



universidad
de León



FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO
AMBIENTAL FRENTE AL ESTRÉS
CRÓNICO EN PEZ CEBRA**
EFFECT OF ENVIRONMENTAL
ENRICHMENT ON CHRONIC STRESS IN
ZEBRAFISH

Autora: Alina Elena Tutulea

Tutores: Vanesa Robles Rodríguez y David García
Valcarce

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 BIENESTAR ANIMAL.....	1
1.2 ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL	2
1.3 EMPLEO DE ESPECIES MODELO EN INVESTIGACIÓN: EL PEZ CEBRA...3	
1.4 EL ESTRÉS EN PECES Y SU IMPACTO EN EL BIENESTAR ANIMAL	4
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS	6
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	6
3.2.1 Marcaje con elastómeros (<i>visible implant elastomers</i> ; VIE)	7
3.2.2 Protocolo de estrés crónico impredecible (UCS)	7
3.2.3 <i>Novel Tank Test</i>	9
3.2.5 Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS	11
4.1 ANÁLISIS INTERGRUPAL.....	11
4.2 ANÁLISIS INTRAGRUPAL	15
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

RESUMEN

El enriquecimiento ambiental es firmemente reconocido como una de las estrategias para conseguir o incrementar el bienestar de los animales en cautiverio, el cual es un tema de gran importancia hoy en día. Uno de los factores que pueden perturbar el bienestar animal y producir efectos negativos es estar sometidos a condiciones de estrés.

Este estudio se ha centrado en el pez cebra, uno de los modelos animales ampliamente utilizado en investigaciones científicas, con el objetivo de analizar si el enriquecimiento ambiental puede atenuar los efectos negativos del estrés en peces teleósteos.

Para llevar a cabo el estudio, se seleccionaron hembras de peces cebra, que fueron asignadas a dos grupos: un grupo control, y un grupo experimental con un entorno enriquecido. Posteriormente, cada grupo se sometió a un protocolo de estrés crónico impredecible durante un periodo 7 días. Los efectos sobre el comportamiento de los peces fueron evaluados utilizando el test denominado *Novel Tank Test*.

Los datos obtenidos demuestran que el estrés y el enriquecimiento ambiental no modifican parámetros cinéticos, sin embargo, sí afectan a la distribución de los peces en las zonas del tanque, favoreciendo una conducta más exploratoria por parte de los peces mantenidos en un ambiente enriquecido.

Palabras clave: enriquecimiento ambiental, estrés, *Novel Tank Test* (NTT), pez cebra protocolo de estrés crónico impredecible (UCS).

ABSTRACT

Environmental enrichment is firmly recognised as one of the strategies to achieve or increase the welfare of animals in captivity, which is an issue of great importance today. One of the factors that can disrupt animal welfare and produce negative effects is being subjected to stressful conditions.

This study focused on zebrafish, one of the animal models widely used in scientific research, with the purpose to analyse if environmental enrichment can attenuate the negative effects of stress in teleost fish.

To carry out the study, female zebrafish were selected and assigned to two groups: a control group and an experimental group with an enriched environment. Each group was then submitted to an unpredictable chronic stress protocol for a period of 7 days. The effects on the behaviour of the fish were evaluated using the Novel Tank Test.

The data obtained show that stress and environmental enrichment do not modify kinetic parameters, however, they affect the distribution of the fish in the tank zones, favouring a more exploratory behaviour by the fish kept in an enriched environment.

Key words: environmental enrichment, stress, Novel Tank Test (NTT), zebrafish Unpredictable Chronic Stress (UCS) protocol.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIENESTAR ANIMAL

El bienestar animal es un tema con un interés creciente dentro de nuestra sociedad. La legislación y la normativa existente se ha desarrollado mucho más en especies terrestres que en especies acuáticas, aunque es cierto que, en Europa, desde el año 2010, la experimentación con especies acuáticas también está incluida en la ley de protección de los animales utilizados para fines científicos (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2010). Centrándonos en las especies acuáticas, podemos entender que el bienestar animal implica asegurar tanto la salud como la productividad en cada especie (Rubio Limonta y Silveira, 2009). Para garantizar ambas cosas, es necesario que el animal esté en un ambiente óptimo proporcionándole el abastecimiento y acceso en todo momento de alimento y agua; el animal debe disponer de unas dimensiones y condiciones ambientales adecuadas a su especie, esenciales para el desarrollo de un comportamiento natural o lo más natural posible, así como evitar perturbaciones ambientales que puedan causar estrés en los animales. El buen estado físico del animal implica la ausencia de molestias que impliquen algún tipo de lesión, dolor o enfermedad (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

En España, el bienestar animal se encuentra descrito y regulado por numerosas leyes, entre ellas está la reciente Ley 7/2023, de 28 de marzo, de protección de los derechos y el bienestar de los animales, en la cual se establecen los aspectos básicos en relación con el trato y cuidado de animales que conviven en nuestro entorno (L 7/2013, de 28 de marzo).

En relación con el ámbito de la investigación, las condiciones de los animales utilizados para esos fines vienen determinadas en Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (modificado por el Real Decreto 1386/2018 y el Real Decreto 118/2021), el objetivo o la finalidad se engloba en las “tres erres”, donde se busca reemplazar y reducir el número de animales empleados para fines experimentales, así como el refinamiento de las técnicas de manipulación.

Entre las múltiples variables que se exigen tener en cuenta para lograr un mantenimiento óptimo de los peces en cautividad, está el suministro y calidad del agua, cantidad de oxígeno, pH, temperatura, iluminación, densidad de ocupación, entre otros factores. Cabe destacar que se hace especial mención a la complejidad del entorno, indicando que se debe facilitar a los

peces un enriquecimiento ambiental adecuado, y lugares para esconderse o sustrato de fondo (RD 53/2013).

1.2 ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

Cuando se busca el bienestar animal, el enriquecimiento ambiental es un factor clave que se puede conseguir, por ejemplo, mediante la adición de elementos al entorno donde se encuentra el animal y que supongan nuevos estímulos para el mismo. Este enriquecimiento busca mejorar la calidad de vida y satisfacer necesidades conductuales. En relación con los peces, el enriquecimiento puede ser de diversas formas (Arechavala-López *et al.*, 2022):

- Estructural: mediante adición de estructuras que pueden usar de refugio o de sustratos para aquellas especies que interactúan con el fondo.
- Sensorial:
 - o Visual: la cantidad y el tipo de luz influye en la cronobiología del pez.
 - o Auditivo: el ruido generado por las bombas de agua, flujo del agua o vibraciones pueden causar un efecto negativo en los peces. Hay que procurar establecer un correcto aislamiento.
 - o Químico: permite la orientación y las interacciones tanto intraespecíficas como interespecíficas (búsqueda de pareja, presencia de depredadores, búsqueda de alimento). Por ejemplo, el estímulo del gusto puede influir en el ahorro energético y la modulación de la saciedad que repercuten en el crecimiento.
- Ocupacional: introduciendo desafíos en el ambiente, por ejemplo, modulando los flujos de agua para la mejora de su capacidad de natación.
- Social: comprende la presencia de otros individuos junto con las interacciones sociales y la disponibilidad de espacio para interactuar.
- Dietético: la distribución adecuada de los alimentos en el tiempo y el espacio, el tamaño de la ración de alimentos y las características de estos dependiendo de cada etapa de vida.

El efecto del enriquecimiento ambiental se ha estudiado en numerosas especies terrestres. Por ejemplo, en monos araña en cautiverio, disminuye las conductas agresivas y potencia las de exploración (Márquez-Arias *et al.*, 2014). Asimismo, en el área clínica, se ha estudiado su efecto sobre enfermedades como el alzhéimer, donde en modelos de roedores produce una mejora de la estructura y funcionalidad cerebral (Liew *et al.*, 2022).

Por otro lado, en animales acuáticos, se ha demostrado que, el uso de estructuras físicas en el tanque reduce la agresión entre especies territoriales como son el pez roca negro (*Sebastes schlegelii*) y el pez Greenling gordo (*Hexagrammos otakii*) (Zhang *et al.*, 2021). En los esturiones (*Acipenser ruthenus*) el color negro de los fondos de los tanques mejora el crecimiento, la supervivencia y el sistema inmune (Bayrami *et al.*, 2016). En el ámbito de interés comercial, se ha visto que la adición de corrientes de agua mediante bombas de recirculación estimula el crecimiento relativo de las truchas arcoíris, obteniendo así un mayor rendimiento de producción (Llave Propín, 2022).

1.3 EMPLEO DE ESPECIES MODELO EN INVESTIGACIÓN: EL PEZ CEBRA

El empleo de especies modelo (algunas de ellas acuáticas) ha sido crucial para lograr descubrir muchos de los efectos positivos del enriquecimiento ambiental. Una de estas especies es el pez cebra (*Danio rerio*). Se trata de un teleósteo perteneciente al orden de los Cypriniformes y a la familia Danionidae (NCBI, 2020), cuyo hábitat se basa en arroyos o ríos de montaña poco profundos y tranquilos, aunque también puede estar presente en zonas donde hay presencia del hombre como son los arrozales. Su distribución geográfica está situada principalmente en el noreste, sur y oeste de la India y en zonas como Pakistán, Nepal o Bangladesh (Parichy, 2015).

