



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

El pez cebra (*Danio rerio*) como especie modelo para estudios de comportamiento

Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species for behavioral studies

Autor: Óscar López Domínguez

Tutora: Vanesa Robles Rodríguez

Co-tutor: David García Valcarce

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2022

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN:	1
MODELO DE COMPORTAMIENTO	2
MÉTODOS DE ANÁLISIS COMPORTAMIENTO INDIVIDUAL DE ADULTOS	4
Novel Tank Test (NTT).....	4
Light Dark Test (LDT)	6
Test de agresividad.....	7
Test de depredador	8
Laberintos	9
ESTRÉS	10
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Cría de peces	12
Marcaje	12
Diseño experimental.....	12
Inducción de estrés.....	12
NTT	13
Análisis del vídeo.....	13
Estadística	14
RESULTADOS	15
Cinética.....	15
Preferencia de zona.....	15
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXO I: MAPAS DE CALOR INDIVUALES	28

RESUMEN

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie muy utilizada como modelo en investigación. Concretamente, es de gran interés el estudio del comportamiento individual de los ejemplares adultos mediante la utilización de técnicas como: novel tank test (NTT), light dark test (LDT), test de agresividad, test de depredador o el uso de laberintos. Uno de los aspectos más estudiados mediante estos métodos es la evaluación de los niveles de ansiedad y estrés. En el presente trabajo se ha podido validar la eficacia de un protocolo de inducción de estrés en pez cebra en el que se ha reducido la exposición al estresor. Para la evaluación del nivel de estrés y la cuantificación de diferencias en el comportamiento se ha utilizado un análisis NTT en dos y tres áreas en el que se estudió tanto la cinética como la preferencia de zona. Esta subdivisión ha aumentado la precisión del análisis al reducir las zonas de mayor y menor ansiedad, evitando la inclusión de zonas intermedias donde no se observaron diferencias significativas en la permanencia de los peces. La optimización de los protocolos de inducción de estrés permite una disminución del sufrimiento animal, lo cual es un aspecto de gran importancia al reducir las implicaciones éticas y contribuir al bienestar del animal; a la vez que posibilita una mejora de la investigación de la ansiedad y el estrés, patologías cada vez más frecuentes en la sociedad.

Palabras clave: ansiedad, comportamiento, *Danio rerio*, estrés, modelo, NTT.

ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) is a species widely used as a model in research. Specifically, it is of great interest to study the individual behavior of adult specimens through the use of techniques such as: novel tank test (NTT), light dark test (LDT), aggressiveness test, predator test or the use of mazes. One of the most studied aspects using these methods is the evaluation of anxiety and stress levels. In the present work, it has been possible to validate the efficacy of a stress induction protocol in zebrafish in which exposure to the stressor has been reduced. For the evaluation of the stress level and the quantification of differences in behavior, an NTT analysis in two and three zones was used in which both the kinetics and the zone preference were studied. This subdivision has increased the precision of the analysis by reducing the zones of greatest and least anxiety, avoiding the inclusion of intermediate zones where no significant differences were observed in the permanence of the fish. The optimization of stress induction protocols allows a reduction in animal suffering, which is an aspect of great importance as it reduces ethical implications and contributes to the animal welfare. At the same time, it enables an improvement in the investigation of anxiety and stress, pathologies that are increasingly frequent in society.

Keywords: anxiety, behavior, *Danio rerio*, model, NTT, stress

INTRODUCCIÓN:

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez dulceacuícola, miembro de la familia *Cyprinidae*, presente en aguas continentales asiáticas, principalmente en el noreste de la India, Bangladesh y Nepal (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008). Existen registros de esta especie en otros continentes, presumiblemente debidos al escape de acuarios personales, ya que su popularidad como pez ornamental ha aumentado considerablemente en los últimos tiempos (Spence *et al.*, 2008).

Su uso como modelo biológico se ha incrementado mucho en los últimos años debido a sus características. Su mantenimiento en laboratorio es fácil y económico, al ser un animal de pequeño tamaño y propio de un hábitat sencillo no muy difícil de replicar. Varias de sus ventajas son su fertilización externa, su corion transparente y su patrón de desarrollo, que permiten observar y manipular los embriones más fácilmente que en otros organismos (Saleem y Kannan, 2018). Otro aspecto importante es su prolificidad, ya que las hembras, una vez llegan a su madurez sexual, son capaces de poner varios cientos de huevos semanalmente, permitiendo una sencilla renovación de las colonias. Tanto su desarrollo embrionario como su crecimiento son rápidos, teniendo un tiempo de generación de 3-4 meses aproximadamente. Además, permanecen sexualmente activos la mayor parte de su vida (entre 4 y 5 años) (Yu *et al.*, 2006; Kalueff *et al.*, 2014). En estudios de biología del desarrollo presentan la gran ventaja de la transparencia de los embriones, lo que permite monitorizar los primeros estadios de desarrollo. De esta forma, es posible el seguimiento de la expresión génica de interés mediante la utilización de distintos marcajes, sin tener que recurrir a técnicas invasivas (Saleem y Kannan, 2018). Este pez también se ha utilizado para la creación de modelos de enfermedades mediante el uso de las distintas técnicas de edición génica, que permiten realizar modificaciones genómicas precisas, como CRISPR/Cas9, ZFN o TALEN (Hwang *et al.*, 2013; Busse *et al.*, 2020; Raby *et al.*, 2020). Además, también es importante mencionar que el uso de un pez como especie modelo tiene menos implicaciones éticas que el uso de un mamífero como el ratón (Arjmand *et al.*, 2020).

Una ventaja muy importante en su uso como animal modelo para estudios de comportamiento, farmacológicos, de regeneración u otros, es su genoma. Consta de 25 pares de cromosomas y unos 26.000 genes codificantes para proteínas (Howe *et al.*, 2013). Análisis bioinformáticos de alineamiento confirmaron que un 71,4% de los genes humano presentan un ortólogo en el pez cebra, y un 69% de los del pez cebra en los humanos. En el caso concreto de

genes relacionados con enfermedades humanas, la cifra de genes ortólogos en el pez cebra ascendió a un 82% (Howe *et al.*, 2013).

MODELO DE COMPORTAMIENTO

El uso del pez cebra como modelo para estudios de comportamiento es debido a las características mencionadas anteriormente, así como a su red neuronal, su sistema nervioso y a la existencia de técnicas estandarizadas que permiten llevar a cabo una monitorización precisa. En estos estudios, se analizan peces en diferentes estadios: adulto, juvenil, alevín o larvario, adaptando los sistemas de evaluación al momento de desarrollo estudiado (Stewart *et al.*, 2011). Así, se han podido realizar estudios sobre fenotipos neuroconductuales y sobre patologías (autismo, esquizofrenia, epilepsia, etc.) que afectan a los humanos de forma similar que a estos peces (Best y Alderton, 2008; Meshalkina *et al.*, 2018; Gawel *et al.*, 2019; Yaksi *et al.*, 2021).

En cuanto a la estructura cerebral, existen algunas diferencias respecto a los humanos, como que sus hemisferios cerebrales son de menor tamaño y el desarrollo del telencéfalo y el mesodiencefalo es diferente (Panula *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de la existencia de ciertas divergencias, también existen numerosas similitudes entre ambas especies que permiten el uso del pez cebra como modelo. Este posee las capacidades sensoriales de los humanos: oído, vista, olfato, tacto, equilibrio y gusto (Tropepe y Sive, 2003). Otra similitud con los humanos es que comparten algunos neurotransmisores en común (dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina, acetilcolina y orexina/hipocretina), así como enzimas y transportadores, además de presentar los dominios cerebrales principales característicos de los mamíferos (Tropepe y Sive, 2003; Anichtchik *et al.*, 2006; Panula *et al.*, 2006, 2010; Chen *et al.*, 2009; Lucini *et al.*, 2018). Sabiendo esto, se estableció su uso como modelo para el estudio de enfermedades mentales, ya que se han caracterizado en peces cebra (tanto adultos como larvas) los mediadores más importantes de estas patologías: glutamato, ácido γ -aminobutírico, acetilcolina, así como los neurotransmisores aminérgicos mencionados anteriormente (Stewart *et al.*, 2015). También presenta un sistema neuroendocrino similar al de los mamíferos, con cascadas hormonales parecidas que regulan distintas patologías en humanos tales como el estrés, el cual ha sido sujeto de muchos estudios en estos peces (Piato *et al.*, 2011; Pippal *et al.*, 2011; Griffiths *et al.*, 2012; Ziv *et al.*, 2013). Además, *Danio rerio* es sensible a los fármacos, lo que posibilita su estudio, permitiendo realizar aproximaciones sobre farmacología y como afectan los medicamentos al comportamiento de estos animales (Kalueff *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que la utilización del pez cebra como modelo para estudios de comportamiento social también es posible. El comportamiento y las interacciones sociales de los humanos dependen de la corteza cerebral, así como de regiones subcorticales, las cuales están muy conservadas en los mamíferos (Adolphs, 2003). Teniendo como base diversos estudios neuroendocrinos y de comportamiento, se ha propuesto la existencia de una red de comportamiento social (SBN). Esta red estaría compuesta por distintos nodos o zonas del cerebro altamente conservadas, de forma que cada uno de estos nodos respondería de forma distinta a los estímulos sociales (Geng y Peterson, 2019).

Este SBN estaría conformado por los seis nodos cerebrales que propuso Newman en 1999: tabique lateral (LS), el área preóptica (POA), el hipotálamo ventromedial (VMH), el hipotálamo anterior (AH), la sustancia gris central o periacueductual (PAG/CG), la amígdala medial (meAMY) y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST). Estos tendrían un papel clave en el comportamiento sexual, agresivo y parental, y todos ellos estarían conectados entre sí, como se muestra en la Figura 1 (Newman, 1999).

En otros estudios se postuló que, además de este SBN, también existe un sistema de recompensa mesolímbico (MRS). El MRS también estaría formado por distintas zonas cerebrales, tales como el área tegmental ventral (VTA), compartiendo alguno de los nodos con el SBN, en concreto el LS, el BNST y la meAMY, como se puede observar en la Figura 1. De esta forma, ambas redes trabajan de forma coordinada en la regulación del comportamiento social (O'Connell y Hofmann, 2011). Este sistema se encarga de evaluar los estímulos recibidos según su memoria de vida, es decir, según la experiencia adquirida, y establece si estos serán positivos o negativos para el individuo. Además, el MRS incluye el sistema dopaminérgico mesoencefálico, de gran utilidad para estudios de adicción o depresión (O'Connell y Hofmann, 2011; Kabelik *et al.*, 2018).

Estos dos sistemas trabajarían juntos, conformando una red más grande que se encarga de la toma de decisiones sociales (SDM), conservada tanto en los peces cebra como en los seres humanos, y que controlaría los estímulos y decisiones relativas al comportamiento social (O'Connell y Hofmann, 2011, 2012; Geng y Peterson, 2019).

Sobre la conservación de este sistema en vertebrados se han realizado multitud de estudios, comparando la neuroquímica cerebral de aves, mamíferos, teleósteos (pez cebra), reptiles y anfibios, llegando a la conclusión de que la estructura fundamental se mantiene (O'Connell y Hofmann, 2012).

