.917$, $P < 0.01$, $\eta^2_p=0.122$) (**Figura 8**). En consecuencia, la tasa de VUS de 50-kHz cambió significativamente a lo largo de los minutos (Minutos: $F(2.093,69.081)=3.513$, $P < 0.03$, $\eta^2_p=0.096$), especialmente en las ratas no estresadas (Minutos*Estrés: $F(2.766,143.836)=4.557$, $P < 0.01$,

$\eta^2_p=0.08$). Cuando se compararon los contextos de evaluación, la JI indujo la mayor tasa de VUS de 50-kHz (Contexto de evaluación: $F(1,52)= 23.897$, $P <0.001$, $\eta^2_p=0.31$), especialmente durante los dos primeros minutos de evaluación (Minutos*Contexto de evaluación: $F(2.766,143.836)= 20.294$, $P <0.001$, $\eta^2_p=0.28$) y en los animales no estresados (Minutos*Contexto de evaluación*Estrés: $F(2.766,143.836)= 2.995$, $P <0.05$, $\eta^2_p=0.05$). Al analizar los subtipos de las VUS se observó una diferenciación entre ellos, con las vocalizaciones planas siendo emitidas en una mayor tasa, seguidas de las llamadas escalonadas, los trinos escalonados y los trinos simples, en ese orden ($61.45\pm 3.15\%$, $18.79\pm 1.70\%$, $15.75\pm 1.36\%$, $4.011\pm 1.85\%$). De forma descriptiva, el estrés redujo el porcentaje de los subtipos con frecuencia modulada (escalonadas, los trinos escalonados y los trinos simples), siendo esta reducción aun mayor en los animales evaluados en la JI que en los CA y CA+CA (**Tabla 2**). No se observaron otros efectos principales ni interacciones producto de los tratamientos.

5. El estrés modificó la asociación entre los parámetros conductuales

En los animales no estresados, los puntajes acumulados de locomoción y exploración vertical mostraron una correlación positiva uno con el otro ($r=.56$, $P <.001$), pero una correlación negativa con el AA secuencial con variaciones (locomoción: $r=-.28$, $P=.07$; exploración vertical: $r=-.46$, $P <.01$). Por otro lado, los puntajes totales de VUS de 50-kHz se asociaron negativamente con la locomoción ($r=-.43$, $P <.05$) pero positivamente con el AA cefálico con variaciones ($r=.50$, $P <.01$). En los animales estresados, la locomoción ($r=-.39$, $P <.05$) y la exploración vertical ($r=-.36$, $P <.05$) mostraron una correlación negativa con el AA secuencial. El puntaje acumulado de VUS de 22-kHz se asoció positivamente con la exploración vertical ($r=.33$, $P <.05$) pero negativamente con el AA cefálico ($r=-.49$, $P <.01$). En contraste, las VUS de 50-kHz se asociaron negativamente con la locomoción ($r=-.56$, $P <.001$), así como con la frecuencia ($r=-.34$, $P <.05$) y duración ($r=-.43$, $P <.05$) del AA cefálico. Sin embargo, mostraron una correlación positiva con el AA cefálico con variaciones ($r=.59$, $P <.01$) y con el AA secuencial con variaciones ($r=.35$, $P <.05$).

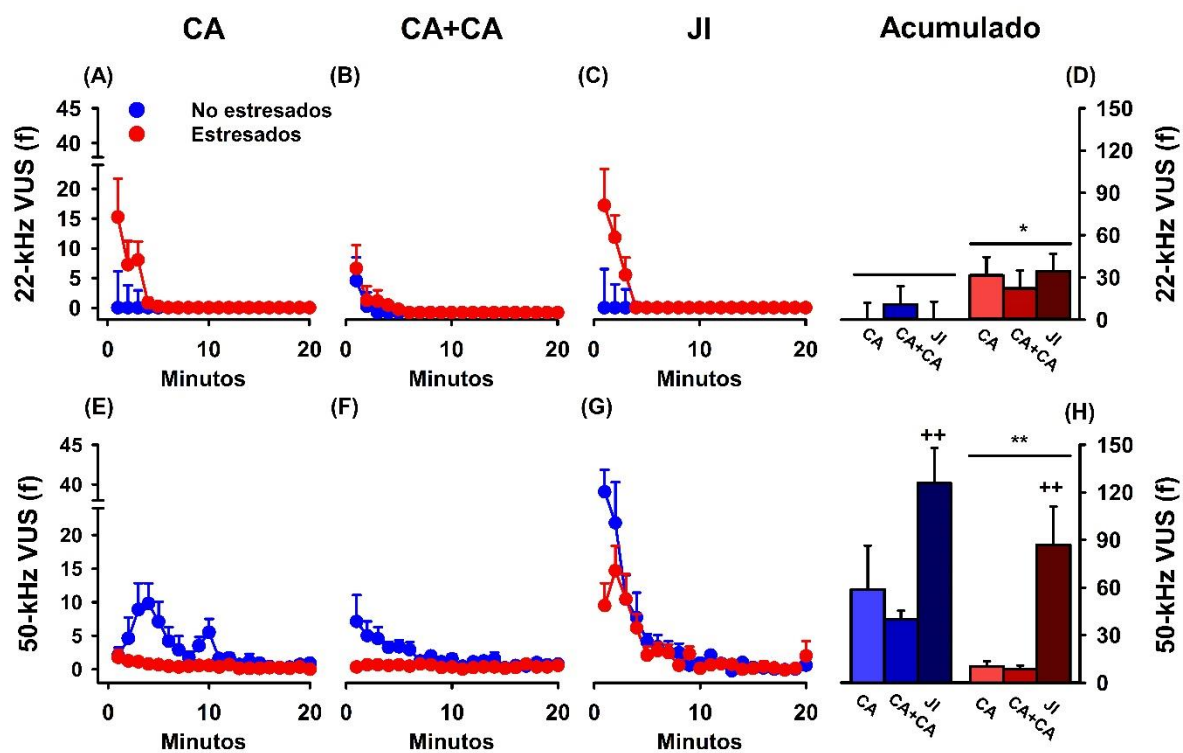


Figura 8. Cinética de las VUS durante las evaluaciones conductuales. Llamadas de 22-kHz (A-D). Llamadas de 50-kHz (E-H). CA: Animales evaluados una única vez en el campo abierto. CA+CA: animales evaluados en dos campos abiertos separados por 24h. JI: Animales evaluados una única vez en una jaula de alojamiento individual rellena de material de cama. Las líneas horizontales indican un efecto principal de Estrés: ** $P < .01$. Los animales JI difirieron de los otros grupos, ++ $P < .01$.