Esta especie es de pequeño tamaño, los adultos miden aproximadamente 4 cm de largo. La boca está dirigida hacia arriba sobresaliendo la mandíbula inferior. El elemento más característico que presentan en su cuerpo fusiforme y comprimido lateralmente, son las 5 o 7 franjas longitudinales de color azul oscuro que van desde el opérculo hasta la aleta caudal. El patrón de color viene determinado por células pigmentarias: melanóforos (azul oscuro) xantóforos (dorados) e iridóforos (iridiscente). Las franjas centrales se forman primero y posteriormente se desarrollan las demás secuencialmente. Presentan dimorfismo sexual; aunque los machos y las hembras tienen una coloración similar, los machos tienden a ser más alargados y tener aletas anales más grandes con una coloración más amarilla. Las hembras suelen ser más grandes y con una forma corporal más redondeada, sobre todo en el abdomen. Aunque la característica más fiable para distinguirlos es la presencia de una pequeña papila genital delante del origen de la aleta anal (Spence *et al.*, 2008).

El pez cebra presenta muchas ventajas que hacen de él un excelente modelo animal; entre ellas encontramos su pequeño tamaño y sencillez en sus condiciones de mantenimiento, esto facilita el almacenamiento y la posibilidad de mantener una gran cantidad de ejemplares.

Otro aspecto para tener en cuenta es su alta fecundidad, ya que la hembra puede poner más de 300 huevos por semana. Además, la mayoría de los órganos realizan funciones similares a las de los humanos, aunque con algunas diferencias fisiológicas y anatómicas (Joshi, 2022). Otra ventaja importante es que alcanza la maduración sexual en 2 o 3 meses, y esto ahorra tiempo, por ejemplo, para generar líneas transgénicas (Bozkurt, 2020). Además, el genoma del pez cebra se encuentra completamente secuenciado y aproximadamente el 70% de los genes humanos tienen al menos un ortólogo en el pez cebra; es decir, presentan una similitud en las secuencias de esos genes, en concreto presentan un 82 % de similitud en los genes que están relacionados con procesos de enfermedades humanas (Howe *et al.*, 2013).

Por todo ello, su uso como modelo experimental se ha extendido en diversos campos científicos, entre los más recientes se encuentran:

- Estudios de enfermedades: aquellas relacionadas con el sistema nervioso central, ya que muestra la organización y bioquímica muy parecida a la que presenta los vertebrados (Zabegalov *et al.*, 2021); en enfermedades cardíacas, debido la conservación de las estructuras y células especializadas (Bowley *et al.*, 2022); se destaca también su aportación en la investigación sobre el cáncer a la hora de detectar carcinógenos, estudio de células madre, angiogénesis, tumores y microambiente (Kwiatkowska *et al.*, 2022).
- Estudios de regeneración: los peces cebra pueden recuperarse tras un daño significativo en una variedad de estructuras como por ejemplo el músculo cardíaco y esquelético, cerebro, médula espinal, retina, páncreas, hígado y riñón (Kaliya-Perumal y Ingham, 2022).
- Estudios toxicológicos: por ejemplo, de las nanopartículas de óxido metálico que se utilizan en la fabricación de fármacos, cosméticos, aditivos alimentarios, textiles, pinturas y ungüentos antibacterianos (D'Amora *et al.*, 2022).
- Estudios inmunológicos: investigación sobre la inmunidad innata, ya que el sistema inmune que posee el pez cebra está muy conservado (Hsu *et al.*, 2022).

1.4 EL ESTRÉS EN PECES Y SU IMPACTO EN EL BIENESTAR ANIMAL

El estrés es un elemento que altera el metabolismo y el comportamiento del animal. Cuando el pez está sometido a un tipo de estrés, el eje hipotalámico-pituitario-interrenal (HPI, similar al eje hipotalámico-pituitario-adrenal en mamíferos) se ve afectado, pudiendo modificar el comportamiento del animal (Demin *et al.*, 2020). Entre los mecanismos químicos que estimula estrés se encuentra la síntesis y liberación de adrenalina, noradrenalina y de cortisol,

este último actúa en el receptor de glucocorticoides (se produce un aumento en el número de receptores), induciendo respuestas metabólicas y conductuales (Demin *et al.*, 2020). Si hay una liberación de cortisol sostenida en el tiempo, da lugar a la movilización de recursos energéticos, aumentando con ello la fosforilación oxidativa y consecuentemente las especies reactivas del oxígeno, lo cual puede provocar daño tisular y estrés oxidativo (Marcon *et al.*, 2018). Otra vía de señalización que se activa es la de la prolactina (activa el eje HPI) e hipocretina/orexina, neuropéptidos que regulan la ingesta de alimentos o el sueño. La melatonina también interviene en la respuesta al estrés ya que se encargará de reducir los comportamientos similares a la ansiedad (Demin *et al.*, 2020).

Si los estímulos estresantes o estresores se prolongan en el tiempo se considera que el estrés es crónico (Robayo Noguera, 2021). Por lo general, el estrés crónico en peces cebra puede dar lugar a comportamientos relacionados con la ansiedad: congelamiento, letargo, movimientos erráticos, tigmotaxis (permanecer cerca de las paredes o en el fondo) o hiperactividad. Por otro lado, también pueden presentar otros fenómenos relacionados con la ansiedad: exploración, búsqueda de comida, preferencia por entornos oscuros, habituación, agresión y por último adquisición de memoria. Dado que los factores estresantes pueden causar habituación, cuando se estudia el efecto del estrés, se realizan protocolos de estrés impredecible (Demin *et al.*, 2020).

Una de las pruebas para analizar el comportamiento es el *Novel Tank Test* (NTT). Esta prueba consiste en introducir al animal en un tanque y grabar su trayectoria de nado durante un periodo de tiempo, posteriormente se analiza la permanencia en cada parte o zona determinada del tanque u otros parámetros que se desean obtener como la velocidad de natación. Estos parámetros permiten determinar los niveles de ansiedad de los ejemplares.

En este trabajo se utilizará el test NTT para evaluar el efecto del enriquecimiento ambiental sobre la conducta del pez cebra en animales estresados. De esta forma se pretende determinar si el enriquecimiento ambiental es una herramienta útil para reducir los efectos negativos del estrés en esta especie modelo; de ser así, los resultados podrían ser potencialmente transferibles a otras especies de interés comercial, en las que el estrés asociado a su domesticación puede afectar a su producción y reducir los beneficios en la industria de la acuicultura.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis del presente trabajo es que el mantenimiento de los peces cebra en un ambiente enriquecido disminuye los efectos del estrés sobre su conducta.

El objetivo general de este trabajo es estudiar si el enriquecimiento ambiental modifica la conducta de los animales y determinar si los peces que han sido mantenidos en ambientes enriquecidos sufren menos alteraciones de conducta ante condiciones de estrés.

Los objetivos específicos son:

1. Realizar un enriquecimiento ambiental mediante la simulación de un ambiente natural en el grupo experimental de peces.
2. Valorar la conducta de los peces del grupo control y experimental mediante el test NTT.
3. Inducir un protocolo de estrés crónico en el grupo control y experimental y analizar la conducta de los animales mediante el test NTT.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos experimentales que se han llevado a cabo durante este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de León (70/6693), así como por el órgano competente de la Junta de Castilla y León (ULE009-2020). Además, el proyecto se ajustó a las directrices del Reglamento del Consejo de la Unión Europea y la normativa española para el uso de animales en el laboratorio. La inducción del protocolo de estrés crónico se llevó a cabo exclusivamente por personal autorizado perteneciente al grupo de investigación de *Repromol* de la Universidad de León.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se han utilizado un total de 20 hembras de pez cebra de 9 meses de edad. Los ejemplares se dividieron en dos grupos: control (CTRL) y ambiente enriquecido (EE). Ambos grupos constaron con dos tanques (3 L) con 5 hembras/tanque. Un mes antes del inicio del experimento, las hembras fueron marcadas individualmente con elastómeros (ver descripción posterior en la sección 3.2.1) para poder realizar el seguimiento individual de cada ejemplar.

Los tanques del grupo CTRL no presentaron ningún tipo de enriquecimiento físico ni visual, siendo los laterales de los tanques cubiertos con unas láminas opacas. Las dos réplicas técnicas del grupo EE contaron con la presencia de enriquecimiento ambiental físico y visual a

través de los siguientes elementos: 1) piedras distribuidas en el fondo del tanque; 2) una planta artificial de plástico y 3) imágenes del biotopo (río del sudeste asiático) en los laterales del tanque para simular su ambiente natural (**Figura 1A**). Todas las hembras fueron alimentadas con el mismo tipo de alimento para evaluar exclusivamente el potencial efecto del enriquecimiento. La dieta consistió en una combinación de pienso comercial pelletizado (400-600 μm) específico para la especie (Zebrafeed®; Sparos) y nauplios de *Artemia franciscana* de 48 horas tras la eclosión. Las dosis de alimento y de nauplios de artemia fueron 63.70 ± 3.01 mg y 277.50 ± 14.27 individuos respectivamente (**Figura 1B**). Los quistes artemia fueron eclosionados en agua marina artificial (33 g/L) en un artemiero comercial (*Hobby*). Los tanques de experimentación se mantuvieron en un sistema recirculante comercial de estabulación de pez cebra (*Aquatic Habitats*) en condiciones ambientales de fotoperiodo 14 h luz : 10 h oscuridad y temperatura 27 ± 1 °C. Estas condiciones se mantuvieron controladas y constantes durante los 3 meses de experimentación.