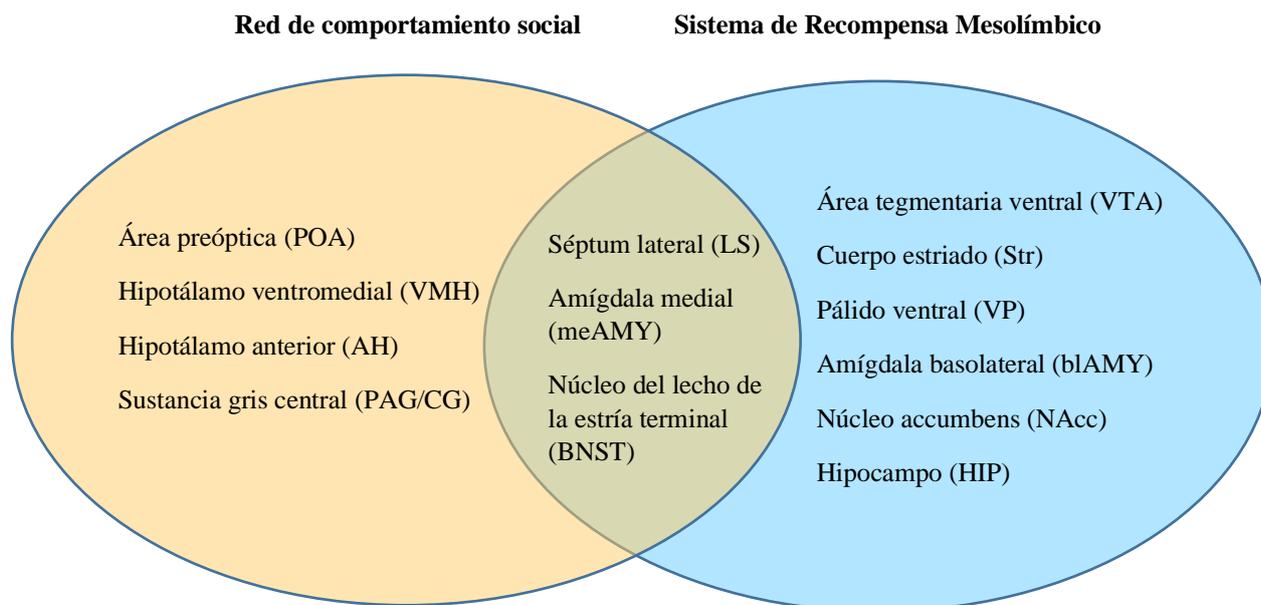


Figura 1. Esquema del Sistema de toma de decisiones (SDM), en el que se incluyen las zonas cerebrales que forman la Red de comportamiento social (SBN) (izquierda), el Sistema de Recompensa Mesolímbico (MRS) (derecha) y las que comparten ambas redes (centro). Basado en O'Connell y Hofmann, 2011.

MÉTODOS DE ANÁLISIS COMPORTAMIENTO INDIVIDUAL DE ADULTOS

El comportamiento del pez cebra, tanto el individual como el relativo a las interacciones sociales, se ha estudiado y definido ampliamente. El objetivo de la comunidad científica durante años ha sido crear un registro al cual poder acudir para entender cualquier comportamiento de este pez, ya sea en estado larvario o adulto (Egan *et al.*, 2009; Kalueff *et al.*, 2013). A continuación, se describen los principales métodos existentes para estudiar el comportamiento individual en estado adulto:

Novel Tank Test (NTT)

El NTT es una de las pruebas más utilizadas para observar, habitualmente mediante grabación, el comportamiento individual de peces cebra adultos. Esta técnica se puede considerar análoga a la prueba de campo abierto que se utiliza en ratones (Mocelin *et al.*, 2019). Se basa en la tendencia del animal a buscar protección en un entorno desconocido, sumergiéndose y permaneciendo en el fondo del tanque (geotaxis) mientras se aclimata a un nuevo entorno (“novel tank”) (Egan *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010; Cachat *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2011). Este es un tanque transparente (para poder realizar la grabación) que tiene que permitir el movimiento en vertical y horizontal sobre el lateral, ya que este último la cámara no lo capta. Suele tener forma de trapecioide o rectangular, un volumen variable y se suele dividir,

de forma virtual, en 2 partes (superior e inferior), aunque en ciertos estudios se divide en 3 partes (superior, medio e inferior) o más, siendo esto adaptable a la investigación que se va a realizar y la complejidad deseada (Levin *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2011; Kysil *et al.*, 2017). Un ejemplo ilustrativo de un experimento básico de NTT, con una división del tanque en 3 partes, está representado en la Figura 2.

Para obtener unos resultados fiables y reproducibles, hay que tener en cuenta ciertas consideraciones al realizar el estudio. Es importante que el tanque esté sobre una superficie estable y nivelada, para evitar que un posible movimiento interfiera en el estudio, y que todas las partes del tanque tengan la misma iluminación. Además, los peces deben llevar a cabo una aclimatación a la habitación donde se va a realizar la prueba. Otro aspecto a tener en cuenta es que, en el caso de que se estén estudiando varios peces a la vez en el mismo laboratorio, estos no pueden ser visibles entre ellos, ya que esto podría alterar su comportamiento. También es esencial que el agua que vaya a contener el tanque provenga de la misma fuente que donde estaban los peces, con el fin de evitar variaciones de temperatura o salinidad que puedan interferir en el estudio. Se ha demostrado que las condiciones en la que los peces han sido alojados de forma previa al experimento tiene efectos en los resultados de esta prueba, por lo que es importante que todos hayan estado en las mismas condiciones (Egan *et al.*, 2009; Cachat *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2012).

El estudio de la natación de los peces se realiza mediante una grabación del movimiento y un posterior análisis mediante un software de análisis de imagen-video. Esto se puede realizar también de forma manual, pero se cometen muchos más errores que con las herramientas de análisis de video disponibles en la actualidad. De esta forma se puede calcular el tiempo pasado por el individuo en cada una de las zonas en las que se ha dividido el tanque de forma virtual, el número de entradas en la parte superior, la latencia de la primera entrada y la cantidad de movimientos erráticos y de inmovilización; así como la velocidad media y la distancia total recorrida (Levin *et al.*, 2007; Speedie y Gerlai, 2008; Egan *et al.*, 2009; Stewart, *et al.*, 2010). A partir de estos valores, y una vez analizados los resultados, se puede establecer el fenotipo y comportamiento del pez que se está estudiando.

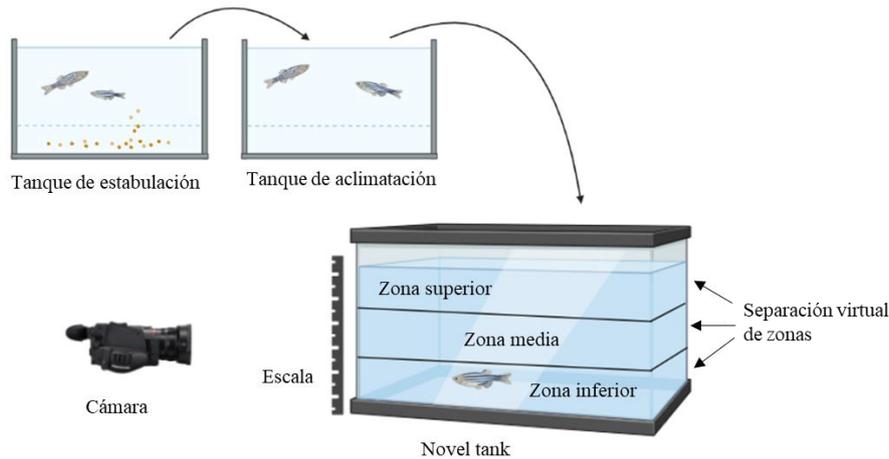


Figura 2. Esquema de un experimento de NTT donde se indican las distintas partes. Elaborado con BioRender.com

Light Dark Test (LDT)

Otro de los métodos más utilizados es el LDT. Este es muy utilizado en ratones, y está basado en la aversión de los mismos a las zonas iluminadas. Se ha demostrado que los peces cebra también tienen preferencia por las zonas menos iluminadas, por lo que esta clase de test es trasladable a esta especie (Stewart *et al.*, 2010). Esta preferencia se denomina escototaxis (Maximino *et al.*, 2010b). La primera vez que se describió esta preferencia en el pez cebra fue en 1999, en un estudio en el que se introdujeron los peces, de forma individual, en un acuario con una zona con paredes blancas y otra con paredes negras, pasando más tiempo en la segunda que en la primera (Serra *et al.*, 1999).

La versión estandarizada de este método consta de un tanque rectangular dividido en 2 partes: una zona iluminada y otra oscura. Para conseguir esto, se han utilizado diversos métodos: utilizar paredes de distintos colores (Serra *et al.*, 1999), dejar que a una zona entre la iluminación y cubriendo la otra (Gerlai, 2003), usar un tanque de paredes transparentes con el suelo blanco y negro (Sackerman *et al.*, 2010) o tener una parte del tanque de color negro, la otra de blanco y el suelo de gris (Blaser *et al.*, 2010). Este último es el diseño que aparece en la Figura 3. Para realizar esta prueba hay que tener en cuenta lo descrito anteriormente en el NTT (aclimatación, estabilidad, luz, parámetros del agua, etc). En el protocolo, el pez se coloca en una zona intermedia de color gris entre la zona iluminada y no iluminada, que están separadas por 2 puertas correderas. Una vez haya pasado el tiempo de aclimatación del pez, se levantarán las puertas a la vez para permitir al ejemplar moverse con libertad por ambas zonas. En este test se puede medir múltiples variables: la proporción de tiempo que está en cada zona, la elección del primer compartimento, las veces que entra y la duración de cada entrada, la distancia

recorrida en cada una, así como la duración del movimiento, la velocidad del mismo, las veces que se queda inmóvil y la ratio de giro, además de variables adicionales según el estudio que se quiera llevar a cabo. También se mide la distancia media entre el pez y la pared, que es una medida de tigmotaxis. Estos datos son obtenidos a partir de una cámara cenital que proporciona un vídeo que es procesado posteriormente con un software (Blaser *et al.*, 2010; Maximino *et al.*, 2010b). Con este test se evalúan ansiedad, miedo y estrés, siendo mayor la ansiedad cuanto más tiempo pase en la zona oscura y menor cuanto más tiempo esté en la clara (Blaser y Peñalosa, 2011; Fontana *et al.*, 2021).

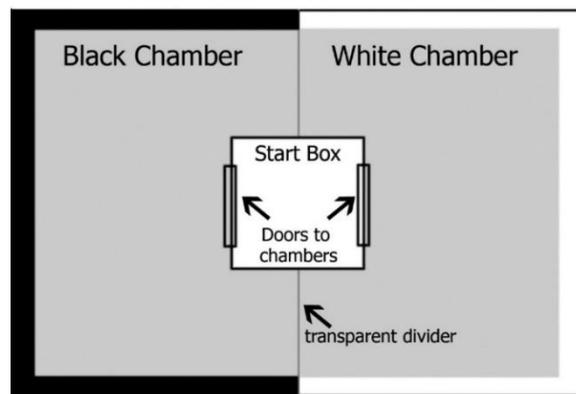


Figura 3. Esquema de un tanque de LDT (Blaser *et al.*, 2010).

Test de agresividad

La agresividad del pez cebrá se puede estudiar sometiendo al pez a distintos estímulos. Estos están basados en que, ante una situación de encuentro de dos peces, se puede inducir una respuesta de agresión. Una de las posibilidades para evaluar este comportamiento es poner un espejo en un extremo del tanque, de forma que el pez se vea reflejado y tenga una respuesta agresiva, ya que cuanto más cerca del espejo nade más próxima va a estar su imagen reflejada (Gerlai *et al.*, 2000). De esta manera, se graban con una cámara los distintos movimientos y comportamientos, y, posteriormente, mediante un análisis de video se pueden evaluar. Para esto, se divide el tanque en distintas zonas mediante líneas verticales, estableciendo zonas distales y proximales al espejo (Gerlai *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2016). En algunos experimentos, el resto del tanque se cubre con superficies opacas para evitar que el pez se distraiga con otros estímulos (Canzian *et al.*, 2019). Además, se pueden cuantificar los comportamientos y exhibiciones de agresividad. La exhibición es la adopción de una postura en la cual erige su aleta dorsal, pectoral, caudal y anal. Los comportamientos agresivos son los movimientos hacia el espejo, que pueden incluso ir acompañados de una carga contra la pared, la apertura de la boca y un intento de mordisco (Gerlai *et al.*, 2000; Kalueff *et al.*, 2013).

También es de importante mención que el espejo se puede introducir antes o después de que se disponga el pez en el tanque. En el primer caso el pez se expone a un entorno nuevo tanto de tanque como de espejo, lo cual potencialmente provoca una mayor ansiedad. En el segundo caso ha habido una aclimatación previa al entorno, por lo que al introducir el espejo la respuesta es esencialmente al espejo, y se puede ver la territorialidad del animal (Pham *et al.*, 2012).