Discusión de los resultados

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los efectos conjuntos e independientes del estrés agudo y la habituación a la novedad sobre la conducta de AA. Mediante el análisis de la cinética de la locomoción y la exploración vertical, se encontró que el estrés no afectó el proceso de habituación a la novedad, lo cual fue contrario a nuestras expectativas iniciales fundamentadas en la evidencia previa (Blanchard, 2018; Blanchard & Blanchard, 2008; Füsezi et al., 2016). Tradicionalmente, se espera que los estresores moderados incrementen la locomoción y exploración vertical, mientras que estresores más intensos generen una inhibición conductual mediante el incremento de la postura de congelamiento (Blanchard, 2018; Blanchard & Blanchard, 2008). Por tanto, nuestros resultados indican que la aplicación de tres choques eléctricos (0.8 mA) de 1s espaciados por 5s fueron insuficientes ya fuera para incrementar o disminuir la EER cuando la evaluación ocurrió un minuto después de la inducción de estrés. Alternativamente, la locomoción y la exploración vertical podrían no ser los mejores parámetros para capturar tal efecto, ya que dicha inducción de estrés fue suficiente para generar llamadas de alarma (22-kHz), lo cual se encuentra inequívocamente relacionado con un estado emocional negativo (Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 2002; Taylor et al., 2017). Solo en las ratas estresadas, las VUS de 22-kHz mostraron una asociación positiva con la exploración vertical. Debido a que ese tipo de VUS suele emitirse de forma concomitante con la adopción de una postura de congelamiento (Borta et al., 2006; Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 2002), el estrés podría haber inducido en algunos animales una alternancia entre la emisión de la postura de congelamiento y de EER, lo cual indica un alto nivel de alarma y defensividad. Además, el estrés inhibió las llamadas espontáneas de 50-kHz en todas las condiciones de evaluación, pero en un menor grado en la JI. Tal como se ha reportado previamente (Natusch & Schwarting, 2010; Brenes et al., 2016), contextos pequeños y familiares, especialmente aquellos que incluyen material de cama, tienen la capacidad de incrementar las llamadas planas de 50-kHz en comparación con ambientes más grandes, menos familiares y sin material de cama (ej., CA). Este subtipo de VUS aparece tanto cuando los animales son separados de sus conspecíficos como cuando exploran un ambiente nuevo, por lo que desempeñan un rol importante favoreciendo el mantenimiento o restablecimiento del contacto social, y ayudando a reducir la posibilidad de agresión intraespecífica (Natusch & Schwarting, 2010; Whör et al., 2008; Brenes et al., 2016). Por tanto, la evidencia obtenida de las VUS indica que los choques eléctricos fueron efectivos en la inducción de estrés, sin embargo, dicho estado emocional negativo no pudo ser detectado mediante el análisis de parámetros tradicionales de EER. Otros estudios también han

reportado que la preexposición aguda a distintos tipos de estresores intensos (ej., luz brillante con ruido, olores naturales o artificiales de depredadores, una sesión de nado forzado o la administración de corticosterona) no afectaban de forma inmediata la locomoción y EER en respuesta a la exposición a un CA, la prueba conocida como “*hole-board*” y al laberinto elevado en cruz (Roth & Katz, 1979; Katz et al., 1981; Hacquemand et al., 2013; Shi et al., 2010; Zangrossi & File, 1992; Mikics et al., 2005), lo que sugiere que el estrés inducido por estas pruebas de ansiedad incondicionada podrían haberse superpuesto con el *arousal* inducido por la preexposición al estrés. De forma alternativa, podría considerarse también que un intervalo de 1min entre el estresor y la evaluación podría ser muy corto como para generar cambios fisiológicos y hormonales que pudieran afectar la conducta. Cuando se administraron diferentes estresores 30, 60 o 150min antes de la evaluación en un CA se observó una disminución en la locomoción (Quartermain et al., 1995; Rasheed et al., 2010; Nosek et al., 2008), pero no se observaron cambios en dicha conducta cuando el estresor fue administrado 48 horas antes de la prueba (Mercier et al., 2003).

Por otro lado, es bien conocido que las ratas criadas en ambientes de aislamiento social muestran una gran cantidad de alteraciones conductuales (Brenes et al., 2006; Brenes et al., 2008, Brenes et al., 2009; Brenes & Fornaguera, 2009), sin embargo, periodos cortos de aislamiento que van desde un día y hasta las cuatro semanas no han mostrado tener un efecto sobre el AA (Brenes et al., 2008; Brenes et al., 2009). En el caso de las VUS, se espera un fenómeno opuesto: la tasa de VUS de 50-kHz inducida por la separación momentánea entre conspecíficos o por el juego intra- o hetero-específico incrementa tras 24 h de aislamiento social (Brudzynski, & Pniak, 2002; Schwarting et al., 2007; Burgdorf et al., 2008; Whör et al., 2008; Natusch & Schwarting, 2010). Cuando se evalúa a ratas en un CA o en un JI con material de cama tras haber sido separadas de sus compañeros de jaula, la tasa de VUS de 22-kHz es cercana a cero (Whör et al., 2008; Natusch & Schwarting, 2010; Brenes et al., 2016), lo que indica que periodos cortos de aislamiento no inducen altos niveles de estrés y defensividad en ratas evaluadas en dichos contextos. Por tanto, es muy poco probable que los efectos del estrés y las condiciones de evaluación sobre la conducta en el CA y en las VUS observados en este experimento puedan ser atribuidos al aislamiento social.

Las condiciones de evaluación tampoco produjeron un efecto detectable sobre la EER. El contexto de la JI evocó una menor locomoción en comparación con las evaluaciones en el CA, pero después de la corrección, dichas diferencias desaparecieron. En el caso de la exploración vertical, su frecuencia fue bastante similar entre las condiciones de evaluación, a pesar de que se esperaba

observar una menor frecuencia de esta conducta en la JI debido a la mayor familiaridad con este contexto (Füzesi et al., 2016). La alta frecuencia de exploración vertical observada en los animales JI podría ser consecuencia de que, dado que la jaula de evaluación era baja, los animales tenían la capacidad de alcanzar la rejilla superior, lo que podría haber incrementado todo tipo de actividad vertical incluyendo la exploración vertical. La preexposición al CA no redujo la locomoción y la exploración vertical, tal y como inicialmente se esperaba a partir de nuestra evidencia previa (Rojas-Carvajal et al., 2018). Podría argumentarse que la sola exposición a la cámara de choques y las pistas olfatorias dejadas ahí por las otras ratas podrían haber alterado la EER durante la evaluación posterior, minimizando el efecto de los choques eléctricos sobre la habituación conductual. Aunque no se puede descartar que la sola exposición a la cámara de choques podría haber generado alguna forma de estrés, tal efecto debería cancelarse puesto que tanto los animales estresados como los no estresados tuvieron dicha experiencia previa. La mayoría de los experimentos de condicionamiento al miedo, respuesta de sobresalto o de contextos para la evaluación del estrés incluyen animales control que solo han sido expuestos a la cámara de choque, sin que esta aproximación metodológica haya constituido alguna limitación para identificar los efectos del estrés inducido por choques eléctricos (Borta et al., 2006; Fitri & Liem, 2018).

Por otro lado, la evidencia sobre la inducción social de estrés mediante pistas olfatorias dejadas por conspecíficos (Mackay-Sim & Laing, 1981; Stevens & Köster, 1972) proviene de experimentos en donde los “donantes de olor” permanecen dentro del contexto de evaluación por periodos prolongados (>5min), los aparatos no se limpian tras haber removido a la rata “donadora de olor”, los sujetos experimentales son expuestos directamente a un aparato que contiene orina, heces y residuos frescos de cabello, y en los que la evaluación conductual ocurre en la presencia de las pistas olfatorias (Arakawa et al., 2011; Mackay-Sim & Laing, 1980; Rodgers & Cole, 1993). En este experimento, por el contrario, los animales estresados recibieron solo tres choques eléctricos en un lapso de 13 segundos y tanto los animales estresados y no estresados fueron expuestos a la cámara de choques durante 3 min. Además, la cámara de choque fue profundamente limpiada con etanol al 70% entre los distintos sujetos, los animales nunca fueron expuestos a residuos frescos dejados por sus conspecíficos, los animales fueron evaluados en aparatos distintos tras haber sido removidos de la cámara de choque, y los choques eléctricos, pero no la exposición a la cámara por si misma, fueron capaces de inducir VUS de 22-kHz, las cuales son indicadores innegables de un estado emocional negativo inducido por estrés. La evidencia recolectada sugiere entonces que el hecho de haber sido confinados a un espacio pequeño, poco iluminado y desconocido un minuto antes de ser evaluados,

provocó en todos los animales una suerte de habituación a corto plazo durante la subsecuente evaluación conductual, independientemente del grado de familiaridad de los animales con su contexto de evaluación. Una prueba de ese efecto es que animales sin previa manipulación evaluados por primera vez en el mismo CA mostraron durante el primer minuto de prueba cerca de 7 m de desplazamiento horizontal, así como 10 eventos de exploración vertical (Rojas-Carvajal et al., 2018). En el presente experimento, en contraste, las ratas deambularon 4 m y emitieron 7 eventos de exploración vertical durante el mismo periodo de tiempo, lo cual corresponde con una reducción de 43% y 30%, respectivamente. De hecho, se confirmó dicha presunción a partir de un experimento reciente en el que se incluyó un grupo de animales no expuestos a la cámara de choque (datos no publicados). En dicho experimento, los animales sin previa manipulación mostraron niveles incrementados de locomoción y exploración vertical en comparación con ratas no estresadas expuestas a la cámara de choques antes de la evaluación en un CA. Por tanto, una preexposición a un contexto inductor de estrés moderado como lo es una cámara de choques produce un efecto de habituación en lugar de incrementar las conductas defensivas.