A día 90, se realizó una evaluación individual del comportamiento mediante un NTT (ver la descripción detallada en sección 3.2.3) con el objetivo de conocer el estatus de los peces en un punto inicial antes de la inducción de estrés. Un día después de la grabación, se sometió a los ejemplares a un protocolo de estrés crónico impredecible (UCS, del inglés *Unpredicted Chronic Stress*; ver descripción en la sección 3.2.2) durante 7 días. Finalizado el protocolo de inducción de estrés, se volvió a evaluar el comportamiento de los ejemplares mediante NTT para analizar el efecto del enriquecimiento ambiental sobre parámetros de comportamiento (**Figura 1C**).

3.2.1 Marcaje con elastómeros (*visible implant elastomers*; VIE)

Se utilizaron elastómeros de dos colores (rojo y verde) para el marcaje de los ejemplares y siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Northwest Marine Technology*). Una vez anestesiados (empleando una solución de 16.80 mg de triclaína/100 mL de agua), se inyectó debajo de las escamas de la parte dorsal del pez un pequeño volumen del elastómero mezclado con el agente solidificante. La posición de la inyección y la combinación de colores permitió establecer un código de identificación único para cada hembra en los dos grupos permitiendo el estudio individualizado de cada animal a lo largo del experimento.

3.2.2 Protocolo de estrés crónico impredecible (UCS)

En este procedimiento basado en el protocolo publicado por Marcon *et al.* en 2018 y adaptado por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este TFG (García Valcarce

et al., 2023), los peces se sometieron durante una semana a una combinación de diferentes estresores, de forma aleatoria, dos veces al día como se refleja en la **Figura 1C**.

Los estresores agudos utilizados fueron:

- Calentamiento del agua del tanque hasta los 33 °C (30 min).
- Exposición a un vídeo de un depredador (50 min).
- Enfriamiento del agua del tanque hasta los 23 °C (30 min).
- Hacinamiento de 5 animales en 125 ml (50 min).
- Reducción del nivel de agua, exponiendo la pared dorsal del cuerpo (2 min).
- Cambio de tanque, tres veces consecutivas (con intervalos de 30 min).
- Persecución con red (8 min).

La realización de estos procedimientos fue llevada a cabo por miembros del equipo de investigación acreditados para ello.

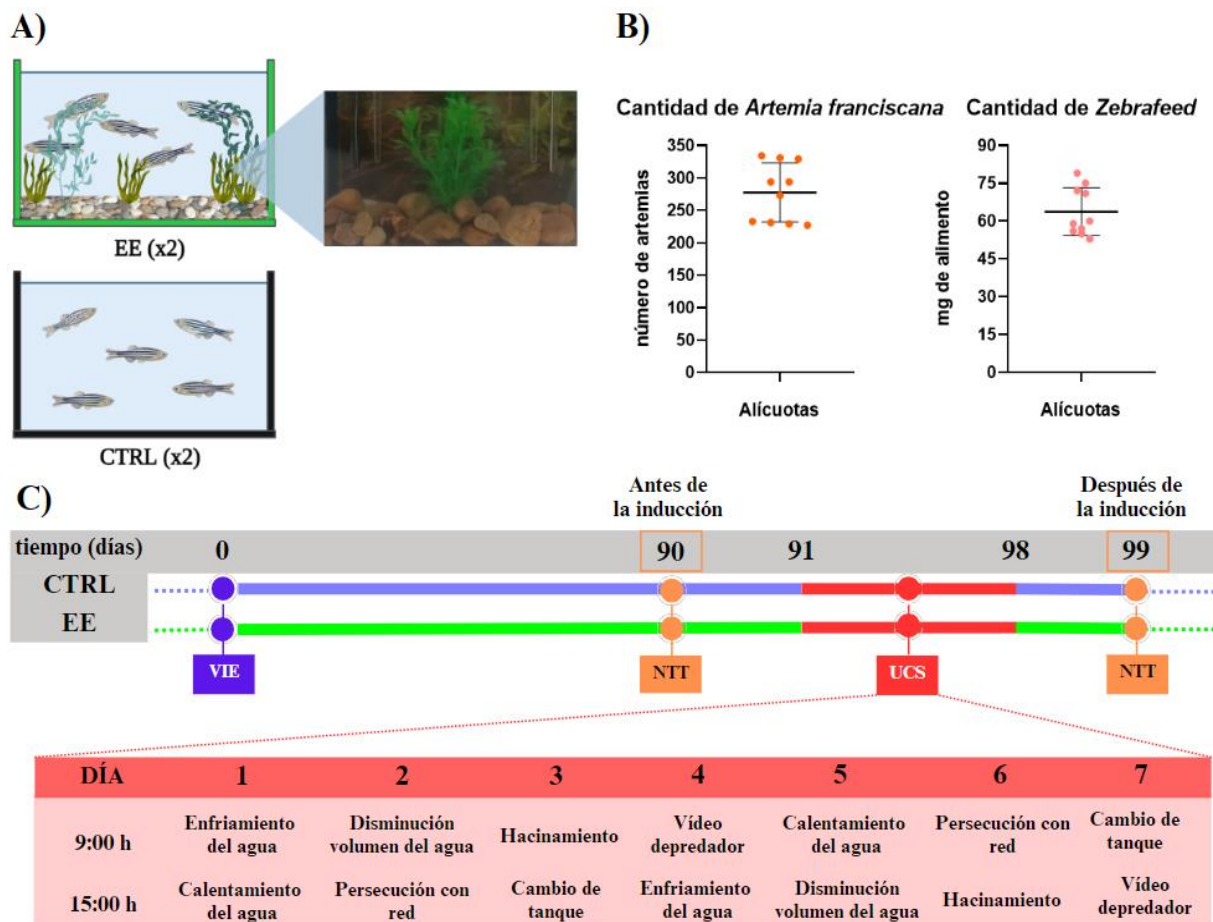
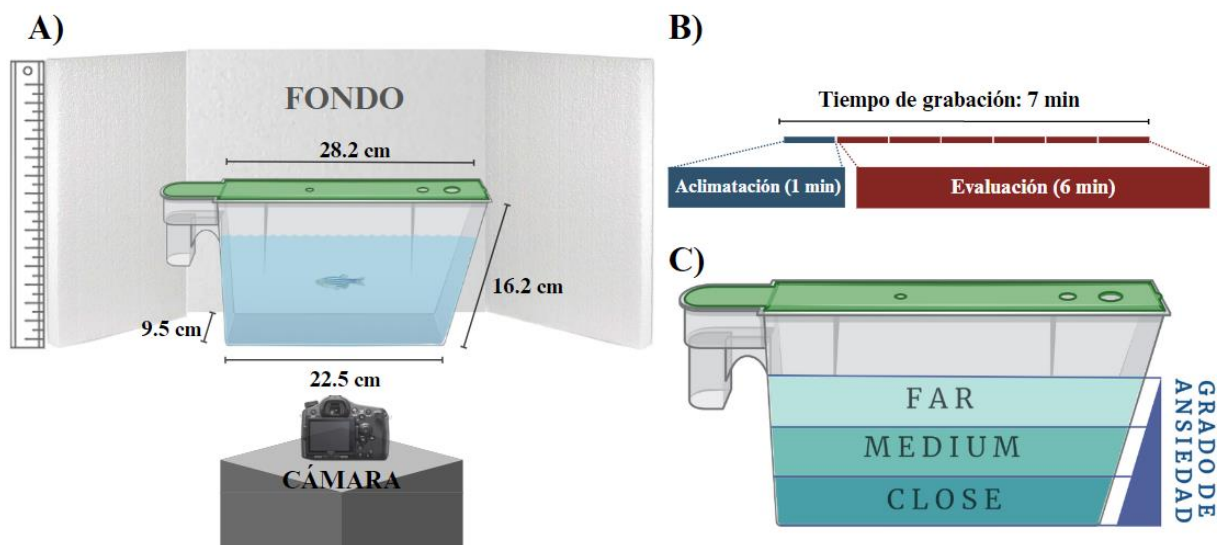


Figura 1. (A) Representación de los tanques del grupo con enriquecimiento ambiental (EE) con sus respectivos elementos y del grupo control (CTRL) (creado con BioRender.com). (B) Cantidad media de *Artemia franciscana* y mg de alimento para peces *Zebrafeed*® (*Sparos*) proporcionados a las hembras. (media \pm SEM). (C) Cronología del experimento. Se representan los puntos clave del experimento VIE: marcaje con elastómeros, NTT: *Novel Tank Test* realizado en el día 90 (antes de la inducción de estrés) y el en el día 99 (tras la inducción de estrés) y UCS: protocolo de estrés crónico impredecible distribuido a lo largo de 7 días (basado en Marcon et al., 2018; García Valcarce et al., 2023) (creado con canva.com).

3.2.3 Novel Tank Test

En cada punto de muestreo del experimento (antes y después de ser sometidos al protocolo de estrés inducido), los peces fueron grabados de manera individual en un tanque nuevo (*novel tank*) con el objetivo de analizar su patrón de natación para evaluar su nivel de ansiedad. Para ello, cada ejemplar fue extraído de su tanque de estabulación y depositado individualmente en el fondo del tanque de evaluación con una red. El tanque de grabación utilizado como arena desconocida para el test fue un tanque de policarbonato localizado en la misma sala de estabulación de los animales dispuesto en un entorno aislado con el objetivo de reducir el número de estímulos posibles. Así, el perímetro del tanque de evaluación fue cubierto con láminas blancas para evitar la existencia de estímulos visuales. El tanque se mantuvo en un mismo punto durante todas las evaluaciones para no variar el plano de grabación. En dicho plano se localizó una regla para la posterior conversión de píxeles en unidades métricas permitiendo el cálculo de parámetros cinéticos (**Figura 2A**).