Una vez el comportamiento ha sido grabado en vídeo se puede pasar a la realización del análisis mediante distintos software. De esta forma, se analiza el tiempo que pasa en cada zona del tanque, el número de comportamientos agresivos, la duración de cada uno y la media de estos, la latencia de ataque y la distancia media entre el pez y el espejo. También se miden los parámetros de locomoción como distancia recorrida y velocidad, así como el número de entradas en cada área (Fontana *et al.*, 2016; Michelotti *et al.*, 2018; Canzian *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2020).

Test de depredador

Este método es utilizado para estudiar las respuestas relacionadas con el miedo y ansiedad de un pez en respuesta al estímulo de un depredador (Gerlai *et al.*, 2009). Esto se puede conseguir mediante un vídeo en que se vea a un depredador del pez cebrá en movimiento, como puede ser el pez hoja de la India (*Nandus nandus*) (Gerlai *et al.*, 2009) o el pez oscar tigre rojo (*Astronotus ocellatus*) (Ladu *et al.*, 2015). El comportamiento del pez en respuesta a este estímulo se estudia mediante un seguimiento en vídeo (Gerlai *et al.*, 2009). Sin embargo, esta respuesta es menor que cuando el pez se expone a un depredador vivo, lo cual representa una pequeña limitación del estudio (Ladu *et al.*, 2015). A pesar de que la respuesta no es exactamente la misma, se prefiere no utilizar depredadores vivos por problemas metodológicos y éticos (Clément *et al.*, 2020). En los últimos años se han desarrollado robots similares a depredadores como garzas (Clément *et al.*, 2020) o peces hoja indios (Ladu *et al.*, 2015), ofreciendo una alternativa a la exposición virtual al depredador.

Tras la grabación del movimiento del pez cebrá sometido al estímulo del depredador se realiza el análisis del video y se determinan parámetros como la distancia a la que se sitúa el pez cebrá de la imagen del depredador (reacción de escape) y la distancia entre el pez y el fondo del tanque (previsiblemente estará mayor tiempo en el fondo como respuesta al estímulo del depredador). Como en el caso de las anteriores pruebas también se estudian los aspectos de locomoción (velocidad media y variabilidad de esta en el tiempo, distancia recorrida,

movimientos erráticos, paradas, etc.) mediante un software destinado a ello, que también sirve para medir las distancias a la pantalla y fondo (Gerlai *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2011).

Laberintos

Este es otro método utilizado para evaluar el comportamiento de los peces cebra. Antes del estudio en este modelo, esta prueba se realizaba en ratas, en las cuales se medía su ansiedad y su respuesta a diversos fármacos (Pellow *et al.*, 1985). En el caso del pez cebra se han utilizado principalmente, aunque existen otros diseños alternativos, tres tipos de laberintos: en forma de Y, en forma de T y en forma de cruz, representados en la Figura 4. En estos también se evalúa la ansiedad, además del aprendizaje espacial y la memoria (Hieu *et al.*, 2020; Benvenuti *et al.*, 2021).

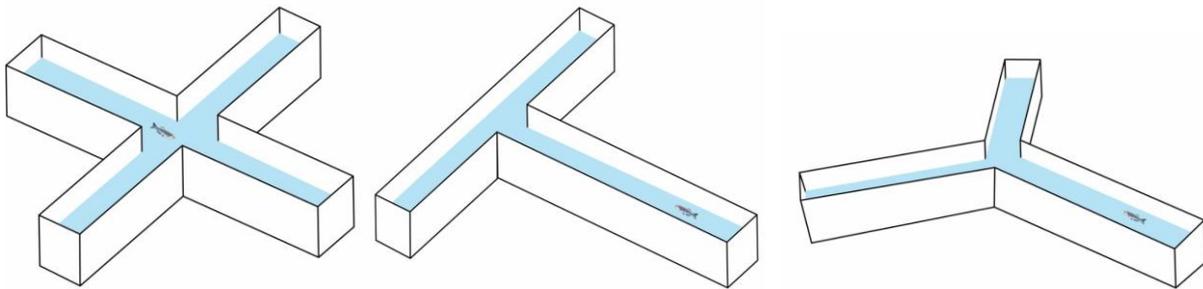


Figura 4. Esquema de los laberintos más utilizados. De izquierda a derecha: en forma de cruz, en forma de T y en forma de Y (Benvenuti *et al.*, 2021).

En esta prueba se mide el número de entradas y el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos, así como los parámetros cinéticos (distancia y velocidad media) y otros aspectos (ángulo de giro, posición del cuerpo, etc.). Estos brazos suelen presentar distintas condiciones como puede ser una diferente entrada de luz, inhabilitación de un brazo en una primera ronda y apertura en una segunda, distinta profundidad o la presencia de un hábitat favorable o una recompensa al final de uno de los brazos (Darland y Dowling, 2001; Cognato *et al.*, 2012). Estas distintas condiciones permiten evaluar el comportamiento del pez cebra. El habitual es el de evitar la depredación, buscando las zonas más profundas y oscuras, así como las condiciones más favorables (Maximino *et al.*, 2010a; Benvenuti *et al.*, 2021).

Todas estas pruebas mencionados anteriormente (NTT, LDT, test de depredación, test de agresividad y laberintos) tienen como gran ventaja que los peces que se sumergen en los tanques destinados a las mismas pueden haber sido previamente tratados con diversos fármacos o sustancias. Esta exposición se realiza habitualmente por inmersión, aunque en casos concretos en los que esto no sea posible, se recurre a la inyección intraperitoneal de pequeños volúmenes.

Esto permite el análisis de los efectos de los compuestos a testar en el comportamiento del animal, posibilitando la realización de un amplio espectro de diseños experimentales con diversos fines (Cachat *et al.*, 2010).

ESTRÉS

Uno de los parámetros más estudiados a partir del comportamiento del pez cebra es el de respuesta al estrés. Esta es una respuesta adaptativa ante una amenaza real o percibida que busca mantener el equilibrio normal (Clark *et al.*, 2011). El estrés puede ser definido como la suma de reacciones a nivel neuronal, endocrina y autónoma ante un factor estresante (adversidad) que pueda perturbar a un individuo (Golla *et al.*, 2020). Dentro de esta respuesta hay dos tipos: el estrés agudo y el estrés crónico. El estrés agudo se corresponde con la activación de la respuesta ante un entorno cambiante. Si esta activación se produce de forma repetida, el estrés se convierte en crónico y tiene más implicaciones en la salud, provocando desregulaciones en diferentes rutas y aumentando la vulnerabilidad a padecer depresión y trastornos de ansiedad (McEwen, 2007; Nugent *et al.*, 2011; Pechtel y Pizzagalli, 2011; Danese y McEwen, 2012; Van Bodegom *et al.*, 2017; Golla *et al.*, 2020).

El principal producto de la ruta fisiológica de los procesos relacionados con el estrés es el cortisol, que se encarga de restablecer la homeostasis. Esta molécula se encuentra tanto en peces cebra como en humanos (Barcellos *et al.*, 2007). La síntesis y secreción del cortisol en peces la lleva a cabo el tejido interrenal, análogo de la corteza suprarrenal de los mamíferos (Wendelaar Bonga, 1997).

Para poder llevar a cabo la señalización de los corticosteroides son necesarios los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, conservados en vertebrados. En el caso concreto de los peces cebra, estos tienen 2 receptores de glucocorticoides. Esto es probable que sea debido a la duplicación del genoma ocurrida hace, aproximadamente, 350 millones de años (Alsop y Vijayan, 2008). Esta ruta está regulada por el eje hipotálamo-pituitario-interrenal (HPI) de los peces cebra, altamente conservado en los organismos vertebrados, y que, en el caso de los mamíferos, se corresponde con el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Estos ejes reciben los estímulos estresantes, que, en el caso de los peces cebra se procesan en el núcleo preóptico hipotalámico, y en el de los mamíferos en el núcleo paraventricular del hipotálamo, siendo ambos análogos. Como en el caso de otros vertebrados, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) es la principal hormona que estimula la activación de la ruta que desemboca en la producción y secreción de cortisol en respuesta a un estresor (Flik *et al.*, 2006; Alsop y Vijayan,

2009; Steenbergen *et al.*, 2011). Todas estas similitudes entre en pez cebra y humano, han hecho que este animal se haya usado como especie modelo en experimentos de análisis de estrés.

La evaluación de estos comportamientos es muy relevante en muchas áreas de investigación y ha permitido aumentar nuestra comprensión de la neuroregulación del comportamiento humano y su papel en los trastornos neuropsiquiátricos (Benvenuti *et al.*, 2021). Para el estudio se suele recurrir al NTT. El patrón habitual en esta prueba es que los peces comiencen permaneciendo en la parte inferior del tanque y, a medida que pasa el tiempo y aumente su sensación de seguridad, exploren zonas superiores (Levin *et al.*, 2007). De esta forma, cuanto mayor sea el tiempo que el pez pase en la parte baja del tanque, mayor será la ansiedad o estrés del pez. Los movimientos erráticos (cambios bruscos en la dirección o la velocidad) y la inmovilización (ausencia de movimiento, exceptuando branquias y ojos, durante 1 segundo como mínimo) también se relacionan con el estrés en estos animales (Egan *et al.*, 2009; Cachat *et al.*, 2010; Horzmann y Freeman, 2018). En muchos casos se puede recurrir al LDT para estudiar esta respuesta, en los que la permanencia en la zona oscura se asocia a una mayor ansiedad y estrés (Serra *et al.*, 1999). También se han realizado estudios de ansiedad y estrés mediante la utilización de laberintos y mediante un test de depredador (Gerlai *et al.*, 2009; Connors *et al.*, 2014; Hieu *et al.*, 2020; Benvenuti *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2022).

Además del comportamiento evaluado mediante el patrón de natación, los estudios habitualmente se complementan a nivel molecular mediante el análisis de cortisol en cuerpo y cerebro del pez, ya que, tal y como se ha mencionado anteriormente, esta es molécula clave en la respuesta fisiológica a la ansiedad y el estrés (Ramsay *et al.*, 2006; Barcellos *et al.*, 2007; Egan *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es optimizar un protocolo de inducción de estrés en ejemplares adultos de pez cebra, mediante la reducción del tiempo de exposición al estresor agudo y una evaluación más restrictiva del comportamiento y patrón de natación. De forma más específica, los objetivos son:

1. Disminuir el tiempo de exposición al estresor (exposición dorsal fuera del agua mediante reducción drástica del volumen de agua) en un 25% y evaluar si esta reducción tiene un efecto sobre la conducta y el patrón de natación de los peces utilizando NTT durante 5 minutos, analizando: velocidad media (cm/s), distancia total recorrida (cm) y tiempo de entrada y permanencia del pez en zonas cercanas a la superficie y el fondo

2. Realizar la evaluación del comportamiento mediante dos métodos de análisis: a) incluyendo dos zonas de evaluación (superior e inferior) y b) tres zonas de evaluación (superior, media e inferior).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de peces

Los peces fueron criados siguiendo protocolos estándar de cría y mantenimiento (Westerfield, 2000) hasta la ejecución del experimento. Todos los procedimientos que involucraron manipulación animal fueron realizados por miembros del grupo de investigación con la acreditación necesaria y contaron con la evaluación favorable del OEBA de la Universidad de León.

Marcaje

Los peces fueron marcados mediante la implantación de elastómeros visibles (VIE), para la identificación y trazabilidad de los animales. Para ello, el pez se anestesió mediante inmersión en 110 mg/L metasulfonato de triclaína tamponado (MS22). Para inyectar los elastómeros se siguió el protocolo indicado en el kit comercial. Una vez se hubieron inyectado, los peces pasaron a un tanque de recuperación, en el que permanecieron hasta que se les pasó el efecto de la anestesia. Para poder diferenciar los peces, los elastómeros inyectados fueron de diferentes colores y se inyectaron en distintas posiciones.

Diseño experimental.

Para la realización del experimento se utilizó un total de 14 machos (n=7 por grupo experimental) procedentes de la misma progenie. Los peces a los cuales se les indujo estrés mediante un estresor agudo conformaron el grupo “Stress”. El resto de los peces conformaron el grupo “Control”, manipulados en las mismas condiciones, pero sin exposición al estresor agudo.