De forma consistente con nuestras expectativas, la preexposición a un evento de estrés agudo redujo la frecuencia y duración total del AA. Sin embargo, las secuencias cortas dirigidas hacia la cabeza y las manos (AA cefálico) mostró un incremento producto del estrés, mientras que las secuencias más complejas de esta conducta mostraron una reducción, en concordancia con la evidencia previa (Brenes, et al., 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Kalueff & Tuohimaa, 2005). Esta evidencia indica que los subtipos de AA responden de forma diferencial al estrés, el cual produce un cambio en la distribución y sintaxis de las secuencias motoras hacia el AA cefálico a expensas de las formas más largas y complejas de esta conducta (Brenes et al., 2006; Brenes et al., 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal et al., 2016). En el CA, así como en otras pruebas de ansiedad incondicionada, este tipo de AA aparece durante los primeros minutos de evaluación cuando el estrés es más elevado (Rojas-Carvajal et al., 2018; Veloso et al., 2016). Por tanto, muchos estudios que reportan un incremento en el AA total producto del estrés, podrían estar capturando principalmente este incremento inicial de AA cefálico, especialmente cuando las evaluaciones conductuales son cortas (~5 min) (Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kalueff & Tuohimaa, 2005; Roth & Katz, 1979; Katz & Roth, 1979; van Erp et al., 1994; D'Aquila et al., 2000). De hecho, otros investigadores han sugerido que el AA "rostral" está relacionado con la fase inicial de la respuesta de estrés, mientras que el AA del cuerpo o "caudal", por el contrario, no tendría una connotación defensiva asociada con esa respuesta inicial (Kalueff & Tuohimaa, 2005; Veloso et al., 2016). Sin embargo, pocos estudios han estudiado

de forma particular si esos subtipos pudieran estar relacionados con etapas específicas de la respuesta de estrés (Estanislau et al., 2019; Veloso et al., 2016). De manera funcional, el AA cefálico podría comportarse como un patrón de acción modal evocado con el objetivo de mantener los órganos sensoriales libres de obstrucciones y suciedad. En consecuencia, estas secuencias podrían ocurrir cuando los animales se encuentran altamente involucrados en conductas exploratorias, es decir, durante los primeros minutos de evaluación. En el CA, se ha reportado que el estrés crónico (30 días) en la forma de aislamiento social también incrementa el AA cefálico, con las ratas aisladas invirtiendo cerca del 80% de su tiempo de AA en este subtipo específico. Estos animales también invierten una gran cantidad de tiempo escaneando el entorno con sus vibrisas, un comportamiento que correlaciona de forma positiva con el AA cefálico en un 80% (Brenes et al., 2009). De forma alternativa, el estrés podría provocar que la EER tomara preponderancia sobre otras respuestas conductuales, irrumpiendo el encadenamiento de las secuencias cortas de AA con aquellas más complejas, un fenómeno típicamente observado bajo condiciones de poco estrés. Por tanto, eventos rápidos dirigidos hacia la cabeza y las manos podrían volverse altamente estereotipados bajo estrés. De hecho, distintas especies incluyendo a los humanos muestran AA excesivo hacia estas partes del cuerpo en distintas patologías relacionadas con el estrés (Kalueff et al., 2016). En depredadores criados en cautiverio, conductas estereotipadas como el bamboleo y la marcha recurrente incrementan presumiblemente como una estrategia de afrontamiento respecto al ambiente empobrecido en el que viven (Mason, 2006). En las ratas estresadas, se encontró una asociación negativa entre el AA cefálico y las VUS de 50-kHz y una asociación positiva entre las VUS de 50-kHz y formas más complejas de AA (cefálico con variaciones y secuencial con variaciones), lo que sugiere que estos subtipos de AA ocurren bajo estados emocionales opuestos.

Los subtipos de AA complejos (ej., secuencial con variaciones) requieren que el animal se desenganche de la emisión de respuestas exploratorias y defensivas, por lo que incrementan hacia el final del periodo de la evaluación una vez que la habituación ha ocurrido (Brenes et al., 2006; Brenes et al., 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Sampedro-Piquero et al., 2018; Veloso et al., 2016). La aparición de estos subtipos de AA ha sido interpretada como una reacción post-estrés que forma parte, o bien, que contribuye con el afrontamiento de la situación adversa a la que el animal se enfrenta durante la prueba (Brenes et al., 2006; Brenes et al., 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; ver también a Kurihara et al., 2019). Por tanto, los mecanismos que controlan el AA deberían estar integrados dentro de un sistema capaz de favorecer la reducción de la activación emocional (*arousal*) durante y después del estrés. De hecho, la inducción artificial de AA mediante la estimulación de estructuras cerebrales

relacionadas con el estrés (ej., núcleo paraventricular del tálamo y la amígdala) reducen la locomoción y la exploración vertical (Füzesi et al., 2016) al igual que otras respuestas defensivas como el ataque a conspecíficos en un paradigma de residente-intruso (Hong et al., 2014). Es posible que incluso altos niveles de AA cefálico los cuales coocurren con la EER estén contribuyendo con el *de-arousal* emocional. Por tanto, mientras los animales reconocen que el contexto en el que se les evalúa es seguro, aparecen secuencias cada vez más completas de AA las cuales facilitan la transición de un estado emocional defensivo a uno no defensivo. Considerando que el AA es una conducta autodirigida que no se encuentra asociada con el afrontamiento activo de una fuente de amenaza o peligro, su función debe estar inequívocamente relacionada con la normalización de procesos fisiológicos y emocionales en curso asociados con la respuesta de estrés.

Conclusiones: Reflexión a la luz de las Ciencias Cognoscitivas

El presente proyecto se enmarca teórica y metodológicamente tanto en el campo de las Neurociencias del Comportamiento como en el de la Psicología Comparada. La evidencia derivada del trabajo de ambas disciplinas ha permitido el fortalecimiento y consolidación de distintas líneas de trabajo dentro de las Ciencias Cognitivas, por lo que se les considera como pilares fundamentales para su desarrollo (Miller, 2003). Uno de los aspectos más importantes para las Ciencias Cognitivas es el estudio del procesamiento de la información (Cromwell & Panksep, 2011). Es decir, de la manera en la que los organismos transforman, integran y utilizan la información que poseen sobre sí mismos y su entorno. Una de esas formas de procesamiento es el aprendizaje no asociativo, considerado como una de las capacidades más básicas y ampliamente distribuidas en los seres vivos (Carew, Pinsker & Kandel, 1972; Groves & Thompson, 1970; Poon & Young, 2006; Purves et al., 2008). De hecho, se ha descrito que, en seres humanos, la capacidad de habituación se encuentra relacionada con la regulación de tareas de aprendizaje operante (reforzamiento por contingencias en tareas dirigidas hacia objetivos; McSweeney & Murphy, 2009), así como con procesos de extinción dentro de tareas de condicionamiento clásico (apareo de un estímulo con una respuesta) (Furlong, Richardson & McNally, 2016). Evidencia neurobiológica también vincula a la capacidad de habituación con la memoria de trabajo (Sanderson et al, 2010; Sanderson et al., 2016), esta última considerada como una de las habilidades cognitivas más complejas. En este sentido, las características evolutivamente bien conservadas de la habituación le brindan un alto valor traslacional (Ranking et al., 2009), a la vez que le confieren un alto interés de estudio debido a sus posibles vinculaciones con otras funciones cognitivas superiores. Además, existe evidencia que señala una posible asociación entre déficits de memoria no asociativa (habituación) y distintos trastornos psicológicos (Guiraud et al., 2011; Jansiewicz, Newschaffer, Denckla & Mostofsky, 2004; Kohl et a., 2014; Massa & O'Doskey, 2011; Olatunii et al., 2009; Swartz et al., 2013; Zhuang et a., 2001), razón por la que su estudio dentro del contexto de la Maestría en Ciencias Cognoscitivas fue tanto pertinente como relevante.