El test de comportamiento NTT fue de 7 minutos para cada hembra (1 minuto considerado de aclimatación + 6 minutos de evaluación; **Figura 2B**). El agua del tanque de evaluación fue obtenida del sistema de estabulación y cambiada periódicamente durante la grabación de los vídeos. Los vídeos fueron grabados con una cámara SK8CAM ÉLITE PLUS. Tras los 7 minutos de grabación, los peces fueron separados en tanques de recuperación donde se comprobó la marca individual para su identificación. Finalizado el periodo de grabación los ejemplares volvieron a su tanque de estabulación.



3.2.4 Análisis de comportamiento

El análisis de los vídeos grabados se realizó utilizando el software de EthoVision® XT 16 (Noldus). Con este programa se dividió virtualmente la arena correspondiente al tanque de evaluación en tres zonas homogéneas: baja o *close*, media o *medium* y alta o *far* en relación con la distancia al fondo del tanque (**Figura 2C**). La zona *far* es la de mayor interés en este diseño experimental ya que la natación en la proximidad de la superficie se correlaciona con menor nivel de ansiedad en los peces (Egan *et al.*, 2009). EthoVision® XT es un software que permite registrar la actividad y el movimiento de los animales. Se determinaron los siguientes parámetros en el presente trabajo: distancia recorrida, velocidad media, frecuencia y latencia en zona alta del tanque (*far*).

El trabajo para realizar el análisis de la compilación de vídeos (n=20 por punto experimental) fue:

1. Configuración de la arena (*Arena settings*): se determinó la región del vídeo donde potencialmente se puede producir presencia del animal, en este caso el plano lateral del tanque. Posteriormente, se dividió el arena en las zonas *close*, *medium* y *far* (**Figura 2C**).
2. Conversión de píxeles a unidades métricas: mediante la regla presente en el plano de los vídeos.
3. Configuración de la prueba (*Trial control settings*): se especificaron las condiciones específicas para el análisis. En el presente experimento, se estableció el inicio de la adquisición de datos a partir del primer fotograma correspondiente tras 60 s de grabación (establecido en el diseño experimental como tiempo de adaptación del pez) y hasta los 360 s desde el comienzo de la adquisición de datos, correspondiente a los 6 minutos de evaluación del NTT.
4. Configuración de la detección de los ejemplares (*Detection settings*): se ajustó la forma y el objeto a reconocer por el sistema de análisis, tomando un fotograma-ejemplo en el que aparecía un pez de perfil claramente reconocible por contraste y color frente al fondo del plano, delimitando así el conjunto de píxeles a reconocer y trazar por el software.
5. Generación y listado de ensayos (*Trial list*): se etiquetó cada vídeo para su codificación y posterior procesamiento mediante la asignación de variables independientes, en este caso pertenencia al grupo CTRL o EE y muestreo, antes y después de la inducción de estrés (BEFORE; día 90 - AFTER; día 99).

6. Elaboración del perfiles de datos (*Data profiles*) y perfil de análisis (*Analisis profiles*). Se elaboró un esquema de la red de procesamiento agrupando los vídeos para su análisis en función de las variables independientes. Asimismo, se especificaron los parámetros deseados en el análisis: velocidad, distancia total recorrida, tiempo en cada zona y latencia a la zona más alejada del fondo (*far*).

3.2.5 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con *GraphPad Prism* versión 8.0.1. Se comprobó si las variables presentaban una distribución normal mediante un test de Shapiro-Wilk. La comparación CTRL frente a EE en cada muestreo fue realizada mediante una prueba t de Student para muestras no pareadas en aquellas variables que seguían una distribución normal o una prueba U de Mann-Whitney para aquellas que seguían una distribución no paramétrica. Del mismo modo, se compararon con test para muestras pareadas las variables antes y después de la inducción del estrés en cada grupo, mediante prueba t-Student para muestras pareadas en las variables que seguían distribución normal o mediante prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas. Se representan los datos junto con el valor medio \pm SEM. Las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Para analizar todos los parámetros obtenidos, se llevaron a cabo dos tipos de comparaciones: 1) Análisis intergrupar: comparación entre ambos grupos experimentales (EE y CTRL) antes y después del protocolo UCS y 2) Análisis intragrupal: comparación entre las variables de cada individuo dentro del grupo experimental al cual pertenecían, antes y después de aplicar el protocolo UCS.

4.1 ANÁLISIS INTERGRUPAL

- **Cinética**

Tras 90 días de las diferentes condiciones experimentales, la distancia media total que recorrieron los peces del grupo CTRL fue de 2621 ± 199.20 cm frente a los 2505 ± 157.80 cm recorridos por el grupo EE (**Figura 5A**). Por otro lado, la velocidad media fue de 7.43 ± 1.74 cm/s del grupo CTRL y de 7.07 ± 1.38 cm/s del grupo EE (**Figura 5B**). No se encontraron diferencias significativas en la comparación de los datos de ambas variables ($p > 0.05$). Siguiendo la misma tendencia, tras la inducción del estrés crónico, las variables referentes a la cinética de los peces no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La distancia recorrida media total en este segundo muestreo en los peces del grupo control fue de 2770 ± 540.10 cm frente a los 2140 ± 148.30 cm recorridos por el grupo EE (**Figura 5C**). En cuanto a

la velocidad media, la del grupo CTRL fue de 7.78 ± 1.51 cm/s mientras que la del grupo EE de 6.08 ± 0.41 cm/s (**Figura 5D**).

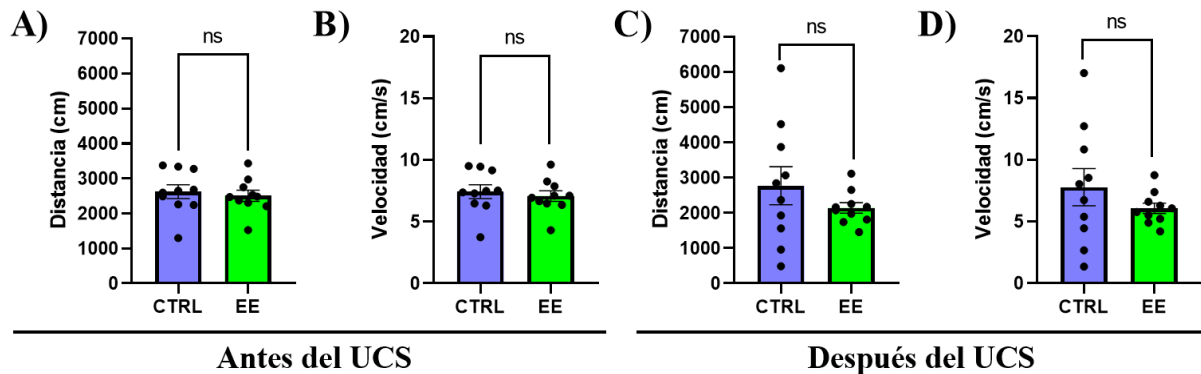


Figura 5. Parámetros cinéticos de los grupos control (CTRL) y ambiente enriquecido (EE): distancia total recorrida y velocidad media antes (A y B) y después (C y D) de aplicar el protocolo de estrés crónico impredecible (UCS). Los datos se representan junto con la media \pm error estándar. ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$).

- **Preferencia de zona**

El porcentaje de permanencia en cada zona del tanque se calculó empleando el total de segundos que permanecieron los peces en dichas zonas en relación con el tiempo total de duración del NTT (6 minutos). La permanencia en la zona *far* del grupo CTRL alcanzó una media de 5.63 ± 1.34 %, presentando un máximo de 12.10 % y un mínimo de 0.34 % (**Figura 6A**). La media de permanencia del grupo EE fue de 16.31 ± 6.56 %, contando con un máximo de 55.45% y un mínimo de 1.5 % (**Figura 6A**). El análisis estadístico no reportó diferencias significativas ($p = 0.35$) en esta zona, ni tampoco en las otras zonas *med* ($p = 0.11$) ni *close* ($p = 0.14$) (**Figura 6B y 6C**).

Tras el protocolo de estrés, la permanencia en la zona *far* registrada tanto en el grupo CTRL como en el grupo EE fue menor en valores medios alcanzando unos valores medios de 0.72 ± 0.40 % y 2.99 ± 1.74 %, respectivamente. Los individuos que puntuaron con mayor porcentajes en cada grupo fueron 3.88 % en CTRL y 18.12 % en EE (**Figura 6D**). El impacto de protocolo de estrés se reflejó en el incremento de los porcentajes en la zona cercana al fondo del tanque con valores medios de permanencia en esta zona por encima del 80% en ambos grupos (**Figura 6F**). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre grupos entre las zonas. No se encontraron diferencias significativas.