Inducción de estrés

El estresor utilizado fue una modificación del protocolo publicado por Grzelak *et al* en 2017 (Grzelak *et al.*, 2017). Consistió en la reducción extrema del volumen de natación de los animales, implicando la exposición dorsal del cuerpo de los peces al aire. En el presente estudio, se redujo el tiempo de exposición de los animales a las condiciones de estrés en 30 segundos, teniendo un tiempo total de exposición al estresor de 1 minuto y medio, frente a los 2 minutos

de la técnica de referencia. La evaluación del NTT fue realizada justo después de la inducción al estresor.

NTT

El NTT se realizó en una pecera de 20 x 20 x 8 cm (alto, ancho, fondo), con un volumen total de agua de 3 L (Figura 5A). Se grabó el comportamiento de los peces durante 6 minutos desde que se introdujo el pez en la pecera y se retiró la red. De estos seis minutos, el primero se correspondió a la aclimatación del pez, por lo que el movimiento durante este tiempo no se tomó en cuenta para el NTT, que incluyó los seis minutos posteriores.

Análisis del vídeo

Para realizar el análisis de vídeo se utilizó el software de Ethovision XT16 (Noldus, Wageningen, Países Bajos). Para comenzar, se estableció un algoritmo en el cual se especificó que el primer minuto de los videos correspondió al periodo de aclimatación al entorno del pez y los siguientes 5 minutos al análisis. Para realizar este, se seleccionó el área (arena) donde se va a analizar el movimiento. Esta área aparece indicada en la Figura 5B. En una primera aproximación, la pecera fue dividida virtualmente en dos zonas (superior e inferior), y se tomó una referencia de tamaño para poder calcular la velocidad y la distancia recorrida, como se puede ver en la Figura 5C. Además, se especificó que el software analizase el movimiento total en los 5 minutos, así como en cada uno de los minutos por separado, tanto de forma individual como de forma grupal (Control y Stress). Para poder realizar el seguimiento, se seleccionó la forma del pez en un fotograma del vídeo, consiguiendo una identificación precisa del contorno del animal, para que el programa pudiera seguir su movimiento. Una vez establecidos los ajustes técnicos, se procesaron los vídeos y se comprobó su correcto análisis. En los casos en los que el programa no fue capaz de realizar una identificación rigurosa de los ejemplares, se seleccionaron ajustes de forma individual en sus vídeos para evitar errores en el seguimiento y evitar artificios en el análisis. Estos pasos se realizaron una segunda vez de igual forma, pero dividiendo la pecera en tres zonas homogéneas (análisis potencialmente más preciso al ser más restrictivo): superior, media e inferior, como se puede ver en la Figura 5D.

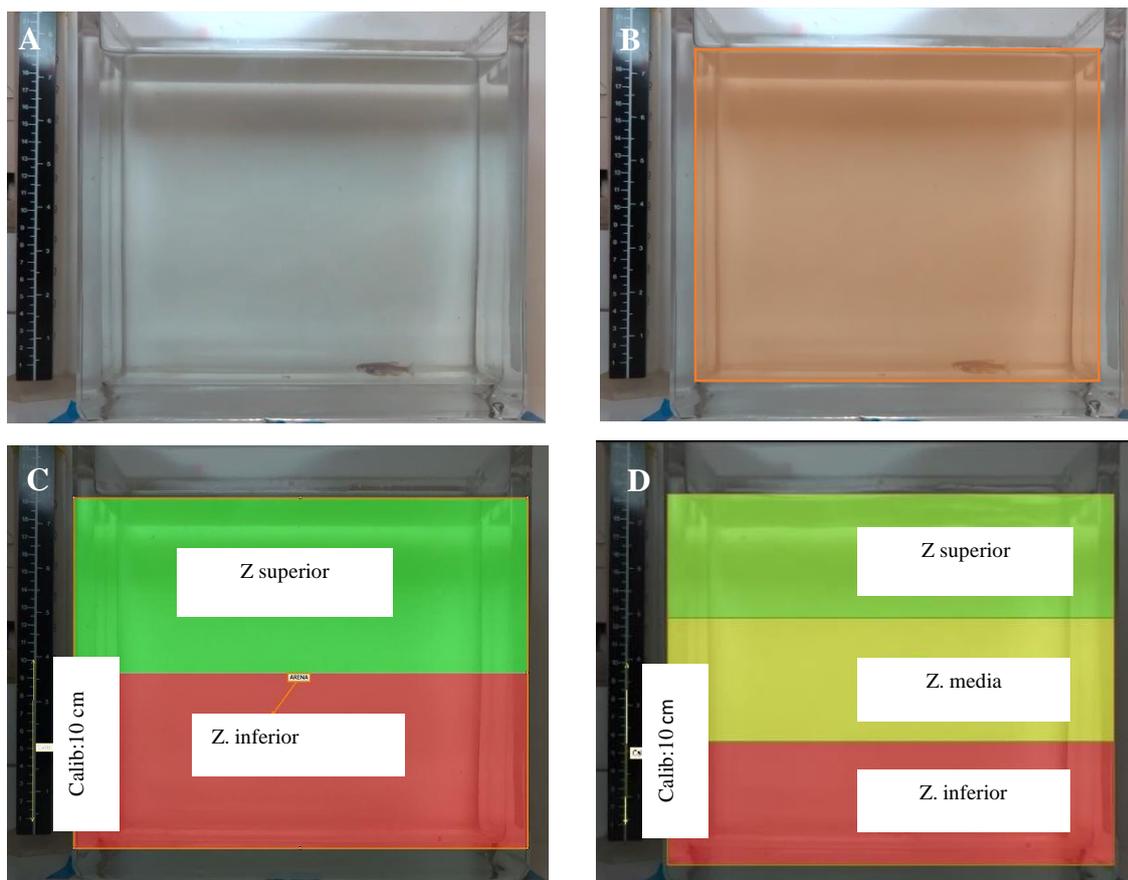


Figura 5. Proceso de división de la arena en las zonas que se utilizaron para análisis. A) Frame del vídeo que se va a analizar. B) Determinación de área (arena) donde se va a estudiar el movimiento. División del arena en C) 2 zonas (superior e inferior) y D) 3 zonas (superior, media e inferior). Posteriormente, se toma una medida de calibración (10 cm en este experimento) para que el software sea capaz de calcular los parámetros cinéticos.

Las variables estudiadas en este experimento fueron: la velocidad media (cm/s), la distancia total recorrida (cm), el tiempo que pasó el pez en cada zona (tiempo total (s) y porcentaje del NTT (%)) y el momento en el que entró por primera vez en cada zona. Adicionalmente, se obtuvieron unos mapas de calor del movimiento de los peces. Todos estos resultados se obtuvieron tanto del tiempo total (5 minutos) como de cada uno de los minutos del NTT, y tanto de forma grupal (Control y Stress) como de forma individual.

Estadística

Los análisis estadísticos y las gráficas fueron realizados con la versión 8.0.1 de GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, EE. UU.) En las gráficas se muestra la media de los grupos \pm la desviación típica. La normalidad de las variables fue evaluada mediante un test de Shapiro-Wilk. En las variables distribuidas normalmente se compararon los dos grupos experimentales con una prueba t de Student. Para las variables que no se distribuyeron normalmente se utilizó un test de Mann-Whitney para comparar los grupos. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

- Cinética

Los primeros datos que se analizaron fueron los correspondientes a la cinética, en los cuales se evaluó la velocidad media de movimiento y la distancia total recorrida por cada uno de los peces. Las gráficas correspondientes aparecen en la Figura 6, en la que se observa la media de cada uno de los grupos. Se observó que los peces sometidos a estrés recorrieron menos distancia ($p=0,0417$) y a menor velocidad ($p=0,0393$) que los peces control (distancia (cm): Control = $2248,51 \pm 586,60$; Stress = $1599,23 \pm 572,90$; velocidad (cm/s): Control = $7,58 \pm 1,98$; Stress = $5,57 \pm 1,60$). Además, como se puede apreciar en la Figura 6A, sólo un individuo del grupo Stress superó el valor de referencia de velocidad de 7 cm/s y, como se muestra en a Figura 6B, sólo tres recorrieron más de 1500 cm totales. Sin embargo, en el grupo Control, en ambos casos, lo superaron 4 y 6 individuos, respectivamente. Estos resultados son los mismos independientemente de las zonas evaluadas en el NTT

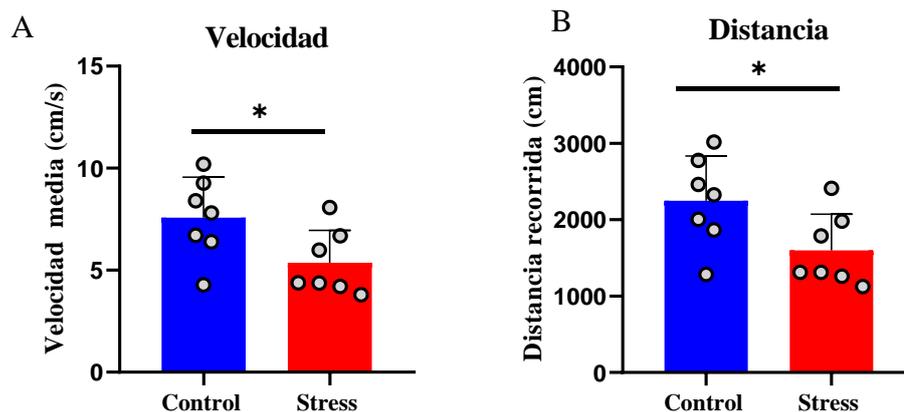


Figura 6. A. Velocidad media (cm/s) y B. Distancia total recorrida (cm) de los grupos Control y Stress. Los puntos indican los resultados de cada uno de los individuos. Los valores de las barras muestran las medias de cada grupo ($n=7$) \pm la desviación típica. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos ($p<0,05$).

- Preferencia de zona

El siguiente parámetro que se evaluó fue la preferencia de zona. Para ello se estudió el tiempo de cada uno de los grupos experimentales en cada zona. En la Figura 7 se muestra el porcentaje de tiempo ($((t \text{ (s)} \text{ pasado en cada zona} / 300 \text{ s}) * 100)$) en cada zona estudiada en el NTT para el análisis en 2 zonas. Con esta aproximación, los peces estresados puntuaron un menor tiempo en la zona superior (% del tiempo total en la zona superior: Control = $26,63 \pm 7,33$; Stress = $10,63 \pm 8,27$) y un mayor tiempo en la inferior (% del tiempo total en la zona inferior: Control = $70,48 \pm 8,16$; Stress = $88,94 \pm 8,61$). Estas diferencias fueron significativas en ambas zonas (zona superior: $p=0,0024$; zona inferior: $p=0,0023$).

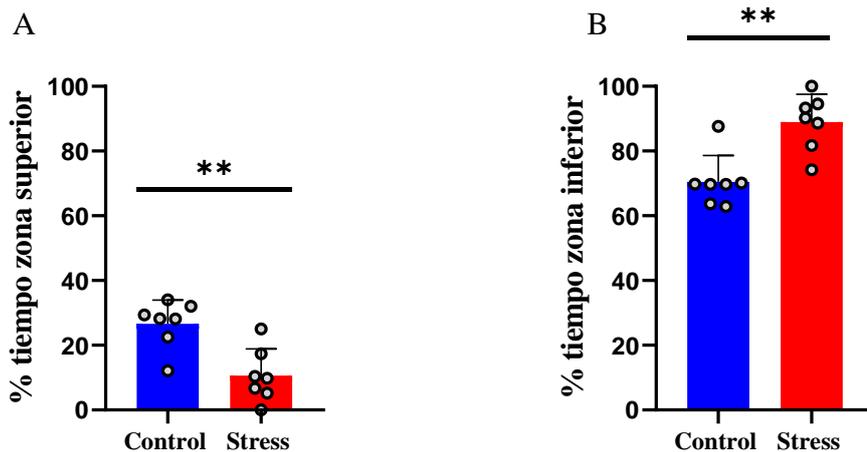


Figura 7. Porcentaje de tiempo de cada grupo experimental (Stress y Control) en cada una de las dos zonas: superior (A) e inferior (B). Los puntos indican los resultados de cada uno de los individuos. Los valores de las barras muestran las medias de cada grupo (n=7) \pm la desviación típica. Los asteriscos indica diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los resultados del análisis con 3 zonas se muestran en la Figura 8. Los peces sometidos a estrés estuvieron, de nuevo, menos tiempo en la zona superior (% del tiempo total en la zona superior: Control = $17,95 \pm 6,03$; Stress = $4,04 \pm 5,18$) y más tiempo en la zona inferior al compararlos con los peces control, en los que esto sucedió a la inversa (% del tiempo total en la zona inferior: Control = $56,63 \pm 8,87$; Stress = $74,37 \pm 12,17$). Los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas entre grupos para la zona superior e inferior (zona superior: $p=0,0006$; zona inferior: $p=0,0089$). En el porcentaje de tiempo pasado en la zona media las diferencias no fueron significativas ($p=0,4559$).