Además de la relevancia del estudio de la habituación en el contexto de este proyecto, el análisis de mecanismos de regulación emocional de carácter autodirigido como lo es el caso del AA plantea otra área de gran relevancia para esta Maestría. Lo anterior, en virtud de la evidencia e hipótesis respecto al papel del AA en la regulación emocional en seres humanos. A partir de distintos estudios enmarcados en lo que se denomina cognición corporizada se ha descrito que tanto el lavarse las manos

(Kaspar, Krapp & König, 2015) así como el ejecutar conductas relacionadas con la limpieza (Lee & Schwarz, 2011), producen un “alivio” moral en quienes lo ejecutan. Además, el lavarse las manos produce que los juicios morales realizados sobre distintas imágenes que representan situaciones moralmente complejas sean menos severos, reduciendo también la activación emocional (evaluado mediante la dilatación de la pupila) experimentada durante la realización de esa tarea (Kaspar, Krapp & König, 2015). De hecho, se ha planteado que las acciones relacionadas con la limpieza, como el lavado de manos, favorecen el *de-arousal* emocional (Kaspar, Krapp & König, 2015). Desde esta perspectiva, se parte del supuesto de que existen metáforas mentales sobre el papel de la limpieza las cuales son evocadas por el lavado de manos, lo que produce un efecto purificador sobre aspectos “moralmente sucios” (Kaspar, Krapp & König, 2015). Y aunque el sustento teórico de esta hipótesis se basa en aproximaciones empíricas y en tradiciones filosóficas distintas al de la hipótesis de *de-arousal* planteada desde modelos animales (Spruijt, Van Hooff & Gispen, 1992), la coincidencia entre ambas sugiere la existencia elementos evolutivamente conservados que podrían sustentar el papel del AA en la regulación emocional (ver también Kalueff et al., 2016).

El presente trabajo tuvo como uno de sus elementos centrales estudiar el papel del AA en tanto mecanismo de autorregulación emocional. Para ello, se empleó una estrategia para habituar a los animales con sus contextos de evaluación con el fin de promover una reducción en las conductas defensivas de forma concomitante con un incremento en el AA. Además, se indujo estrés agudo previo a las evaluaciones conductuales con el fin de generar un efecto opuesto. Dicha metodología buscó integrar distintos factores que intervienen directamente en el comportamiento emitido por roedores dentro de contextos de amenaza potencial tales como el CA, una de las pruebas de más amplia utilización en modelos preclínicos. Dicha aproximación tuvo la característica de haber sido concebida a partir de una serie de hipótesis concretas derivadas tanto del trabajo empírico como teórico generado dentro (Brenes, Rodríguez & Fornaguera, 2006; Brenes, Padilla & Fornaguera, 2009; Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020) y fuera (Hong et al., 2013; Füzesi et al., 2016; Mu et al., 2020) de nuestro país. Si bien el planteamiento de hipótesis dirigidas es una práctica obligatoria en la investigación científica, históricamente las distintas disciplinas han manejado el planteamiento y evaluación de sus hipótesis de forma idiosincrática. Debido a la complejidad técnica y metodológica que supone la ejecución de experimentos conductuales, así como su posterior análisis, las hipótesis planteadas dentro de campos como las Neurociencias del Comportamiento y la Psicología Comparada suelen ser de carácter general, centradas en la predicción de la direccionalidad en el cambio conductual producto de las

intervenciones. Si bien esta característica también se encuentra presente en este trabajo, se realizó un esfuerzo por especificar con el mayor detalle posible la ocurrencia y direccionalidad del cambio conductual esperado producto de los tratamientos (**Tabla 3**). Lo anterior, evitando incurrir en el sobredimensionamiento de los efectos esperados. Tanto a partir de los aportes derivados de este trabajo (Rojas-Carvajal & Brenes, 2020), como producto de la evidencia más reciente en torno al tema y las hipótesis planteadas (Estanislau et al., 2019; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020; Mu et al., 2020), será posible el planteamiento tanto de mejores aproximaciones metodológicas a las preguntas de investigación, como de hipótesis más precisas. A pesar de esto, es posible que este tipo de hipótesis derivadas de “teorías verbales” tiendan a mantener una alta prevalencia dentro de estos campos de estudio en los años venideros. Sin embargo, es importante destacar que la alta capacidad para controlar posibles variables intervinientes en este experimento (ej., diferencias individuales, variabilidad genética generada por la camada de origen), así como la posibilidad de manipular con precisión y en un alto grado las condiciones experimentales, confieren a este tipo de estudios la posibilidad de aportar evidencia de gran relevancia. Además, permite estudiar de forma mecánica muchos constructos de dominio cognitivo y emocional tanto a nivel conductual como cerebral.

Finalmente, y a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible establecer las siguientes conclusiones generales: 1) El estrés modifica diferencialmente el despliegue del AA, incrementando las secuencias cortas dirigidas a la cabeza y desfavoreciendo la emisión de secuencias complejas; 2) A partir de la metodología implementada, ni el estrés ni la habituación modificaron la EER, sin embargo, la familiaridad con el contexto de evaluación sí promovió la emisión de VUS prosociales asociadas con una emocionalidad positiva; 3) el estrés incrementó la emisión de vocalizaciones de alarma independientemente del contexto de evaluación; 4) El AA mostró una asociación negativa con la EER y las VUS de alarma, así como una asociación positiva con las VUS prosociales. En conjunto, los resultados subrayan la relación entre el AA y el estrés, pero, además, señalan la vinculación de secuencias específicas con el nivel de estrés experimentado por los animales (Figura 3). Y si bien la aproximación metodológica no permitió detectar cambios en la EER producto de la habituación, el análisis de las VUS apoya la ejecución de futuros estudios sobre el papel de esta capacidad cognitiva en la regulación de dichas conductas (ver también Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020; Füzesi et al., 2016). En este sentido, se realizan las siguientes recomendaciones con el fin de mejorar futuros experimentos: 1) En lugar de utilizar una única exposición al CA 24 h antes de las pruebas, múltiples exposiciones repetidas al CA antes

de la evaluación de los animales podrían inducir una mejor habituación al contexto (Rojas-Carvajal et al., 2018; Rojas-Carvajal, Sequeira-Cordero & Brenes, 2020); 2) en lugar de utilizar un estresor que requiera el confinamiento de los animales en un contexto cerrado (ej., cámara de choques), utilizar otro tipo de estresores que puedan aplicarse en contextos inocuos y abiertos, por ejemplo, la restricción física (Mu et al., 2020); 3) utilizar un grupo de animales no expuestos a ninguna de las condiciones de pre-evaluación con el fin de controlar los efectos producidos únicamente por la exposición a la cámara de choques y a la manipulación asociada (ver **Figura 2**); 4) Evaluar el intervalo de tiempo entre la inducción del estrés y la evaluación conductual con el fin de determinar el mejor tiempo para capturar la mayor movilización fisiológica y conductual asociada con la respuesta de estrés. El principal aporte de este trabajo reside en la evidencia sobre la asociación de secuencias específicas de AA con distintos estadios de la respuesta de estrés. Esto refuerza entonces la importancia del estudio detallado del AA dentro de la investigación preclínica, considerando no solo la sintaxis motora sino también el tiempo de aparición de la conducta y su vinculación con el despliegue defensivo. Si bien esta evidencia contribuye de forma modesta al mejoramiento de modelos animales sobre trastornos neuropsiquiátricos, se aporta información relevante para aquellos estudios que involucre al AA como principal variable dependiente, ofreciendo una perspectiva integrada sobre la discusión respecto a la hipótesis de *de-arousal*. Además, el presente trabajo resalta la importancia del estudio de las VUS en tanto indicador confiable del estado emocional subjetivo en las ratas, un parámetro que aporta enormemente a la interpretación del papel del AA en relación con el estrés y la regulación emocional. Queda pendiente, sin embargo, la profundización sobre el papel de la habituación en la regulación del AA.