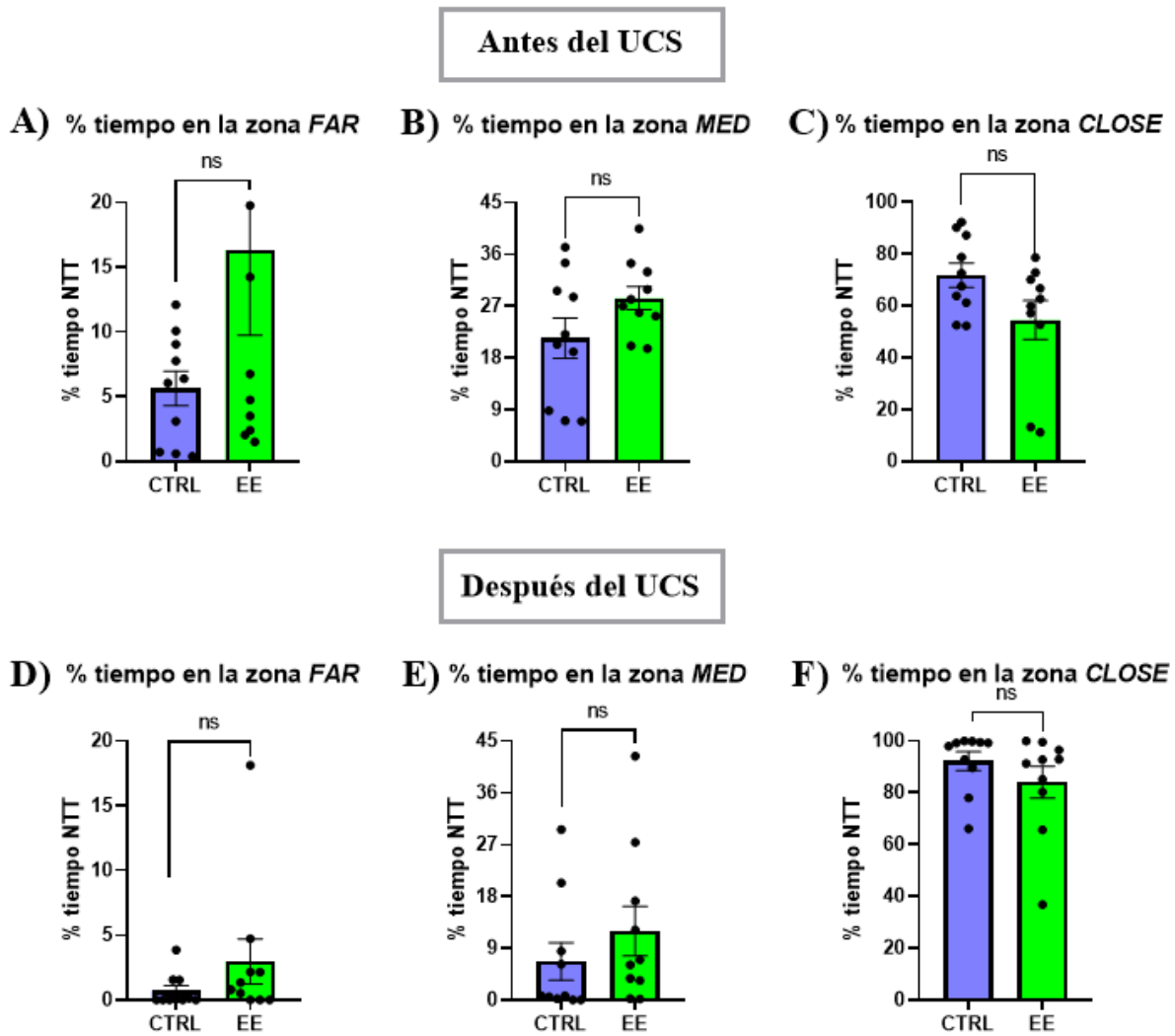


Figura 6. Porcentaje de permanencia en la zona *far*, *med* y *close* de los grupos control (CTRL) y ambiente enriquecido (EE) antes (A, B, C) y después (D, E, F) de aplicar el protocolo de estrés crónico impredecible (UCS). Los valores se expresan junto media \pm error estándar. ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$).

Con el objetivo de realizar un análisis más pormenorizado, se analizó el porcentaje de permanencia en la zona *far* de ambos grupos en cada minuto del NTT antes y después del UCS para interpretar de forma más clara el comportamiento de cada grupo experimental (**Figura 7**).

Antes de aplicar el protocolo de estrés, la permanencia en la zona por minutos en el caso del grupo CTRL, oscilaba entre el 0 y 2 %. Una vez aplicado, la ventana de permanencia se redujo hasta un intervalo entre 0 y 0.3 %. El grupo EE antes del UCS y a lo largo de los seis minutos, se mantuvo en una franja del 2 al 4 % en la zona *far*; después de aplicar el protocolo, esta permanencia decayó hasta intervalos entre 0.1 y 1 %.

Cabe destacar que la permanencia en esta zona del tanque del grupo EE, aunque no sea significativa, se mantiene siempre por encima de los niveles del grupo CTRL, tanto antes como después el UCS.

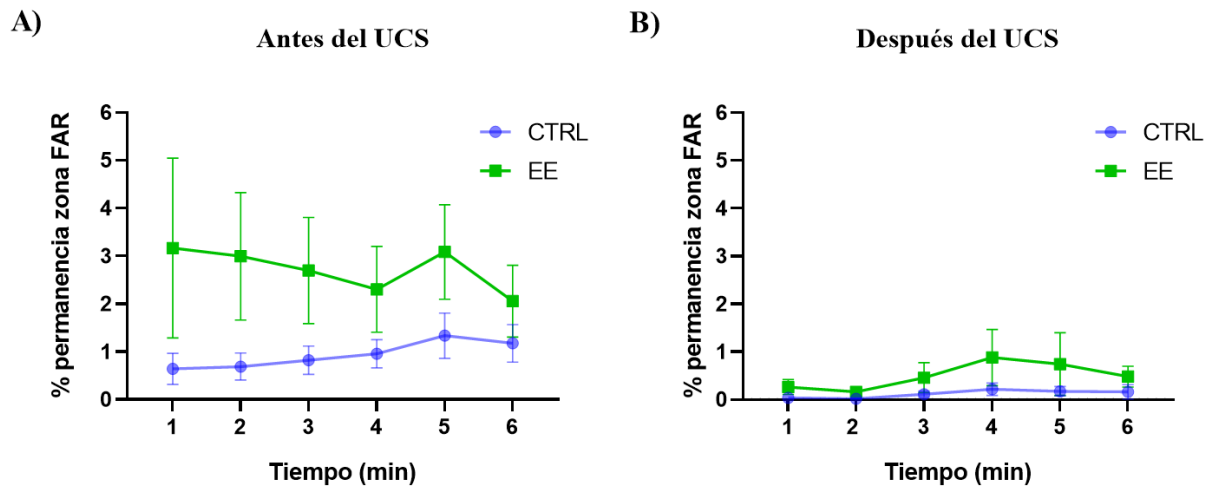


Figura 7. Porcentaje de permanencia en la zona *far* (A) antes y (B) después del protocolo de estrés crónico impredecible (UCS) de los grupos control (CTRL) y ambiente enriquecido (EE) a lo largo de cada minuto del *Novel Tank Test*. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

- **Latencia en zona *far***

La latencia se corresponde con el tiempo que tardan los animales en ser detectados por el software por primera vez en una zona especificada del arena. Los datos correspondientes para la zona *far*, se muestran en la **Figura 8A**. A los individuos que no alcanzaron la zona de estudio se les asignó el valor de 360 s (duración del NTT). El pez que más rápido se localizó en la zona *far* del grupo CTRL tardó un mínimo de 8.60 s en alcanzar esa zona mientras que el más reticente a nadar en esta zona tardó un máximo de 284.20 s. Por el contrario, en el grupo EE tres individuos se encontraban al iniciar el NTT en esa zona (representados con el valor de 0 s) y los más reticentes a la natación en esta zona tardaron un máximo de 198.30 s en ser detectados. En ambos grupos todos los ejemplares alcanzaron la zona más alejada del fondo durante el NTT como se muestra en la **Figura 8B**.

El protocolo de estrés provocó una alteración evidente en los gráficos de latencia de las hembras evaluadas (**Figura 8C**). La hembra más rápida en nadar en la zona más cercana a la superficie del grupo CTRL tardó 20.40 s mientras que el tiempo mínimo del grupo EE se situó en 3.30 s. En ambos casos hubo individuos que no alcanzaron la zona durante el transcurso del NTT y se les atribuyó un tiempo de 360 s (duración total del NTT). Por otro lado, la fracción de individuos que alcanzaron la zona *far* (**Figura 8D**) en el grupo CTRL fue del 50 % y en el grupo EE alrededor del 65 %.