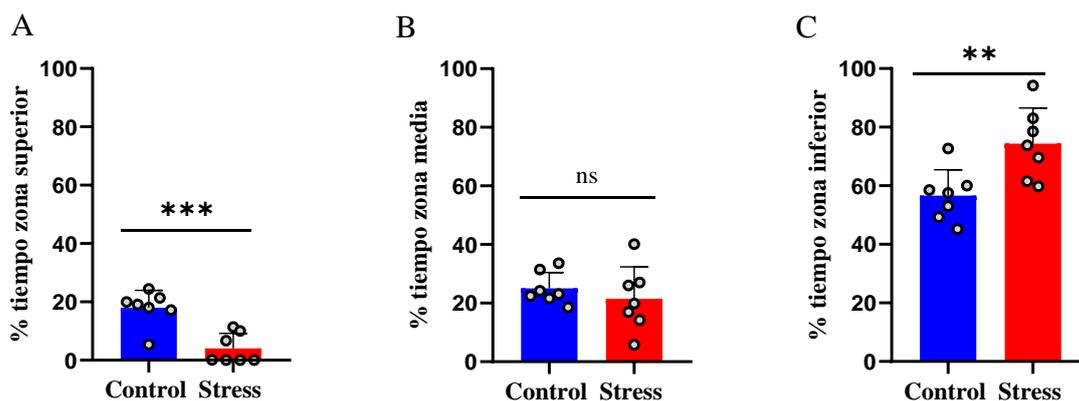


Figura 8. Porcentaje de tiempo de cada grupo experimental (Stress y Control) en cada una de las tres zonas: superior (A), media (B) e inferior (C). Los puntos indican los resultados de cada uno de los individuos. Los valores de las barras muestran las medias de cada grupo (n=7) \pm la desviación típica. Los asteriscos indica diferencias significativas ($p < 0,05$); ns: no significativo.

También se comparó el tiempo pasado en la zona superior en cada uno de los minutos de la prueba, como se muestra en la Figura 9. Se observa que los peces control pasan un mayor

tiempo en la zona superior (potencialmente asociada a menor ansiedad) a lo largo de todos los minutos del NTT de forma general en las dos aproximaciones de análisis, aunque las diferencias sólo sean significativas en el minuto 4 ($p=0,0449$) del estudio en 2 zonas y los minutos 2 ($p=0,0064$) y 5 ($p=0,0127$) del estudio en 3 zonas.

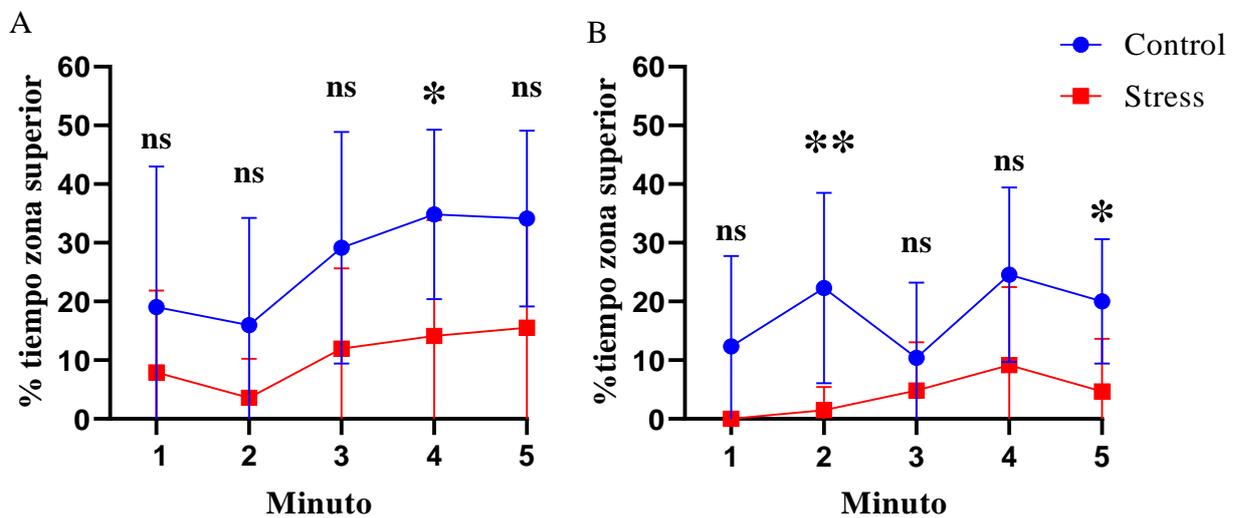


Figura 9. Porcentaje de tiempo pasado por cada grupo experimental en la zona superior en cada uno de los cinco minutos del análisis NTT en 2 zonas (A) y en 3 zonas (B). Los valores que se muestran son medias de cada grupo ($n=7$) \pm la desviación típica. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$); ns: no significativo.

Otro parámetro sujeto de análisis fue la latencia de la primera entrada a la zona superior, es decir, el momento en el que se produjo la primera entrada a la zona vinculada a un menor estrés. En el caso del NTT en 2 zonas, como se muestra en la Figura 10A, se observó que las diferencias existentes entre el grupo Control y el grupo Stress eran mínimas, con una significancia extremadamente baja ($p=0,9336$). Es de importante mención que todos los peces del grupo Control llegaron a entrar en algún momento en la zona superior en esta variante del análisis y que 1 pez del grupo Stress estaba en la zona superior antes del comienzo de la prueba y otro del mismo grupo no llegó a entrar en esta zona. En este último caso, se tomó como tiempo para realizar los cálculos 300 s, el tiempo total de la prueba. Sin embargo, en el estudio con 3 zonas, se observaron tendencias distintas entre ambos grupos, siendo mayor el tiempo en el grupo Stress, como se puede observar en la Figura 10B. Pese a ello, análisis estadísticos no encontraron diferencias significativas ($p=0,0519$) entre los patrones de natación. En este análisis más preciso con 3 zonas de evaluación, cabe destacar que hubo 3 peces del grupo stress que no llegaron a entrar en la zona superior en ningún momento del NTT. Es interesante apuntar en la evaluación restrictiva con 3 zonas, se registraron 2 peces del grupo control que ya estaban en la zona superior antes de que comenzara la prueba (latencia= 0 s), mientras que ningún pez del grupo Stress mostró este comportamiento.

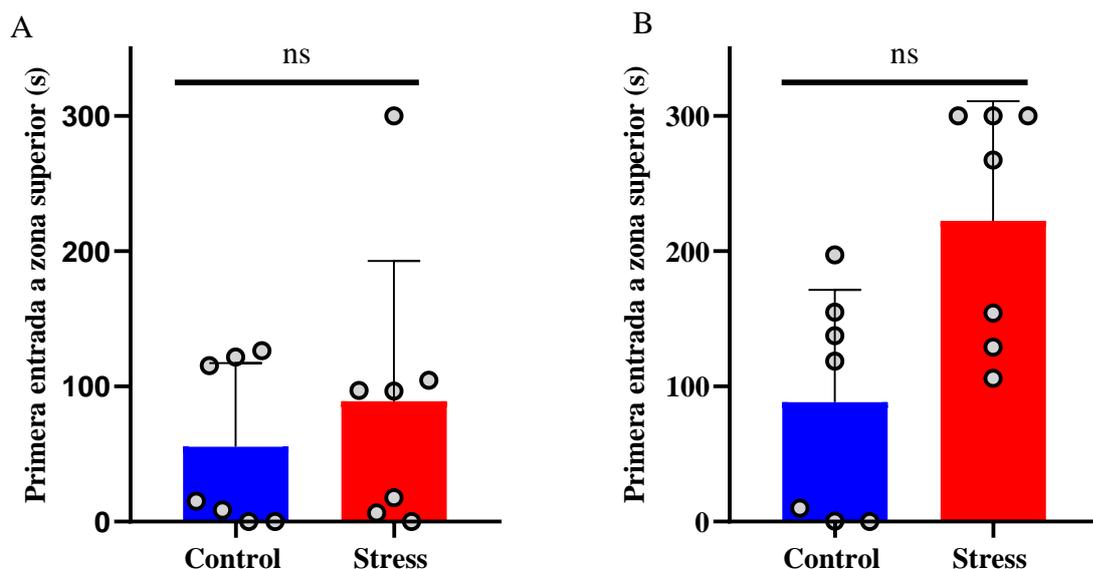


Figura 10. Latencia de la primera entrada a la zona superior (s) del análisis NTT en dos zonas (A) y en tres zonas (B). Los valores que se muestran son medias de cada grupo ($n=7$) \pm la desviación típica; ns: no significativo.

Por último, se analizaron los mapas de calor obtenidos ya que son una herramienta muy clarificadora para la interpretación del patrón de natación de los grupos experimentales. Los mapas individuales de cada individuo en cada uno de los minutos del experimento están representados en el Anexo I. En los mapas de calor de la Figura 11 se muestra la media del movimiento de cada uno de los grupos en el total de la prueba. Se puede ver que, en el caso del grupo control (Figura 11A), el mapa de calor abarcó la totalidad de la pecera mientras que en el grupo stress (Figura 11B) este mapa tuvo ciertos huecos en la zona superior, lo cual indica que ha permanecido menos tiempo en esta. Además, se puede observar que los peces a los que se les aplicó el estresor han estado un mayor tiempo en la zona inferior que los del grupo Control, ya que este mapa tiene una coloración rojiza más intensa en esta. Adicionalmente, al observar los mapas individuales de cada uno de los peces que se recogen en el Anexo I, se puede ver que, en ciertos individuos del grupo Stress, como sucede en el individuo 4 durante los minutos 1 y 2, apenas se observa movimiento (el mapa de calor es casi exclusivamente una pequeña zona rojiza en la zona inferior). Esto se debe a una inmovilización del pez.

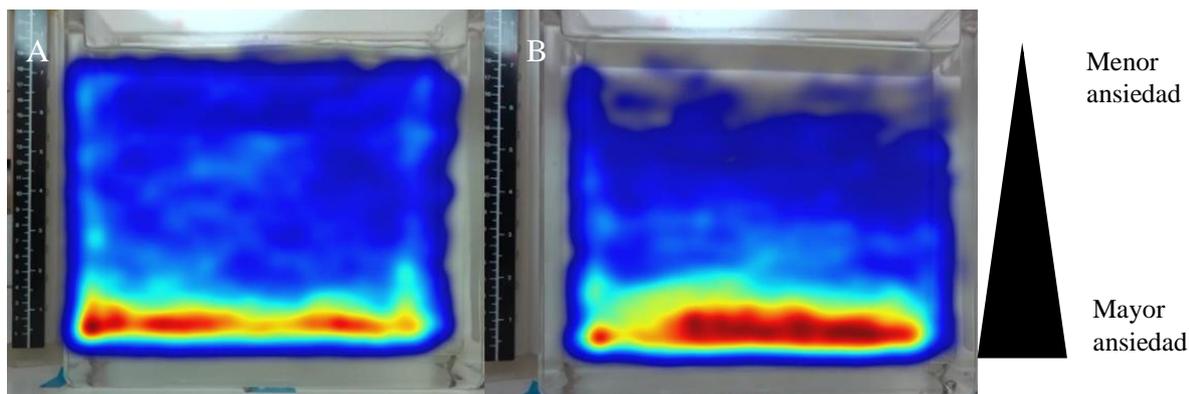


Figura 11. A. Mapa de calor del movimiento de los peces del grupo control. B. Mapa de calor del movimiento de los peces del grupo stress. En estos mapa se indica la media del movimiento total de cada uno de los grupos (n=7).