Apéndice

Tabla 1. Efectos del estrés y las condiciones de evaluación en los subtipos de AA

Subtipos de AA	Frecuencia							
	No estresados				Estresados			
	CA	CA+CA	JI	\bar{x}	CA	CA+CA	JI	\bar{x}
Cef	2.0 (0.65)	2.89 (0.68)	2.50 (0.97)	2.44 (0.40)	3.44 (0.68)	4.67 (0.84)	2.78 (0.91)	3.50° (0.40)
Cef.var	1.91 (0.65)	1.68 (0.72)	0.62 (0.54)	1.45 (0.41)	0.62 (0.73)	0.83 (0.84)	1.30 (0.51)	0.94*** (0.41)
Caud	3.10 (0.65)	3.67 (0.68)	2.25 (0.85)	3.04 (0.40)	2.11 (.68)	1.17 (0.84)	1.44 (0.80)	1.62* (0.40)
Caud.var	1.70 (0.65)	1.33 (0.68)	1.75 (0.56)	1.59 (0.40)	0.56 (.68)	1.00 (0.84)	0.67 (0.53)	0.71*** (0.40)
Sec	3.40 (0.65)	3.22 (0.68)	1.87 (0.67)	2.89 (0.40)	2.44 (.68)	2.67 (0.84)	2.56 (0.63)	2.54 (0.40)
Sec.var	2.10 (0.65)	2.33 (0.68)	3.00 (0.72)	2.44 (0.40)	1.67 (0.68)	1.00 (0.84)	1.22 (0.68)	1.33** (0.40)
Subtipos de AA	Duración							
	No estresados				Estresados			
	CA	CA+CA	JI	\bar{x}	CA	CA+CA	JI	\bar{x}
Cef	8.48 (10.68)	8.016 (11.26)	6.79 (11.94)	7.82*** (6.50)	8.652 (11.26)	9.87 (13.79)	2.31 (11.26)	6.58** (6.70)
Cef.var	9.08 (10.68)	5.44 (11.26)	2.29 (11.94)	5.85*** (6.50)	1.79 (11.26)	2.28 (13.79)	5.22 (11.26)	3.20** (6.70)
Caud	15.57 (10.68)	21.14 (11.26)	11.38 (11.94)	16.19*** (6.50)	8.14 (11.26)	3.03 (13.79)	13.22 (11.26)	8.77* (6.70)
Caud.var	5.43 (10.68)	7.79 (11.26)	7.37 (11.94)	6.79*** (6.50)	3.44 (11.26)	3.38 (13.79)	5.11 (11.26)	4.05** (6.70)
Sec	77.32 (10.68)	70.98 (11.26)	46.20 (11.943)	65.98° (6.50)	46.96 (11.26)	44.47 (13.79)	73.48 (11.26)	56.27° (6.70)
Sec.var	46.97 (10.68)	49.56 (11.26)	78.40 (11.94)	57.14° (6.50)	53.57 (11.26)	28.95 (13.79)	36.31 (11.26)	40.94° (6.70)

Notas: Los datos constituye la media \pm el error estándar entre los paréntesis. Cef: Cefálico. Cef.var: Cefálico con variaciones. Caud: Caudal. Caud.var: Caudal con variaciones. Sec: Secuencial. Sec.var: Secuencial con variaciones. CA: Animales evaluados una única vez en el campo abierto. CA+CA: animales evaluados en dos campos abiertos separados por 24h. JI: Animales evaluados una única vez en una jaula de alojamiento individual rellena de material de cama. Los puntajes de AA señalados con un “°” fueron significativamente mayores que aquellos ubicados en las casillas señaladas con asteriscos. *: $P < .05$; **: $P < .01$; ***: $P < .001$.

Tabla 2. Efecto del estrés y las condiciones de evaluación en las VUS de 50-kHz

Subtipos de 50-kHz	Frecuencia							
	No estresados				Estresados			
	CA	CA+CA	JI	\bar{x}	CA	CA+CA	JI	\bar{x}
Planas	55.56 (8.61)	62.15 (6.85)	57.20 (4.64)	58.20 (3.95)	65.43 (11.63)	58.79 (6.53)	69.35 (7.31)	64.70 (4.90)
Planas escalonadas	16.20 (3.15)	18.54 (3.78)	22.48 (3.41)	18.98 (1.98)	20.66 (7.18)	20.74 (3.45)	14.84 (3.50)	18.61 (2.79)
Trinos escalonados	12.00 (9.98)	2.62 (1.53)	2.07 (1.37)	5.79 (3.61)	0.41 (0.41)	3.02 (1.69)	3.15 (1.73)	2.23 (0.84)
Trinos simples	16.24 (3.19)	16.69 (2.88)	18.25 (2.20)	17.02 (1.57)	13.50 (5.21)	17.44 (2.50)	12.66 (3.67)	14.47 (2.23)

Notas: Los datos constituyen la media \pm el error estándar entre los paréntesis. CA: Animales evaluados una única vez en el campo abierto. CA+CA: animales evaluados en dos campos abiertos separados por 24h. JI: Animales evaluados una única vez en una jaula de alojamiento individual rellena de cama.

Tabla 3. Contraste entre la evidencia obtenida y las hipótesis planteadas

Hipótesis	Conclusión
El AA cefálico aparecerían en conjunto con las conductas de EER, mientras que el incremento en el AA complejo correspondería con la reducción de las conductas de EER.	La evidencia obtenida tanto mediante el análisis de las conductas a través del tiempo (Figura 4-6) como mediante las correlaciones, apoya dicha hipótesis.
La familiaridad con el contexto de evaluación facilitaría la reducción de las conductas de EER, así como el incremento de las secuencias complejas de AA.	A partir de la metodología implementada y en virtud de los resultados obtenidos (Figura 5, 7), no es posible aportar evidencia a favor de esta hipótesis.
Después del evento de estrés agudo, los animales evaluados en los contextos más familiares desplegarían niveles de EER menores que los de las ratas evaluadas en un contexto novedoso.	Los resultados obtenidos no permiten inferir que, bajo las condiciones de evaluación utilizadas, el estrés haya modulado la aparición de la EER. Sin embargo, el estrés sí modificó la asociación entre la locomoción y la exploración vertical (Figura 5).
La inducción de estrés generaría un incremento en las secuencias cortas de AA dirigidas a la cabeza.	El estrés produjo un incremento del AA cefálico independientemente de la condición de evaluación (Figura 7).
Las secuencias complejas de AA se verían inhibidas por el estrés.	El estrés produjo una reducción leve pero significativa de las secuencias complejas de AA (Figura 7).
Los animales evaluados en ambientes más familiares mostrarían un incremento en las secuencias complejas de AA.	La diferencia en la familiaridad con el contexto de evaluación tampoco influyó en la aparición del AA complejo (Figura 7).
El estrés suprimiría la emisión de vocalizaciones prosociales de 50-kHz.	El estrés redujo la emisión espontánea de VUS de 50-kHz (Figura8).
El estrés favorecería las vocalizaciones de alarma de 22-kHz.	El estrés favoreció la emisión de VUS de 22-kHz (Figura 8).
La emisión de vocalizaciones de 50-kHz se vería potenciada en los ambientes más familiares.	La familiaridad con el contexto favoreció la emisión de VUS de 50-kHz, incluso después de la inducción de estrés agudo (Figura 8).
Las vocalizaciones de 22-kHz se verían incrementadas en los ambientes menos familiares.	La familiaridad con el contexto no afectó la emisión de VUS de 22-kHz.