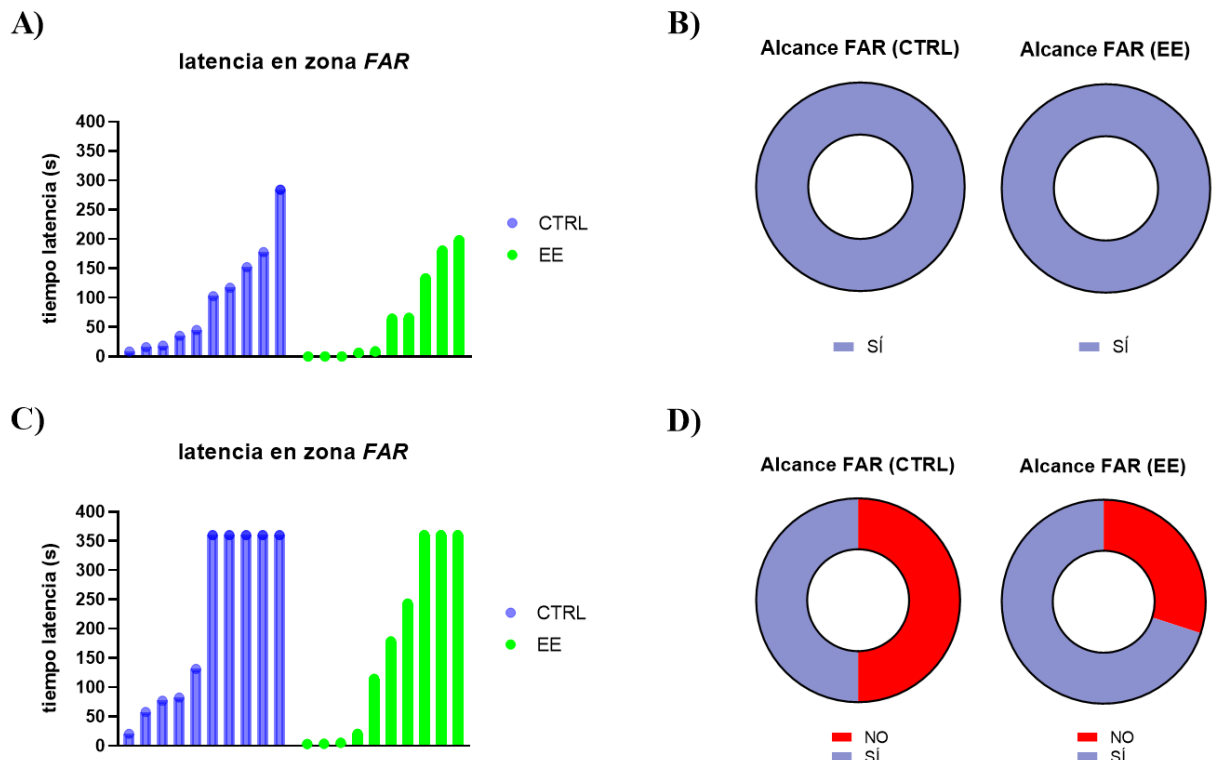


Figura 8. Tiempo de latencia de los grupos control (CTRL) y ambiente enriquecido (EE) hasta alcanzar la zona *far* (A) antes del protocolo de estrés crónico impredecible (UCS) y después (C). Fracción de individuos que alcanzaron la zona *far* (B) antes y (D) después del UCS.

4.2 ANÁLISIS INTRAGRUPAL

La comparación se hizo entre cada individuo gracias a las marcas con elastómeros, contando con 10 peces en cada grupo. En este caso, en las gráficas, cada pez se representa con puntos conectados, indicando el antes y después del UCS.

- **Cinética**

Los parámetros cinéticos distancia total recorrida y velocidad se representan en la **Figura 9**. Tras el análisis pareado de las variables, no se encontraron diferencias significativas entre los datos de antes y después del UCS ni en el grupo CTRL ni el grupo con enriquecimiento ambiental EE.

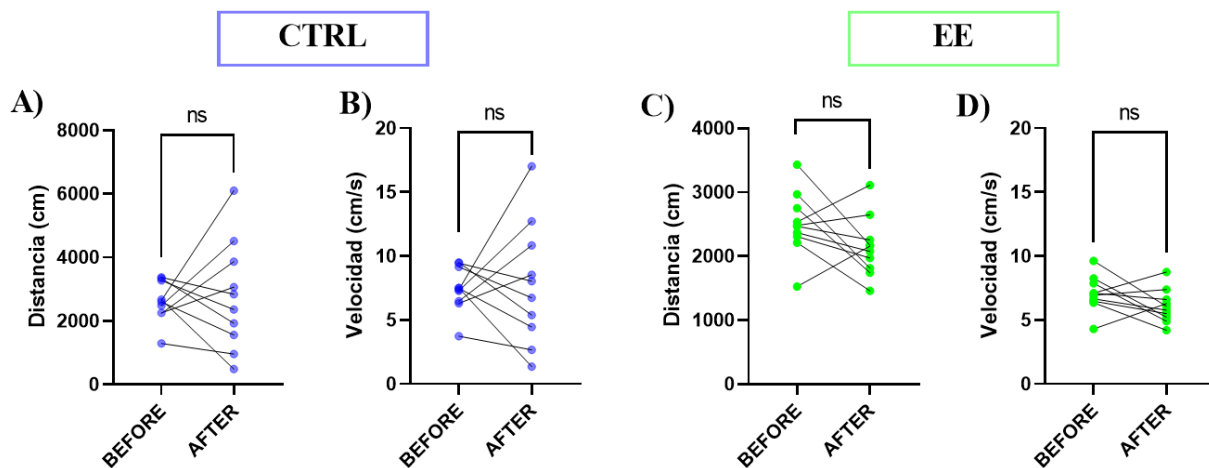


Figura 9. Parámetros cinéticos medidos antes (*before*) y después (*after*) de aplicar el protocolo de estrés crónico impredecible: (A) Distancia total recorrida y (B) velocidad media de cada pez del grupo control (CTRL). (C) Distancia total recorrida y (D) velocidad media de cada pez del grupo de ambiente enriquecido (EE). ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$).

- **Preferencia de zona**

En la **Figura 10** se puede observar que, en el grupo CTRL, una vez aplicado el UCS, en la zona *far* 9 de los 10 peces disminuyeron su porcentaje de permanencia y 5 de las hembras no volvieron a nadar en esa franja (0% de permanencia). En la zona *med* observamos una disminución de la permanencia en 8 de los individuos. Por último, en la zona *close*, el 90 % de los individuos aumentaron su permanencia. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la permanencia de los individuos en las tres zonas, de forma más notable en la zona *close*.

Sin embargo, los resultados en el análisis pareado del grupo EE fueron distintos. No se encontraron diferencias significativas ($p = 0.10$) en la zona *far* (**Figura 10D**) potencialmente debido al enriquecimiento ambiental. Se encontraron diferencias significativas entre la permanencia de los individuos las zonas *med* y *close* (**Figuras 10E y 10F**). 8 de los 10 peces redujeron la permanencia en la zona *med* y, por el contrario, 8 de cada 10 peces aumentaron su permanencia en la zona *close*.

- **Latencia en zona *far***

La latencia hacia la zona *far* en el análisis intragrupal se encuentra representada en la **Figura 11**. En el caso del grupo CTRL la mitad de las hembras no volvieron a ser detectadas en la zona una vez se les aplicó el protocolo de UCS y tres de ellas tardaron más tiempo en alcanzarla. Por otro lado, en el grupo EE, sólo tres de las hembras no volvieron a alcanzar la zona *far* y seis de ellas tardaron incluso menos tiempo en alcanzarla tras el UCS.

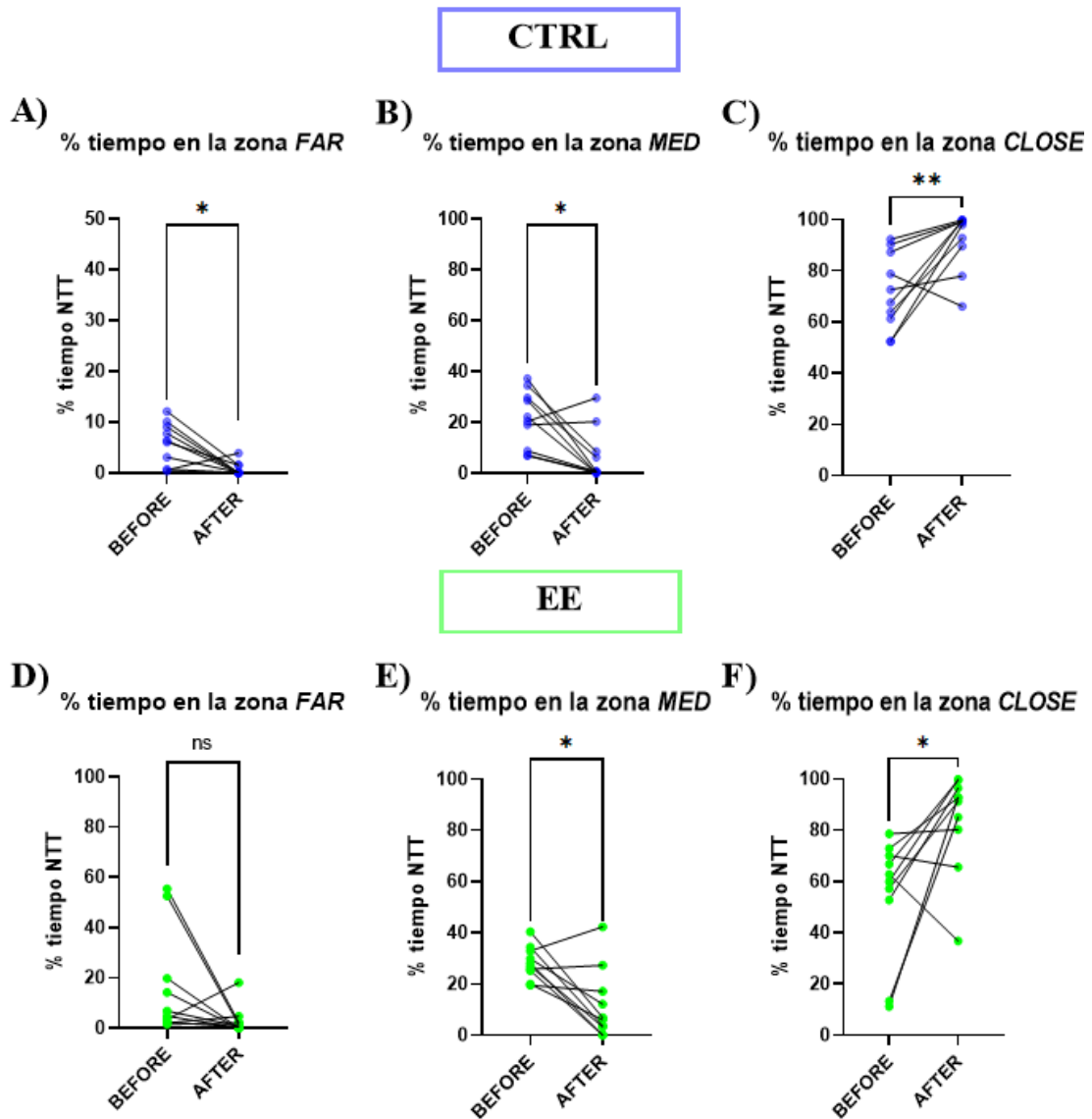


Figura 10. Porcentajes de permanencia del grupo control (CTRL) en (A) la zona *far*, (B) *med* y (C) *close* y del grupo con ambiente enriquecido (EE) en (D) la zona *far*, (E) *med* y (F) *close*. ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.)