DISCUSIÓN

La hipótesis central de este trabajo es que un protocolo de inducción de estrés agudo en pez cebra puede optimizarse mediante la reducción del tiempo de exposición al estresor agudo (Grzelak *et al.*, 2017) manteniendo la alteración en el patrón de comportamiento de los ejemplares y que el análisis en 3 arenas (o zonas) puede resultar más preciso y restrictivo que el utilizado habitualmente (2 arenas). Para validar esta hipótesis se realizaron experimentos de comportamiento en animales expuestos y sin exponer al estresor para comparar su patrón de natación. Se escogió el NTT por ser uno de los métodos de análisis de comportamiento individual de adultos más ampliamente utilizado en estudios de estrés (Egan *et al.*, 2009; Maximino *et al.*, 2010a; Steenbergen *et al.*, 2011; Kalueff *et al.*, 2013). Se estudiaron la cinética y la preferencia de zona en la natación como parámetros indicadores de comportamiento en el pez cebra (Speedie y Gerlai, 2008; Egan *et al.*, 2009; Kysil *et al.*, 2017; Assad *et al.*, 2020). El análisis de natación fue estudiado mediante dos aproximaciones con dos y tres zonas de evaluación.

En el caso de la cinética se espera que los peces sometidos a estrés recorran una menor distancia total y presenten una menor velocidad media ante estímulos potencialmente negativos (Levin *et al.*, 2007; Rosemberg *et al.*, 2012). Los resultados de este experimento concuerdan con estas observaciones previas (Figura 6). La menor velocidad media y la menor distancia recorrida son los primeros indicadores de respuesta (Gerlai *et al.*, 2008; Rosemberg *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2012). Sin embargo, el estudio de la cinética no es suficiente como para poder determinar el patrón característico de respuesta al estrés (Maximino *et al.*, 2010a). La preferencia de la zona de natación en el nuevo ambiente es un elemento clave para poder entender la respuesta al estrés. Al introducir un pez en un entorno nuevo como en el NTT, se espera una respuesta de geotaxis, es decir, una mayor permanencia en el fondo del tanque

(Gerlai *et al.*, 2000; Bass y Gerlai, 2008; Speedie y Gerlai, 2008; Blaser *et al.*, 2010). Esto es debido a que el pez busca un lugar seguro para protegerse de posibles depredadores (Bass y Gerlai, 2008). En el caso del estudio de la respuesta al estrés, se espera que esta respuesta sea mayor cuanto mayores sean los niveles de estrés o ansiedad. La geotaxis se comprueba en los individuos afectados por estrés con un menor tiempo de permanencia en la zona superior del tanque (potencialmente menos segura), en un aumento en la latencia de la primera entrada en esta zona y en un mayor tiempo en la zona inferior del tanque (potencialmente más segura) (Blaser *et al.*, 2010; Kalueff *et al.*, 2013; de Abreu *et al.*, 2020). Los resultados de este estudio permitieron encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los animales expuestos al protocolo reducido de estrés y los animales control en cuanto a preferencia de zona tanto en la evaluación con 2 zonas (Figura 7) como en la de 3 zonas (Figura 8), potencialmente más restrictiva. En lo referente a la latencia a la entrada en la parte superior, a pesar de existir una clara tendencia en el método de análisis con 3 zonas (Figura 10B), ésta no resultó significativa. Independientemente, los datos apuntan a una modulación del comportamiento en el grupo estresado donde, por ejemplo, no se registró ningún pez en la zona superior al inicio del test, a diferencia del grupo control, en el que dos animales ya nadaban en esta zona cercana a la superficie al iniciar el NTT.

Esta diferencia en las tendencias recogidas en los resultados de latencia a la primera entrada zona superior en la evaluación con 2 y 3 zonas (Figura 10) son un indicador claro de la importancia de la selección de zonas de evaluación en los estudios de NTT. Mientras que, en el análisis en 2 zonas, las diferencias son casi inexistentes y todos los peces salvo 1 entraron en algún momento en la zona superior, en el estudio en 3 zonas, 3 peces del grupo Stress no llegaron a alcanzar la zona más cercana a la superficie. Otro ejemplo indicando la importancia de la selección de zonas correcta se observó el % de tiempo pasado en cada zona del análisis NTT en 3 zonas (Figura 8), en la que se reflejó que en la zona media no se observaron apenas diferencias entre los grupos, revelando que en este experimento esta es una zona intermedia de paso que podría enmascarar los datos recogidos en el análisis de 2 zonas. Por lo tanto, los resultados indican que, la división de la pecera en una zona adicional permite un análisis más preciso y riguroso. Independientemente del estudio por zonas, los datos recogidos en los mapas de calor arrojan evidencias claras sobre la modulación en el comportamiento en el grupo Stress (Figura 11 y Anexo I). Otro aspecto importante en el patrón de natación tras la inducción del estrés en el pez cebra, apreciable en los mapas de calor, son las inmovilizaciones que sufre el pez a lo largo del experimento. Esta inmovilización del pez está ampliamente caracterizada

como una respuesta a niveles altos de ansiedad o estrés (Maximino *et al.*, 2010a; Kalueff *et al.*, 2013; de Abreu *et al.*, 2020). En el presente experimento, la reducción en la distancia total recorrida (al paralizarse el movimiento total disminuye) correlaciona con estos episodios. En los mapas de calor (Anexo I) se pueden destacar que, en ciertos minutos del estudio de los peces del grupo experimental Stress, el movimiento es muy escaso, indicados con focos de intensidad en una posición, evidenciando, por tanto, unos niveles más altos de estrés que no se recogen del mismo modo en el grupo Control.

En resumen, la observación de variaciones tanto en la cinética como en la preferencia de zona de los peces expuestos al estresor agudo respecto a los no expuestos nos permiten establecer que esta exposición provoca un patrón de comportamiento típico de peces con altos niveles de estrés. De esta forma, se puede afirmar que el estresor ha tenido el efecto esperado pese a la reducción del tiempo de exposición dorsal al aire respecto al protocolo estándar realizado por Grzelak *et al* en 2017 (Grzelak *et al.*, 2017). Este resultado es de interés a la hora de reducir el tiempo en los protocolos de inducción de estrés agudo y como parte de un protocolo de inducción de estrés crónico. También es un aspecto relevante desde el punto de vista del bienestar animal ya que se reduce el tiempo en el que los animales están sometidos al estresor y puede ser tenido en cuenta como un método de reducción en la experimentación relacionada con el estrés. La posibilidad de estudiar el estrés en pez cebra es de gran importancia, ya que junto con la ansiedad son trastornos con una elevada prevalencia en la sociedad actual durante las últimas décadas (Beiter *et al.*, 2015; Mirzaei *et al.*, 2019; Ramón-Arbués *et al.*, 2020) y para los que es necesario el desarrollo de fármacos y terapias (Volgin *et al.*, 2019; Demin *et al.*, 2020; de Abreu *et al.*, 2021). El desarrollo y optimización de protocolos de inducción de estrés con especies animales, y una caracterización completa de su comportamiento, permitirá avanzar más en este interesante campo de estudio.

CONCLUSIONES

1. La reducción de la exposición al estresor en un 25% en un protocolo de inducción de estrés en peces cebra ha demostrado mantener su efectividad en la alteración del patrón de natación en estos animales en términos de cinética (velocidad media (cm/s) y distancia total recorrida (cm)) y preferencia de zona (tiempo de entrada y permanencia del pez en zonas cercanas a la superficie y el fondo).

2. El análisis utilizando una división en 3 arenas o zonas permite una mayor precisión en el análisis, al eliminar zonas intermedias, aumentando la discriminación entre las zonas cercanas a la superficie y al fondo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolphs, R. (2003) "Cognitive neuroscience of human social behaviour", *Nature Reviews Neuroscience*, 4(3), pp. 165–178. doi:10.1038/nrn1056.
- Ahmed, O., Seguin, D. y Gerlai, R. (2011) "An automated predator avoidance task in zebrafish", *Behavioural brain research*, 216(1), pp. 166–171. doi: 10.1016/j.bbr.2010.07.028.
- Alsop, D. y Vijayan, M. (2008) "Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish", *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 294(3), pp. 711–719. doi:10.1152/ajpregu.00671.2007.
- Alsop, D. y Vijayan, M. (2009) "The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event", *General and Comparative Endocrinology*, 161(1), pp. 62–66. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.09.011.
- Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N. y Panula, P. (2006) "Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*)", *The Journal of comparative neurology*, 498(5), pp. 593–610. doi:10.1002/cne.21057.
- Arjmand, B., Tayanloo-Beik, A., Foroughi Heravani, N., Alaei, S. *et al.* (2020) "Zebrafish for Personalized Regenerative Medicine; A More Predictive Humanized Model of Endocrine Disease", *Frontiers in Endocrinology*, 11:396. doi:10.3389/fendo.2020.00396.
- Assad, N., Luz, W. L., Santos-Silva, M., Carvalho, T. *et al.* (2020) "Acute Restraint Stress Evokes Anxiety-Like Behavior Mediated by Telencephalic Inactivation and GabAergic Dysfunction in Zebrafish Brains", *Scientific Reports*, 10:5551. doi:10.1038/s41598-020-62077-w.
- Barcellos, L. J. G., Ritter, F., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M. *et al.* (2007) "Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*", *Aquaculture*, 272, pp. 774–778. doi: 10.1016/J.aquaculture.2007.09.002.
- Bass, S. L. S. y Gerlai, R. (2008) "Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish", *Behavioural Brain Research*, 186(1), pp. 107–117. doi: 10.1016/j.bbr.2007.07.037.
- Beiter, R., Nash, R., McCrady, M., Rhoades, D. *et al.* (2015) "The prevalence and correlates of depression, anxiety, and stress in a sample of college students", *Journal of Affective Disorders*, 173, pp. 90–96. doi: 10.1016/j.jad.2014.10.054.
- Benvenuti, R., Marcon, M., Gallas-Lopes, M., de Mello, A. J. *et al.* (2021) "Swimming in the maze: An overview of maze apparatuses and protocols to assess zebrafish behavior", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 127, pp. 761–778. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.05.027.
- Best, J. D. y Alderton, W. K. (2008) "Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases", *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(3), pp. 567–576. doi:10.2147/ndt.S2056.
- BioRender.com (2022) BioRender. Disponible en: <https://biorender.com> (Accedido: 23 de junio de 2022).
- Blaser, R. E., Chadwick, L. y McGinnis, G. C. (2010) "Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*)", *Behavioural Brain Research*, 208(1), pp. 56–62. doi: 10.1016/j.bbr.2009.11.009.
- Blaser, R. E. y Peñalosa, Y. M. (2011) "Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test", *Physiology & Behavior*, 104(5), pp. 831–837. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.07.029.
- Busse, B., Galloway, J. L., Gray, R. S., Harris, M. P. y Kwon, R. Y. (2020) "Zebrafish: An Emerging Model for Orthopedic Research", *Journal of orthopaedic research*, 38(5), pp. 925–936. doi:10.1002/jor.24539.

- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Kyzar, E. *et al.* (2011) "Deconstructing Adult Zebrafish Behavior with Swim Trace Visualizations", *Neuromethods*, 51, pp. 191–201. doi:10.1007/978-1-60761-953-6_16.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S. *et al.* (2010) "Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish", *Nature Protocols*, 5(11), pp. 1786–1799. doi:10.1038/nprot.2010.140.
- Canzian, J., Fontana, B. D., Quadros, V. A., Müller, T. E. *et al.* (2019) "Single pentylenetetrazole exposure increases aggression in adult zebrafish at different time intervals", *Neuroscience Letters*, 692, pp. 27–32. doi: 10.1016/j.neulet.2018.10.045.
- Chen, Y. C., Priyadarshini, M. y Panula, P. (2009) "Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish", *Histochemistry and cell biology*, 132(4), pp. 375–381. doi:10.1007/s00418-009-0619-8.
- Clark, K. J., Boczek, N. J. y Ekker, S. C. (2011) "Stressing Zebrafish for Behavioral Genetics", *Reviews in the neurosciences*, 22(1), pp. 49–62. doi:10.1515/rns.2011.007.
- Clément, R. J. G., Macrì, S. y Porfiri, M. (2020) "Design and development of a robotic predator as a stimulus in conditioned place aversion for the study of the effect of ethanol and citalopram in zebrafish", *Behavioural brain research*, 378: 112256. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112256.
- Cognato, G. de P., Bortolotto, J. W., Blazina, A. R., Christoff, R. R. *et al.* (2012) "Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods", *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(4), pp. 321–328. doi: 10.1016/j.nlm.2012.09.008.
- Connors, K. A., Valenti, T. W., Lawless, K., Sackerman, J. *et al.* (2014) "Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT1A or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments", *Aquatic Toxicology*, 151, pp. 105–113. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.005.
- Danese, A. y McEwen, B. S. (2012) "Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease", *Physiology & behavior*, 106(1), pp. 29–39. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.08.019.
- Darland, T. y Dowling, J. E. (2001) "Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp. 11691–11696. doi:10.1073/pnas.191380698.
- de Abreu, M. S., Giacomini, A. C. V. V., Demin, K. A., Galstyan, D. S. *et al.* (2021) "Unconventional anxiety pharmacology in zebrafish: Drugs beyond traditional anxiogenic and anxiolytic spectra", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 207: 173205. doi: 10.1016/j.pbb.2021.173205.
- de Abreu, M. S., Maximino, C., Banha, F., Anastácio, P. M. *et al.* (2020) "Emotional behavior in aquatic organisms? Lessons from crayfish and zebrafish", *Journal of Neuroscience Research*, 98(5), pp. 764–779. doi:10.1002/jnr.24550.
- Demin, K. A., Taranov, A. S., Ilyin, N. P., Lakstygai, A. M. *et al.* (2020) "Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish", *Stress*, 24(1), pp. 1–18. doi:10.1080/10253890.2020.1724948.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. *et al.* (2009) "Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish", *Behavioural brain research*, 205(1), pp. 38–44. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A. y Parichy, D. M. (2007) "Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field", *Zebrafish*, 4(1), pp. 21–40. doi:10.1089/zeb.2006.9997.
- Flik, G., Klaren, P. H. M., Van den Burg, E. H., Metz, J. R. y Huising, M. O. (2006) "CRF and stress in fish", *General and comparative endocrinology*, 146(1), pp. 36–44. doi: 10.1016/j.ygcen.2005.11.005.
- Fontana, B. D., Alnassar, N. y Parker, M. O. (2021) "The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light–dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds", *Psychopharmacology*, 239(1), pp. 287–296. doi:10.1007/s00213-021-05990-w.
- Fontana, B. D., Meinerz, D. L., Rosa, L. V. C., Mezzomo, N. J. *et al.* (2016) "Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 141, pp. 18–27. doi: 10.1016/j.pbb.2015.11.011.

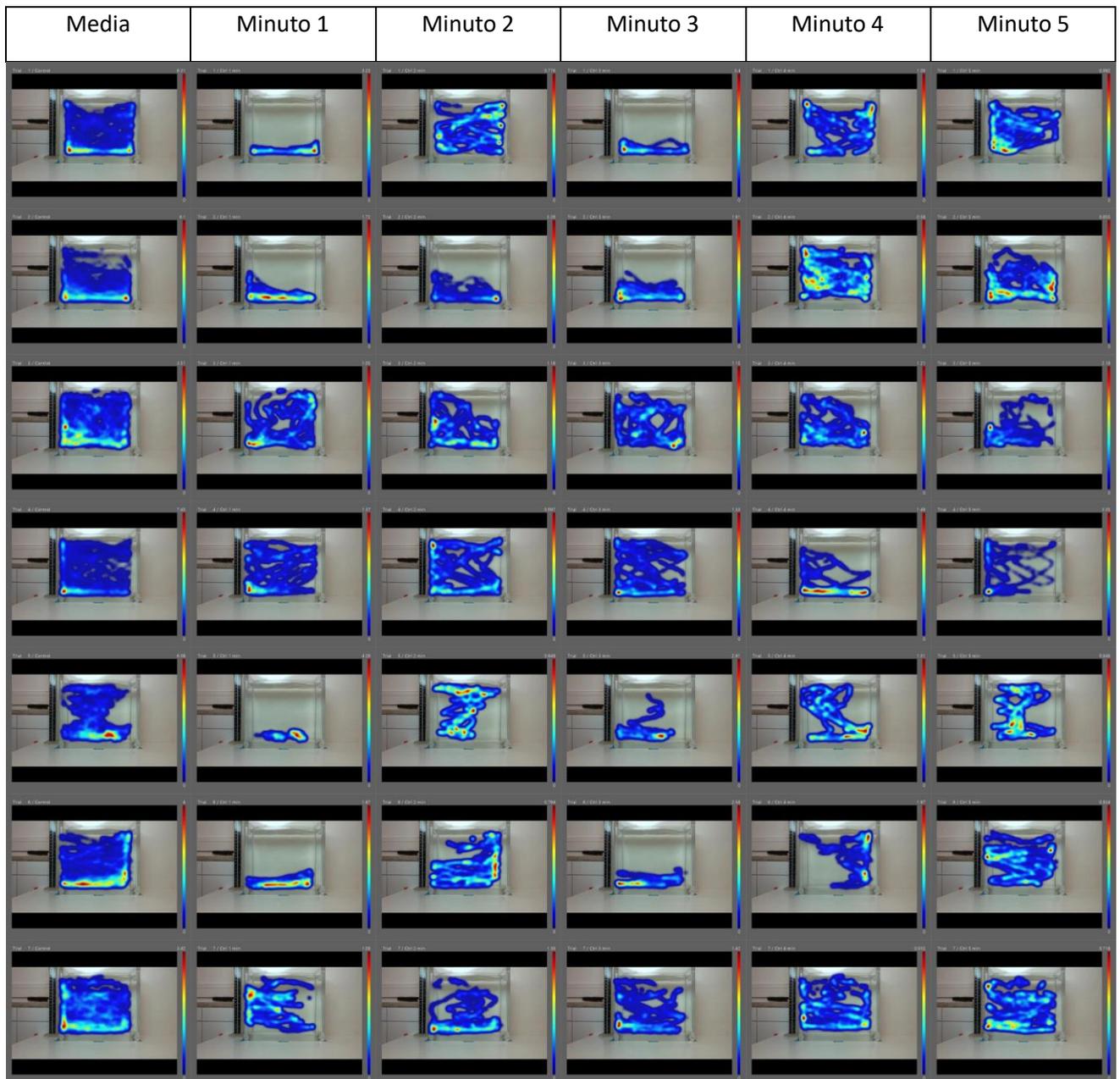
- Gawel, K., Banono, N. S., Michalak, A. y Esguerra, C. V. (2019) "A critical review of zebrafish schizophrenia models: Time for validation?", *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 107, pp. 6–22. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.08.001.
- Geng, Y. y Peterson, R. T. (2019) "The zebrafish subcortical social brain as a model for studying social behavior disorders", *Disease Models & Mechanisms*, 12(8): 039446. doi:10.1242/dmm.039446.
- Gerlai, R. (2003) "Zebra Fish: An Uncharted Behavior Genetic Model", *Behavior Genetics*, 33(5), pp. 461–468. doi:10.1023/a:1025762314250.
- Gerlai, R., Ahmad, F. y Prajapati, S. (2008) "Differences in Acute Alcohol-Induced Behavioral Responses Among Zebrafish Populations", *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), pp. 1763–1773. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00761.x.
- Gerlai, R., Fernandes, Y. y Pereira, T. (2009) "Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task", *Behavioural brain research*, 201(2), pp. 318–324. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.003.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S. y Rosenthal, A. (2000) "Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(4), pp. 773–782. doi:10.1016/s0091-3057(00)00422-6.
- Golla, A., Østby, H. y Kermen, F. (2020) "Chronic unpredictable stress induces anxiety-like behaviors in young zebrafish", *Scientific Reports*, 10:10339. doi:10.1038/s41598-020-67182-4.
- Graphpad (2018) *Graphpad Prism (Versión 8.0.1) [Programa de ordenador]*. San Diego: Graphpad.
- Griffiths, B., Schoonheim, P. J., Ziv, L., Voelker, L. *et al.* (2012) "A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response", *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6:68. doi:10.3389/fnbeh.2012.00068.
- Grzelak, A. K., Davis, D. J., Caraker, S. M., Crim, M. J. *et al.* (2017) "Stress Leukogram Induced by Acute and Chronic Stress in Zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Medicine*, 67(3), pp. 263–269.
- Hieu, B. T. N., Anh, N. T. N., Audira, G., Juniardi, S. *et al.* (2020) "Development of a Modified Three-Day T-maze Protocol for Evaluating Learning and Memory Capacity of Adult Zebrafish", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4):1464. doi:10.3390/ijms21041464.
- Horzmann, K. A. y Freeman, J. L. (2018) "Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish", *Toxicological Sciences*, 163(1), pp. 5–12. doi:10.1093/toxsci/kfy044.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrant, J. *et al.* (2013) "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome", *Nature*, 496(7446), pp. 498–503. doi:10.1038/nature12111.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L. *et al.* (2013) "Efficient In Vivo Genome Editing Using RNA-Guided Nucleases", *Nature biotechnology*, 31(3), pp. 227–229. doi:10.1038/nbt.2501.
- Kabelik, D., Weitekamp, C. A., Choudhury, S. C., Hartline, J. T. *et al.* (2018) "Neural activity in the social decision-making network of the brown anole during reproductive and agonistic encounters", *Hormones and Behavior*, 106, pp. 178–188. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.06.013.
- Kalueff, A. v., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M. *et al.* (2013) "Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond", *Zebrafish*, 10(1), pp. 70–86. doi:10.1089/zeb.2012.0861.
- Kalueff, A. v., Stewart, A. M. y Gerlai, R. (2014) "Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders", *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), pp. 63–75. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002.
- Kysil, E. v., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J. *et al.* (2017) "Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests", *Zebrafish*, 14(3), pp. 197–208. doi:10.1089/zeb.2016.1415.
- Ladu, F., Bartolini, T., Panitz, S. G., Chiarotti, F. *et al.* (2015) "Live Predators, Robots, and Computer-Animated Images Elicit Differential Avoidance Responses in Zebrafish", *Zebrafish*, 12(3), pp. 205–214. doi:10.1089/zeb.2014.1041.