Referencias

- Aggernaes, B., Glenthøj, B. Y., Ebdrup, B. H., Rasmussen, H., Lublin, H., & Oranje, B. (2010). Sensorimotor gating and habituation in antipsychotic-naive, first-episode schizophrenia patients before and after 6 months' treatment with quetiapine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *13*(10), 1383-1395.
- Akinyi, M. Y., Tung, J., Jeneby, M., Patel, N. B., Altmann, J., & Alberts, S. C. (2013). Role of grooming in reducing tick load in wild baboons (*Papio cynocephalus*). *Animal Behaviour*, *85*(3), 559-568. doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.12.012
- Alexander, J. R., Houghton, D. C., Twohig, M. P., Franklin, M. E., Saunders, S. M., Neal-Barnett, A. M., Compton, S.N., & Woods, D. W. (2017). Clarifying the relationship between Trichotillomania and anxiety. *Journal of obsessive-compulsive and related disorders*, *13*, 30-34.
- Alonso, P., López-Solà, C., Real, E., Segalàs, C., & Menchón, J. M. (2015). Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 1939.
- Anselme, P. (2008). Abnormal patterns of displacement activities: a review and reinterpretation. *Behavioural Processes*, *79*(1), 48-58. doi.org/10.1016/j.beproc.2008.05.001
- Arakawa, H., Arakawa, K., Blandino Jr, P., & Deak, T. (2011). The role of neuroinflammation in the release of aversive odor cues from footshock-stressed rats: Implications for the neural mechanism of alarm pheromone. *Psychoneuroendocrinology*, *36*(4), 557-568.
- Argiolas, A., Melis, M. R., Murgia, S., & Schiöth, H. B. (2000). ACTH-and α -MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain research bulletin*, *51*(5), 425-431.
- Berridge, K. C., & Whishaw, I. Q. (1992). Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. *Experimental Brain Research*, *90*(2), 275-290.
- Blanchard, D. C. (2018). Risk assessment: at the interface of cognition and emotion. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *24*, 69-74. doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.03.006
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Defensive behaviors, fear, and anxiety. In Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G., & Nutt, D. J. (Eds.), *Handbook of Anxiety and Fear*, (63–79). The Netherlands: Elsevier. doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7

- Blanchard, D. C., Griebel, G., Pobbe, R., & Blanchard, R. J. (2011). Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(4), 991-998.
- Börner, A., Hjemdahl, R., Götz, T., & Brown, G. R. (2016). Ultrasonic vocalizations of female Norway rats (*Rattus norvegicus*) in response to social partners. *Journal of Comparative Psychology*, *130*(1), 76. doi.org/10.1037/com0000017
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research*, *166*(2), 271–280. doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.009
- Brenes, J. C., & Schwarting, R. K. (2014). Attribution and expression of incentive salience are differentially signaled by ultrasonic vocalizations in rats. *PloS One*, *9*(7), e102414. doi.org/10.1371/journal.pone.0102414
- Brenes, J. C., & Schwarting, R. K. (2015). Individual differences in anticipatory activity to food rewards predict cue-induced appetitive 50-kHz calls in rats. *Physiology & Behavior*, *149*, 107-118. doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.012
- Brenes, J. C., Lackinger, M., Höglinger, G. U., Schratt, G., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2016). Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(8), 1586-1607. doi.org/10.1002/cne.23842
- 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. doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.014
- 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*(1), 85-93. doi.org/10.1016/j.pbb.2007.11.004
- Brenes, J.C., Rodríguez, O., & Fornaguera, J. (2006). Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research*, *169*, 57–65. doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.001
- Brudzynski, S.M., Pniak, A. (2002). Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *Journal of Comparative Psychology*, *116*, 73-82. doi.org/10.1037/0735-7036.116.1.73

- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfaus, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of Comparative Psychology*, *122*(4), 357. doi.org/10.1037/a0012889
- Carew, T. J., Pinsker, H. M., & Kandel, E. R. (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, *175*(4020), 451-454.
- Carter, G. G., & Wilkinson, G. S. (2015). Intranasal oxytocin increases social grooming and food sharing in the common vampire bat *Desmodus rotundus*. *Hormones and behavior*, *75*, 150-153.
- Champagne, F. A. (2011). Maternal imprints and the origins of variation. *Hormones and Behavior*, *60*(1), 4-11. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.02.016
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, *5*(7), 374.
- Cohen, J. A., & Price, E. O. (1979). Grooming in the Norway rat: Displacement activity or “boundary-shift”? *Behavioral and Neural Biology*, *26*(2), 177-188. doi.org/10.1016/S0163-1047(79)92563-9
- Cromwell, H. C., & Panksepp, J. (2011). Rethinking the cognitive revolution from a neural perspective: how overuse/misuse of the term ‘cognition’ and the neglect of affective controls in behavioral neuroscience could be delaying progress in understanding the BrainMind. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(9), 2026-2035.
- D’Aquila, P., Peana, A. T., Carboni, V., & Serra, G. (2000). Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. *European Journal of Pharmacology*, *399*(1), 43-47. doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00332-0
- Delius, J. D. (1967). Displacement activities and arousal. *Nature*, *214*(5094), 1259-1260. doi.org:10.1038/2141259a0
- Eilam, D. (2003). Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behavioural Brain Research*, *142*(1-2), 53-62. doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00382-0
- Eilam, D., Dank, M., & Maurer, R. (2003). Voles scale locomotion to the size of the open-field by adjusting the distance between stops: a possible link to path integration. *Behavioural Brain Research*, *141*(1), 73-81. doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00322-4
- Estanislau, C., Veloso, A. W., Filgueiras, G. B., Maio, T. P., Dal-Cól, M. L., Cunha, D. C., ... & Fernández-Teruel, A. (2019). Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration:

Evidence for a self-grooming trait. *Physiology & Behavior*, 112585. doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112585

- Fentress, J. C. (1968). Interrupted ongoing behaviour in two species of vole (*Microtus agrestis* and *Clethrionomys britannicus*). I. Response as a function of preceding activity and the context of an apparently 'irrelevant' motor pattern. *Animal Behaviour*, 16(1), 135-153. doi.org/10.1016/0003-3472(68)90124-3
- Fernández-Teruel, A., & Estanislau, C. (2016). Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(9), 591-591.
- Fitri, & Liem, I.K. (2018). Systematic review of auditory fear conditioning protocols: Animal models and auditory conditioning stimulus. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073(4), 042050. doi.org/10.1088/1742-6596/1073/4/042050.
- Frijda, N. H. (2010). Impulsive action and motivation. *Biological Psychology*, 84(3), 570-579.
- Furlong, T. M., Richardson, R., & McNally, G. P. (2016). Habituation and extinction of fear recruit overlapping forebrain structures. *Neurobiology of learning and memory*, 128, 7-16.
- Füzesi, T., Daviu, N., Cusulin, J. I. W., Bonin, R. P., & Bains, J. S. (2016). Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nature Communications*, 7, 11937. doi.org/10.1038/ncomms11937
- Gispen, W. H., & Isaacson, R. L. (1981). ACTH-induced excessive grooming in the rat. *Pharmacology & therapeutics*, 12(1), 209-246.
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychological Review*, 77(5), 419-450. dx.doi.org/10.1037/h0029810
- Guiraud, J. A., Kushnerenko, E., Tomalski, P., Davies, K., Ribeiro, H., Johnson, M. H., & BASIS Team. (2011). Differential habituation to repeated sounds in infants at high risk for autism. *Neuroreport*, 22(16), 845-849.
- Hacquemand, R., Choffat, N., Jacquot, L., & Brand, G. (2013). Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety-and fear-related behaviors in mice. *Behavioural Brain Research*, 238, 227-231. doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.014