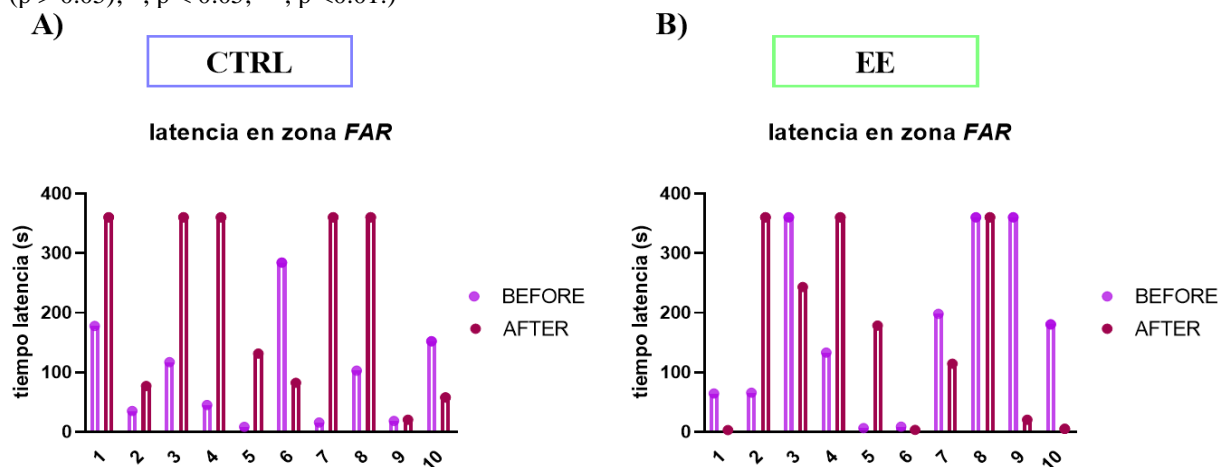


Figura 11. Tiempo de latencia de los peces del grupo (A) control (CTRL) y del grupo (B) con ambiente enriquecido (EE) hasta alcanzar la zona *far*, antes (*before*) y después (*after*) de realizar el protocolo de estrés crónico impredecible

5. DISCUSIÓN

El estrés es un factor que desencadena determinados cambios conductuales en los animales y afecta a su bienestar. Los efectos negativos del estrés pueden producir grandes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura. La domesticación de especies implica sacar los animales de su hábitat natural y cerrar su ciclo vital en cautividad, y este proceso, al menos en sus primeras etapas, implica necesariamente someter a los animales a condiciones de estrés. La aparición de enfermedades que impliquen la pérdida de ejemplares, o la aparición de problemas reproductivos que eviten cerrar su ciclo vital en cautividad, son sólo algunos de los problemas derivados del estrés a los que la industria de la acuicultura tiene que hacer frente (Tort, 2011; García Valcarce *et al.*, 2023). Teniendo en cuenta que hay fuentes de estrés inevitables, la búsqueda de estrategias que puedan frenar o atenuar los efectos adversos de la exposición a estresores es especialmente relevante. Una de estas estrategias puede ser el enriquecimiento ambiental.

En este estudio se ha escogido la especie modelo del pez cebra para estudiar el efecto del enriquecimiento ambiental sobre los efectos negativos del estrés. Aunque existen numerosos estudios que relacionan los efectos del estrés en la conducta de los peces (Buenhombre *et al.*, 2021), la mayoría de ellos no incluyen el enriquecimiento ambiental como un elemento clave que puede influir en la respuesta frente al estrés. Además, la gran mayoría de las veces sólo se analizan parámetros bioquímicos como son el aumento del nivel de cortisol o la presencia de especies reactivas de oxígeno, donde, en algunas ocasiones, se emplean técnicas invasivas o requieren el sacrificio del animal para obtener las muestras necesarias (Sadoul y Geffroy, 2019).

Es por todo ello que, para llevar a cabo este trabajo, se ha empleado un protocolo de estrés crónico impredecible y una prueba de comportamiento específica (NTT). El NTT proporciona información sobre el comportamiento natural del pez cebra cuando se sumerge en el fondo de un entorno desconocido, el cual se sabe que, según se va adaptando a dicho entorno, comienza a explorar de forma gradual la parte superior del tanque. De esta forma se puede definir la ansiedad según el tiempo que pasa el animal en la parte inferior del tanque (a mayor tiempo, mayor nivel de ansiedad) y la parte superior (a mayor tiempo, menor nivel de ansiedad) (Fontana *et al.*, 2022).

El protocolo de UCS y el NTT se emplearon para observar el impacto del estrés en parámetros cinéticos y de comportamiento en peces cebra y determinar si el grupo experimental

(EE), mantenido en un entorno enriquecido durante 90 días, presentó menos alteraciones en su conducta que el grupo control (CTRL).

Una vez comparados ambos grupos, CTRL y EE, no se observaron variaciones significativas en los parámetros cinéticos. La velocidad y la distancia de ambos fueron semejantes antes y después del UCS (**Figura 5**). Esto indica que, en el presente estudio, el protocolo de estrés empleado y la estrategia de enriquecimiento ambiental usada no han alterado los parámetros cinéticos estudiados en los peces. El marcaje individual (etiquetas VIE) de los ejemplares, permitió estudiar la conducta de cada individuo en cada uno de los dos grupos estudiados (control y experimental). Siguiendo con la misma tendencia observada anteriormente, los parámetros cinéticos no se vieron significativamente modificados (**Figura 9**).

Estos resultados sobre los parámetros cinéticos concuerdan con los que obtuvieron Marcon y colaboradores (Marcon *et al.*, 2018), los cuales analizaron la influencia del estrés y el enriquecimiento ambiental en el comportamiento y parámetros bioquímicos del pez cebra. Para ello, este grupo de investigación empleó una misma proporción de machos y hembras (96 en total) de seis meses de edad. Los peces fueron divididos inicialmente en tres grupos: un grupo mantenido en condiciones estándar y dos grupos expuestos a enriquecimiento ambiental, diferenciándose en el periodo de exposición (21 o 28 días). Las condiciones de enriquecimiento eran similares a las de este trabajo, aunque se incluyó una estructura adicional en forma de ruina. Posteriormente, se realizó el mismo protocolo de estrés crónico que se ha empleado en el presente trabajo. Cada grupo de peces se volvió a dividir en dos subgrupos: uno al que se le aplicó el protocolo de UCS y otro al que no, para ser comparados finalmente mediante la prueba del NTT. Los resultados que se obtuvieron respecto a la distancia recorrida demostraron que ni el protocolo de UCS ni el enriquecimiento ambiental influyeron sobre este parámetro.

Además de la velocidad y la distancia recorrida, la permanencia en una zona concreta del tanque permite determinar los niveles de ansiedad de los peces (Fontana *et al.*, 2022). En cuanto a la preferencia por la zona, ambos grupos (control y experimental) permanecieron principalmente en la zona *close* o “segura” para ellos, la zona cercana al fondo, cuando fueron transferidos al ambiente nuevo del NTT.

Centrándonos en la zona *far* y considerando los dos grupos analizados, el conjunto de todos los individuos del grupo CTRL y EE consiguieron alcanzarla durante el transcurso del NTT, antes de aplicar el UCS, como se muestra en la **Figura 8B**; una vez realizado el protocolo

de estrés, se pudo observar una disminución del alcance en número en el grupo CTRL, que se redujo a la mitad en comparación con el valor previo a la inducción del estrés. Por otro lado, en el grupo EE, se registró una reducción, en menor medida, de un tercio de los individuos que no lograron alcanzar la zona durante el NTT (**Figura 8D**).

El tiempo de permanencia en la zona *far* se vio reducido de manera similar en ambos grupos tras la inducción del estrés. Este hecho puede explicarse considerando que la presencia de los peces cerca de la superficie se asocia a bajos niveles de ansiedad. Para proporcionar datos más precisos, se estudió la presencia de los animales en esta zona en cada minuto del NTT (**Figura 7**); se observó que la permanencia en la zona *far* del grupo EE tendía a ser superior en todo momento a la del grupo CTRL (antes y después del UCS), pudiendo ser este un indicio del posible efecto beneficioso del enriquecimiento ambiental.