- Levin, E. D., Bencan, Z. y Cerutti, D. T. (2007) "Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish", *Physiology & Behavior*, 90(1), pp. 54–58. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026.
- Lucini, C., D'angelo, L., Cacialli, P., Palladino, A. *et al.* (2018) "BDNF, Brain, and Regeneration: Insights from Zebrafish", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10):3155. doi:10.3390/ijms19103155.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M. *et al.* (2010a) "Measuring anxiety in zebrafish: A critical review", *Behavioural Brain Research*, 214(2), pp. 157–171. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.031.
- Maximino, C., de Brito, T. M., de Mattos Dias, C. A. G., Gouveia, A. *et al.* (2010b) "Scototaxis as anxiety-like behavior in fish", *Nature Protocols*, 5(2), pp. 221–228. doi:10.1038/nprot.2009.225.
- McEwen, B. S. (2007) "Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain", *Physiological reviews*, 87(3), pp. 873–904. doi:10.1152/physrev.00041.2006.
- Menezes, F. P., Padilha de Sousa, I. y Luchiari, A. C. (2020) "Early Mistreatment Contributes to Social Behavior Disorders in Zebrafish", *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14:578242. doi:10.3389/fnbeh.2020.578242.
- Meshalkina, D. A., N. Kizlyk, M., Kysil, E. v., Collier, A. D. *et al.* (2018) "Zebrafish models of autism spectrum disorder", *Experimental neurology*, 299, pp. 207–216. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.02.004.
- Michelotti, P., Quadros, V. A., Pereira, M. E. y Rosemberg, D. B. (2018) "Ketamine modulates aggressive behavior in adult zebrafish", *Neuroscience Letters*, 684, pp. 164–168. doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.009.
- Mirzaei, M., Ardekani, S. M. Y., Mirzaei, M. y Dehghani, A. (2019) "Prevalence of Depression, Anxiety and Stress among Adult Population: Results of Yazd Health Study", *Iranian Journal of Psychiatry*, 14(2), pp. 137-146. doi:10.18502/ijps.v14i2.993.
- Mocelin, R., Marcon, M., da Rosa Araujo, A. S., Herrmann, A. P. *et al.* (2019) "Withdrawal effects following repeated ethanol exposure are prevented by N-acetylcysteine in zebrafish", *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 93, pp. 161–170. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.03.014.
- Newman, S. W. (1999) "The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, pp. 242–257. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x.
- Noldus (2021) *Ethovision XT (Versión 16) [Programa de ordenador]*. Wageningen: Noldus
- Nugent, N. R., Tyrka, A. R., Carpenter, L. L. y Price, L. H. (2011) "Gene–environment interactions: early life stress and risk for depressive and anxiety disorders", *Psychopharmacology*, 214(1), pp. 175–196. doi:10.1007/s00213-010-2151-x.
- O'Connell, L. A. y Hofmann, H. A. (2011) "The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis", *Journal of Comparative Neurology*, 519(18), pp. 3599–3639. doi:10.1002/cne.22735.
- O'Connell, L. A. y Hofmann, H. A. (2012) "Evolution of a vertebrate social decision-making network", *Science*, 336(6085), pp. 1154–1157. doi:10.1126/science.1218889.
- Panula, P., Chen, Y. C., Priyadarshini, M., Kudo, H. *et al.* (2010) "The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases", *Neurobiology of Disease*, 40(1), pp. 46–57. doi: 10.1016/j.nbd.2010.05.010.
- Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J. *et al.* (2006) "Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases", *Zebrafish*, 3(2), pp. 235–247. doi:10.1089/zeb.2006.3.235.
- Parker, M. O., Millington, M. E., Combe, F. J. y Brennan, C. H. (2012) "Housing Conditions Differentially Affect Physiological and Behavioural Stress Responses of Zebrafish, as well as the Response to Anxiolytics", *PLOS ONE*, 7(4): e34992. doi: 10.1371/journal.pone.0034992.
- Pechtel, P. y Pizzagalli, D. A. (2011) "Effects of early life stress on cognitive and affective function: An integrated review of human literature", *Psychopharmacology*, 214(1), pp. 55–70. doi:10.1007/S00213-010-2009-2/FIGURES/1.

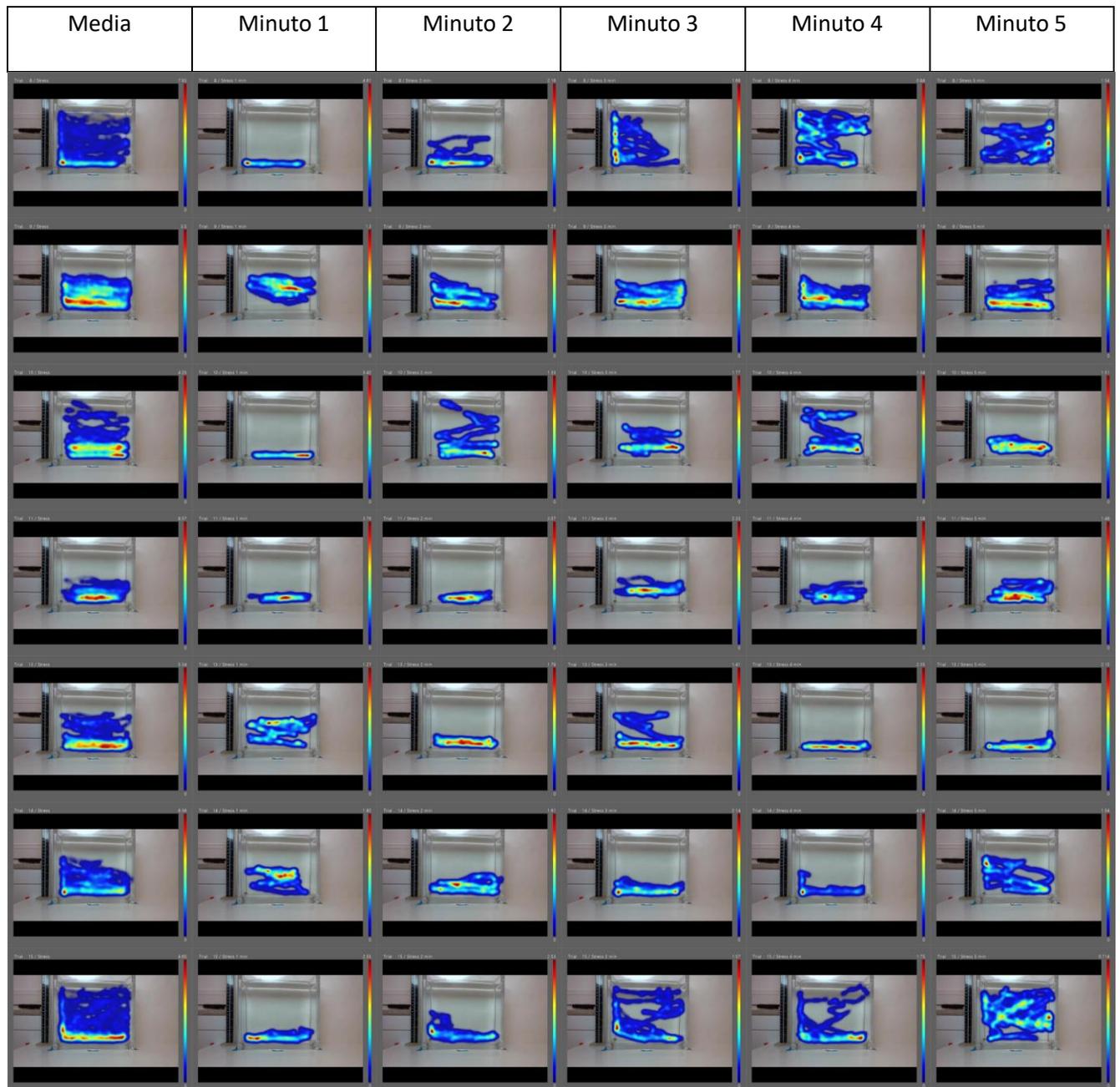
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. y Briley, M. (1985) "Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat", *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), pp. 149–167. doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7.
- Pham, M., Raymond, J., Hester, J., Kyzar, E. *et al.* (2012) "Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests", en Kalueff, A. v. y Stewart, A. (eds.) *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*. New York: Humana Press, pp. 231–246.
- Piato, A. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P. *et al.* (2011) "Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses", *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(2), pp. 561–567. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.018.
- Pippal, J. B., Cheung, C. M. I., Yao, Y. Z., Brennan, F. E. *et al.* (2011) "Characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) mineralocorticoid receptor", *Molecular and cellular endocrinology*, 332, pp. 58–66. doi: 10.1016/j.mce.2010.09.014.
- Raby, L., Völkel, P., Bourhis, X. le y Angrand, P.-O. (2020) "Genetic Engineering of Zebrafish in Cancer Research", *Cancers*, 12(8), pp. 1–36. doi:10.3390/cancers12082168.
- Ramón-Arбуés, E., Gea-Caballero, V., Granada-López, J. M., Juárez-Vela, R. *et al.* (2020) "The Prevalence of Depression, Anxiety and Stress and Their Associated Factors in College Students", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(19):7001. doi:10.3390/ijerph17197001.
- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M. *et al.* (2006) "Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*", *Aquaculture*, 258(1–4), pp. 565–574. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.020.
- Rosemberg, D. B., Braga, M. M., Rico, E. P., Loss, C. M. *et al.* (2012) "Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol", *Neuropharmacology*, 63(4), pp. 613–623. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.009.
- Sackerman, J., Donegan, J. J., Cunningham, C. S., Nguyen, N. N. *et al.* (2010) "Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line", *International journal of comparative psychology*, 23(1), pp. 43-61.
- Saleem, S. y Kannan, R. R. (2018) "Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery", *Cell Death Discovery*, 4(1), pp. 1–13. doi:10.1038/s41420-018-0109-7.
- Serra, E. L., Medalha, C. C. y Mattioli, R. (1999) "Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(12), pp. 1551–1553. doi:10.1590/s0100-879x1999001200016.
- Singh, H., Ramon, A., Finore, D., Burnham, K. *et al.* (2022) "Learning Deficits and Attenuated Adaptive Stress Response After Early-Life Seizures in Zebrafish", *Frontiers in Neuroscience*, 16:869671. doi:10.3389/fnins.2022.869671.
- Speedie, N. y Gerlai, R. (2008) "Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*)", *Behavioural brain research*, 188(1), pp. 168-177. doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.031.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. y Smith, C. (2008) "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*", *Biological Reviews*, 83(1), pp. 13–34. doi:10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x.
- Steenbergen, P. J., Richardson, M. K. y Champagne, D. L. (2011) "The use of the zebrafish model in stress research", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), pp. 1432–1451. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.10.010.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J. *et al.* (2012) "Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review", *Neuropharmacology*, 62(1), pp. 135-143. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037.
- Stewart, A., Kadri, F., DiLeo, J., Min Chung, K. *et al.* (2010) "The Developing Utility of Zebrafish in Modeling Neurobehavioral Disorders", *International Journal of Comparative Psychology*, 23(1), pp. 104-120.
- Stewart, A., Ullmann, J. F. P., Norton, W. H. J., Parker, M. O. *et al.* (2015) "Molecular psychiatry of zebrafish", *Molecular psychiatry*, 20(1), pp. 2-17. doi:10.1038/mp.2014.128.

- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P. *et al.* (2011) "Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), pp. 1421–1431. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.11.035.
- Tropepe, V. y Sive, H. L. (2003) "Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism?", *Genes, Brain and Behavior*, 2(5), pp. 268–281. doi: 10.1034/j.1601-183x.2003.00038.x.
- Van Bodegom, M., Homberg, J. R. y Henckens, M. J. A. G. (2017) "Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11:87. doi:10.3389/fncel.2017.00087/full.
- Volgin, A. D., Yakovlev, O. A., Demin, K. A., de Abreu, M. S. *et al.* (2019) "Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions", *Journal of Neuroscience Research*, 97(4), pp. 402–413. doi:10.1002/jnr.24337.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997) "The stress response in fish", *Physiological reviews*, 77(3), pp. 591–625. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4^a ed. Eugene: University of Oregon Press.
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S. *et al.* (2010) "Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*)", *Behavioural Brain Research*, 208(2), pp. 450–457. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.023.
- Yaksi, E., Jamali, A., Diaz Verdugo, C. y Jurisch-Yaksi, N. (2021) "Past, present and future of zebrafish in epilepsy research", *The FEBS journal*, 288(24), pp. 7243–7255. doi:10.1111/febs.15694.
- Yu, L., Tucci, V., Kishi, S. y Zhdanova, I. v. (2006) "Cognitive Aging in Zebrafish", *PLoS ONE*, 1(1): e14. doi: 10.1371/journal.pone.0000014.
- Ziv, L., Muto, A., Schoonheim, P. J., Meijnsing, S. H. *et al.* (2013) "An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor", *Molecular psychiatry*, 18(6), pp. 681–691. doi:10.1038/mp.2012.64.

ANEXO I: MAPAS DE CALOR INDIVUALES



Mapa de calor correspondiente al movimiento de los peces del grupo Control. Cada línea se corresponde con un individuo. Cada una de las columnas de izquierda a derecha se corresponde con: la media total del movimiento del individuo, minuto 1, minuto 2, minuto 3, minuto 4 y minuto 5.



Mapa de calor correspondiente al movimiento de los peces del grupo Stress. Cada línea se corresponde con un individuo. Cada una de las columnas de izquierda a derecha se corresponde con: media total del movimiento del individuo, minuto 1, minuto 2, minuto 3, minuto 4 y minuto 5.