- Hong, W., Kim, D. W., & Anderson, D. J. (2014). Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. *Cell*, *158*(6), 1348e1361. doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.049
- Jansiewicz, E. M., Newschaffer, C. J., Denckla, M. B., & Mostofsky, S. H. (2004). Impaired habituation in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Cognitive and Behavioral Neurology*, *17*(1), 1-8.
- Jelen, P., Soltysik, S., & Zagrodzka, J. (2003). 22-kHz ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behavioural Brain Research*, *141*(1), 63-72. doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00321-2
- Jolles, J., Rompa-Barendregt, J., & Gispen, W. H. (1979). ACTH-induced excessive grooming in the rat: The influence of environmental and motivational factors. *Hormones and behavior*, *12*(1), 60-72.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, *13*(3), 151-158. doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.04.002
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, *143*(2), 169-177. doi.org:10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 45. doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
- Kaspar, K., Krapp, V., & König, P. (2015). Hand washing induces a clean slate effect in moral judgments: A pupillometry and eye-tracking study. *Scientific Reports*, *5*, 10471.
- Katz, R. J., & Roth, K. A. (1979). Stress induced grooming in the rat—an endorphin mediated syndrome. *Neuroscience Letters*, *13*(2), 209-212. doi.org/10.1016/0304-3940(79)90043-0
- Katz, R. J., Roth, K. A., & Carroll, B. J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *5*(2), 247-251. doi.org/10.1016/0149-7634(81)90005-1
- Kim, E. J., Kim, E. S., Covey, E., & Kim, J. J. (2010). Social transmission of fear in rats: the role of 22-kHz ultrasonic distress vocalization. *PloS One*, *5*(12), e15077. doi.org/10.1371/journal.pone.0015077

- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological Bulletin*, *128*(6), 961. dx.doi.org/10.1037/0033-2909.128.6.961
- Kohl, S., Wolters, C., Gruendler, T. O., Vogeley, K., Klosterkötter, J., & Kuhn, J. (2014). Prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in high functioning autism. *Plos One*, *9*(3), e92372.
- Komorowska, J., & Pellis, S. M. (2004). Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behavioural Processes*, *67*(2), 287-293. doi.org/10.1016/j.beproc.2004.05.001
- Komorowska, J., & Pisula, W. (2003). Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behavior in rats? *International Journal of Comparative Psychology*, *16*(4), 237-246.
- Kurihara, Y., Nishikawa, M., & Mochida, K. (2019). Behavioral responses to changes in group size and composition: a case study on grooming behavior of female Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*). *Behavioural Processes*, *162*, 142-146. doi.org/10.1016/j.beproc.2019.03.005
- Lazaro-Perea, C., de Fátima Arruda, M., & Snowden, C. T. (2004). Grooming as a reward? Social function of grooming between females in cooperatively breeding marmosets. *Animal Behaviour*, *67*(4), 627-636. doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.06.004
- Lee, S. W., & Schwarz, N. (2011). Wiping the slate clean: Psychological consequences of physical cleansing. *Current Directions in Psychological Science*, *20*(5), 307-311.
- Litvin, Y., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2007). Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behavioural Brain Research*, *182*(2), 166-172. doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.038
- Ludewig, K., & Vollenweider, F. X. (2002). Impaired sensorimotor gating in schizophrenia with deficit and with nondesic syndrome. *Swiss Medical Weekly*, *132*(13-14), 159-165.
- Ludewig, K., Geyer, M. A., Etzensberger, M., & Vollenweider, F. X. (2002). Stability of the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and habituation in schizophrenia. *Schizophrenia research*, *55*(1), 129-137.
- Massa, J., & O'Desky, I. H. (2011). Impaired visual habituation in adults with ADHD. *Journal of Attention Disorders*, 1087054711423621.
- Mackay-Sim, A., & Laing, D. G. (1980). Discrimination of odors from stressed rats by non-stressed rats. *Physiology & Behavior*, *24*(4), 699-704. doi.org/10.1016/0031-9384(80)90400-X
- Mackay-Sim, A., & Laing, D. G. (1981). Rat's responses to blood and body odors of stressed and non-stressed conspecifics. *Physiology & Behavior*, *27*(3), 503-510. doi.org/10.1016/0031-9384(81)90339-5

- Mason, G. (2006). Stereotypic behaviour in captive animals: fundamentals and implications for welfare and beyond. *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare*, 2, 325-56.
- McCall, R. B., & Carriger, M. S. (1993). A meta-analysis of infant habituation and recognition memory performance as predictors of later IQ. *Child Development*, 57-79.
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1), 2-15.
- McSweeney, F. K., & Murphy, E. S. (2009). Sensitization and habituation regulate reinforcer effectiveness. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (2), 189-198.
- Mikics, É., Barsy, B., Barsvári, B., & Haller, J. (2005). Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Hormones and Behavior*, 48(2), 152-162. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.02.002
- Miller, G. A. (2003). The cognitive revolution: a historical perspective. *Trends in Cognitive Sciences*, 7(3), 141-144.
- Mu, M. D., Geng, H. Y., Rong, K. L., Peng, R. C., Wang, S. T., Geng, L. T., ... & Ke, Y. (2020). A limbic circuitry involved in emotional stress-induced grooming. *Nature Communications*, 11(1), 1-16.
- Natusch, C., & Schwarting, R. K. W. (2010). Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 96(3), 251-259. doi.org/10.1016/j.pbb.2010.05.013
- Nosek, K., Dennis, K., Andrus, B. M., Ahmadiyeh, N., Baum, A. E., Woods, L. C. S., & Redei, E. E. (2008). Context and strain-dependent behavioral response to stress. *Behavioral and Brain Functions*, 4(1), 23. doi.org/10.1186/1744-9081-4-23
- Nyby, J., & Whitney, G. (1978). Ultrasonic communication of adult myomorph rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2, 1-14.
- Olatunji, B. O., Wolitzky-Taylor, K. B., Willems, J., Lohr, J. M., & Armstrong, T. (2009). Differential habituation of fear and disgust during repeated exposure to threat-relevant stimuli in contamination-based OCD: An analogue study. *Journal of Anxiety Disorders*, 23(1), 118-123.
- Oranje, B., & Glenthøj, B. Y. (2012). Clonidine normalizes sensorimotor gating deficits in patients with schizophrenia on stable medication. *Schizophrenia Bulletin*, 39(3), 684-691.

- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behavioural Brain Research*, *115*(1), 25-38. doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00238-2
- Paz-y-Miño, G., Leonard, S. T., Ferkin, M. H., & Trimble, J. F. (2002). Self-grooming and sibling recognition in meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, and prairie voles, *M. ochrogaster*. *Animal Behaviour*, *63*(2), 331-338. doi.org/10.1006/anbe.2001.1893
- Pendergrass, M. L., & Thiessen, D. D. (1981). Body temperature and autogrooming in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Behavioral and Neural Biology*, *33*(4), 524-528. doi.org/10.1016/S0163-1047(81)91977-4
- Poon, C. S., & Young, D. L. (2006). Nonassociative learning as gated neural integrator and differentiator in stimulus-response pathways. *Behavioral and Brain Functions*, *2*, 29. doi:10.1186/1744-9081-2-29
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *46*, 28-34.
- Prokop, P., Fančovičová, J., & Fedor, P. (2014). Parasites enhance self-grooming behaviour and information retention in humans. *Behavioural Processes*, *107*, 42-46. doi.org/10.1016/j.beproc.2014.07.017
- Purves, D., Brannon, E. M., Cabeza, R., Huettel, S. A., LaBar, K. S., Platt, M. L., & Woldorff, M. G. (2008). *Principles of Cognitive Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Quartermain, D., Stone, E. A., & Charbonneau, G. (1996). Acute stress disrupts risk assessment behavior in mice. *Physiology & Behavior*, *59*(4-5), 937-940. doi.org/10.1016/0031-9384(95)02140-X
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola G., Geyer, M., Glanzman, D., Marsland, S., MsSeeney, F., Wilson, D., Wu, F & Thompson, R.F. (2009). Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*(2), 135-138.
- Rasheed, N., Ahmad, A., Pandey, C. P., Chaturvedi, R. K., Lohani, M., & Palit, G. (2010). Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. *Neurochemical Research*, *35*(1), 22-32. doi.org/10.1007/s11064-009-0026-5
- Reber, A., Purcel, J., Buechel, S. D., Buri, P., & Chapuisat, M. (2011). The expression and impact of antifungal grooming in ants. *Journal of Evolutionary Biology*, *24*(5), 954-964. doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02230.x

- Roberts, W. W. (1988). Differential thermosensor control of thermoregulatory grooming, locomotion, and relaxed postural extension. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *525*(1), 363–374.
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1993). Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiology & Behavior*, *53*(2), 383-388. doi.org/10.1016/0031-9384(93)90222-2
- Rojas-Carvajal, M., Sequeira-Cordero, A., & Brenes, J. C. (2020). Neurobehavioral effects of restricted and unpredictable environmental enrichment in rats. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 674. doi.org/10.3389/fphar.2020.00674
- Rojas-Carvajal, M., Fornaguera, J., Mora-Gallegos, A., & Brenes, J. C. (2018). Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. *Animal Behaviour*, *137*, 225-235. doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.01.018
- Rojas-Carvajal, M., Méndez, B., Fornaguera, J., & Brenes, J. C. (2016). *Environmental and pharmacological modulation of novelty habituation in rats: The rising of self-grooming as a de-arousal indicator* [Poster presented at the 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience]. San Diego, CA: Society for Neuroscience. doi.org/10.13140/RG.2.2.20410.80326
- Rojas-Carvajal, M., Quesada-Yamasaki, D., & Brenes, J.C. (en preparación). Cage test: An easy way to screen and evaluate spontaneous activity in preclinical neuroscience.
- Rojas-Carvajal, M., Rodríguez-Villagra, O., Sequeira, A., Fornaguera, J., & Brenes, J.C. (2017). *Habituation and spatial memory in the context of emotional regulation: Behavioral, neurochemical and genetic mechanisms underlying context information-processing and de-arousal grooming*. Society for Neuroscience - 47th Annual Meeting. Washington, D.C.
- Rosengaus, R. B., Jordan, C., Lefebvre, M. L., & Traniello, J. F. A. (1999). Pathogen alarm behavior in a termite: a new form of communication in social insects. *Naturwissenschaften*, *86*(11), 544-548. doi.org/10.1007/s001140050672
- Roth, K. A., & Katz, R. J. (1979). Stress, behavioral arousal, and open field activity - A reexamination of emotionality in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *3*(4), 247-263. doi.org/10.1016/0149-7634(79)90012-5
- Roth, K. A., & Katz, R. J. (1980). Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *3*(4), 247-263.

- Sampedro-Piquero, P., Álvarez-Suárez, P., Moreno-Fernández, R. D., García-Castro, G., Cuesta, M., & Begega, A. (2018). Environmental Enrichment Results in Both Brain Connectivity Efficiency and Selective Improvement in Different Behavioral Tasks. *Neuroscience*, *388*, 374-383. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.036
- Sanderson, D. J., Good, M. A., Skelton, K., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2009). Enhanced long-term and impaired short-term spatial memory in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice: evidence for a dual-process memory model. *Learning & memory*, *16*(6), 379-386.
- Schino, G. (2001). Grooming, competition and social rank among female primates: A meta-analysis. *Animal Behaviour*, *62*(2), 265-271. doi.org/10.1006/anbe.2001.1750
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 80-89.
- Schwarting, R. K. W., Jegan, N., & Wöhr, M. (2007). Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, *182*, 208-222. doi.org/10.1016/j.bbr.2007.01.029
- Seyfarth, R. M. (1980). The distribution of grooming and related behaviors among adult female vervet monkeys. *Animal Behaviour*, *28*(3), 798-813.
- Sherry, D. F., & Schacter, D. L. (1987). The evolution of multiple memory systems. *Psychological Review*, *94*(4), 439.
- Shi, S. S., Shao, S. H., Yuan, B. P., Pan, F., & Li, Z. L. (2010). Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei Medical Journal*, *51*(5), 661-671. doi.org/10.3349/ymj.2010.51.5.661
- Shimozuru, M., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2006). Social-defeat stress suppresses scent-marking and social-approach behaviors in male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Physiology & Behavior*, *88*(4-5), 620-627. doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.018
- Silverman, J. L., Tolu, S. S., Barkan, C. L., & Crawley, J. N. (2010). Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropsychopharmacology*, *35*(4), 976-989.

- Song, C., Berridge, K. C., & Kalueff, A. V. (2016). 'Stressing' rodent self-grooming for neuroscience research. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(9), 591-591.
- Spradley, J. M., Davoodi, A., Carstens, M. I., & Carstens, E. (2012). Opioid modulation of facial itch-and pain-related responses and grooming behavior in rats. *Acta Dermato-Venereologica*, *92*(5), 515-520.
- Spruijt, B. V., Van Hooff, J. A., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, *72*(3), 825-852. doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825
- Stanford, S. C. (2007). The open field test: reinventing the wheel. *Journal of Psychopharmacology*, *21*(2), 134-136.
- Stevens, D. A., & Köster, E. P. (1972). Open-field responses of rats to odors from stressed and nonstressed predecessors. *Behavioral Biology*, *7*(4), 519-525.
- Swartz, J. R., Wiggins, J. L., Carrasco, M., Lord, C., & Monk, C. S. (2013). Amygdala habituation and prefrontal functional connectivity in youth with autism spectrum disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, *52*(1), 84-93.
- Taylor, J. L., Rajbhandari, A. K., Berridge, K. C., & Aldridge, J. W. (2010). Dopamine receptor modulation of repetitive grooming actions in the rat: potential relevance for Tourette syndrome. *Brain Research*, *1322*, 92-101.
- Taylor, J. O., Urbano, C. M., & Cooper, B. G. (2017). Differential patterns of constant frequency 50 and 22 kHz USV production are related to intensity of negative affective state. *Behavioral Neuroscience*, *131*(1), 115. dx.doi.org/10.1037/bne0000184
- Thiessen, D. D. (1988). Body temperature and grooming in the Mongolian gerbil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *525*(1), 27-39.
- Tinbergen, N. (1952). "Derived" activities; Their causation, biological significance, origin, and emancipation during evolution. *The Quarterly Review of Biology*, *27*(1), 1-32. doi.org:10.1086/398642
- Tinbergen, N. (1952). "Derived" activities; their causation, biological significance, origin, and emancipation during evolution. *Quarterly Review of Biology*, *27*(1), 1-32.
- van Erp, A. M., Kruk, M. R., Meelis, W., & Willekens-Bramer, D. C. (1994). Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*, *65*(1), 47-55. doi.org/10.1016/0166-4328(94)90072-8

- Veloso, A. W. N., Filgueiras, G. B., Lorenzo, P., & Estanislau, C. (2016). Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. *Psychology & Neuroscience, 9*(1), 91. dx.doi.org/10.1037/pne0000038
- Vos, B. P., Hans, G., & Adriaensen, H. (1998). Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. *Pain, 76*(1-2), 173-178. doi.org/10.1016/S0304-3959(98)00039-6
- Welker, W. I. (1957). "Free" versus "forced" exploration of a novel situation by rats. *Psychological Reports, 3*(1), 95-108.
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. W., & Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology and Behavior, 93*, 766-776. doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.031.
- Zangrossi Jr, H., & File, S. E. (1992). Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Research Bulletin, 29*(3-4), 381-388. doi.org/10.1016/0361-9230(92)90072-6
- Zhang, C., Kalueff, A. V., & Song, C. (2019). Minocycline ameliorates anxiety-related self-grooming behaviors and alters hippocampal neuroinflammation, GABA and serum cholesterol levels in female Sprague-Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Behavioural Brain Research, 363*, 109-117. doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.045
- Zhuang, X., Oosting, R. S., Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Miller, G. W., Caron, M. G., & Hen, R. (2001). Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*(4), 1982-1987.
- Zimmermann, A., Stauffacher, M., Langhans, W., & Würbel, H. (2001). Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behavioural Brain Research, 121*(1-2), 11-20. doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00377-6