El mismo estudio de Marcon y colaboradores referido anteriormente (Marcon *et al.*, 2018), analizó también la preferencia por las zonas del tanque entre los subgrupos estresados y no estresados de la condición control y con enriquecimiento. Se determinó un aumento significativo de permanencia en la zona inferior (*close*) por parte de los peces estresados del grupo control frente a los no estresados. Además, estos peces también presentaron una disminución en el tiempo y número de entradas a la zona superior (*far*) del tanque. En el análisis del grupo enriquecido, no se detectaron diferencias entre el subgrupo estresado y el no estresado en ninguno de los dos parámetros (permanencia en la zona *close* y *far*). Estos resultados indican que el enriquecimiento ambiental influye sobre los patrones de comportamiento de los peces cebra sometidos a estrés, mitigando conductas que se asocian con la ansiedad como son permanecer más tiempo en la zona cercana al fondo y evitar la exploración en la zona superior del tanque.

La disminución de la ansiedad a causa del enriquecimiento ambiental se ha determinado también midiendo los niveles de cortisol en peces cebra adultos. Tras una persecución con red como desencadenante de estrés, se observó que los peces criados en un ambiente enriquecido tenían una respuesta atenuada del cortisol, muy similar a la que se produce al emplear fármacos ansiolíticos/antidepresivos (Giacomini *et al.*, 2016).

El análisis individual dentro de cada grupo (intragrupal) demuestra que el UCS sí tuvo efecto en la permanencia en cada zona (**Figura 10**). En los individuos del grupo CTRL, el estrés provocado, ocasionó un notable aumento de presencia en la zona *close*; de forma similar, en los peces del grupo EE, también hubo un aumento en la permanencia en esa sección del tanque.

La preferencia por la zona *far* es uno de los puntos clave en este estudio para determinar los posibles efectos beneficiosos del enriquecimiento ambiental frente al estrés, ya que como se ha mencionado anteriormente, la presencia o permanencia en esta zona se relaciona con menores niveles de ansiedad y el desarrollo de una conducta exploratoria. El comportamiento exploratorio en los animales permite la adquisición de información sobre el entorno, lo cual es esencial para la supervivencia. Permanecer en un ambiente enriquecido puede favorecer la exploración en peces, como se ha demostrado en el caso del pez mahseer (*Tor putitora*), donde el enriquecimiento ambiental mejoró las respuestas exploratorias. Estos peces mostraron una mayor propensión a abandonar la zona segura para alcanzar una zona de vegetación presente en el tanque (Ullah *et al.*, 2017).

Cuando realizamos el análisis intragrupal, observamos que, 9 de los 10 peces pertenecientes al grupo control redujeron su permanencia en la zona superior del tanque hasta porcentajes que rondaban el 0.7 %, confirmando el impacto del estrés inducido sobre su comportamiento (**Figura 10A**). Sin embargo, en los datos que se obtuvieron de los peces del grupo EE se observó que, aunque hubo una disminución de permanencia en la región *far* a causa del estrés, los datos registrados previa y posteriormente a la aplicación de los estresores no difieren significativamente (**Figura 10D**).

Al analizar la latencia de cada individuo en la zona distante del tanque antes y después de la aplicación de los estresores, se observó que, después de aplicar el protocolo de UCS, algunos ejemplares del grupo EE (en concreto seis de ellos) lograron alcanzar esta zona en menos tiempo en comparación con el tiempo registrado antes del UCS (**Figura 11B**). La tendencia de los individuos analizados en el grupo CTRL es de un incremento en el tiempo que tardan en alcanzar la zona *far* una vez estresados (**Figura 11A**). Basándonos en estos datos, una de las posibles razones de la reducción en el tiempo de alcance de la zona *far* por parte de ejemplares del grupo EE, es que el enriquecimiento pueda desempeñar un papel importante en la recuperación del animal tras ser sometido a situaciones de estrés.

La influencia del ambiente enriquecido en la recuperación de los peces tras la exposición a un estresor se ha comprobado en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Pounder *et al.*, 2016). En dicha investigación, las truchas se mantuvieron en condiciones de enriquecimiento y control durante un periodo de tres semanas y, como elemento estresor, se empleó la extracción del pez fuera del agua durante un minuto. Se evaluaron la frecuencia de latido opercular, niveles de cortisol y el tiempo de inmovilidad en el tanque. En el grupo enriquecido, los niveles de

cortisol variaron menos y las tasas de recuperación en cuanto al latido opercular fueron más rápidas. Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan la idea de que el enriquecimiento ambiental puede promover una recuperación más rápida tras la exposición a factores de estrés.

Un entorno enriquecido como el que se ha establecido en este trabajo, con plantas, arena o piedras, proporciona elementos que pueden servir como refugio para los animales, brindándoles una sensación de seguridad. Sin embargo, un ambiente que no presenta enriquecimiento puede conllevar a que los peces permanezcan en un estado de alerta más continuado y, por lo tanto, tengan una mayor susceptibilidad al estrés (Giacomini *et al.*, 2016). Por ejemplo, en el salmón común o salmón del Atlántico (*Salmo salar*), se ha observado una notable disparidad en los niveles basales de cortisol, siendo mucho más elevados en aquellos individuos que no habían sido criados en un ambiente enriquecido (Näslund *et al.*, 2013).

En muchos estudios se ha señalado el impacto positivo del enriquecimiento ambiental en el crecimiento, la reducción de agresividad territorial, la supervivencia o la respuesta al estrés, la cual se ha abordado en este estudio. No obstante, es crucial tener en cuenta factores como la especie animal, sexo o edad de los individuos para adecuar dicho enriquecimiento a sus necesidades biológicas, evitando así generar posibles efectos negativos en los animales (Näslund y Johnsson, 2016).

En este trabajo, el enriquecimiento ambiental no ha mejorado los parámetros cinéticos estudiados tras la exposición a un estrés crónico impredecible, no obstante, el estudio de preferencia de zonas apunta hacia un posible efecto beneficioso de este enriquecimiento ambiental, y por ello, cabe la posibilidad de considerarlo como una posible estrategia para mejorar el bienestar y adaptación de los animales en criados en cautividad.

6. CONCLUSIONES

1. El estrés y el enriquecimiento ambiental no afectan a parámetros cinéticos como la distancia recorrida y velocidad en los peces cebrá.
2. El estrés inducido afectó la distribución de los peces en las distintas zonas del tanque, aumentando la permanencia en la zona cercana o *close*, considerada como una zona segura o de confort para ellos.
3. Todos los peces lograron alcanzar la zona más alejada del tanque durante el transcurso de las pruebas de comportamiento antes del protocolo de estrés, a pesar de la preferencia por la zona cercana al fondo del tanque.

4. El enriquecimiento ambiental influyó en la respuesta al estrés, favoreciendo una conducta más exploratoria por parte de los peces mantenidos en condiciones de enriquecimiento, los cuales alcanzaron y permanecieron tiempos similares en la zona alta del tanque durante el NTT, antes y después de la inducción del estrés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arechavala-Lopez, P., Cabrera-Álvarez, M. J., Maia, C. M. y Saraiva, J. L. (2022) "Environmental enrichment in fish aquaculture: A review of fundamental and practical aspects", *Reviews in Aquaculture*, 14 (2), pp. 704-728. <https://doi.org/10.1111/raq.12620>.
- Bayrami, A., Allaf Noverian, H. y Asadi Sharif, E. (2016) "Effects of background colour on growth indices and stress of young sterlet (*Acipenser ruthenus*) in a closed circulated system". *Aquaculture research*, 48(5), pp. 2004-2011. <https://doi.org/10.1111/are.13033>.
- BioRender.com (2023) BioRender. Disponible en <https://app.biorender.com> (Accedido: 11 de junio de 2023).
- Bowley, G., Kugler, E., Wilkinson, R., Lawrie, A., van Eeden, F., A Chico, T. J., Evans, P. C., Noël, E. S., Serbanovic-Canic, J. (2022) "Zebrafish as a tractable model of human cardiovascular disease", *British Journal of Pharmacology*, 179(5) pp. 900-917. doi: 10.1111/bph.15473.
- Bozkurt, Y. (ed.) (2020) *Zebrafish in Biomedical Research*. London: IntechOpen.
- Buenhombre, J., Daza-Cardona, E. A., Sousa, P. y Gouveia, A. (2021) "Different influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: A systematic review", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, pp. 765-791. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.09.047.
- Canva.com (2023) Canva. Disponible en <https://www.canva.com/> (Accedido: 13 de junio de 2023).
- D'Amora, M., Schmidt, T. J. N., Konstantinidou, S., Raffa, V., de Angelis, F. y Tantussi, F. (2022) "Effects of Metal Oxide Nanoparticles in Zebrafish", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022:3313016. <https://doi.org/10.1155/2022/3313016>.
- Demin, K. A., Taranov, A. S., Ilyin, N. P., Lakstygala, A. M., Volgin, A. D., de Abreu, M. S., Strelakova, T. y Kalueff, A. V. (2020) "Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish", *The International Journal on the Biology of Stress*, 24(1), pp. 1-18. doi: 10.1080/10253890.2020.1724948.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R. *et al.* (2009) "Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish", *Behavioural brain research*. 205(1), pp. 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>.
- España (2013) "Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia", *Boletín Oficial del Estado*, 8 de febrero de 2013, (34), pp. 11370-11421.
- España (2018) "Real Decreto 1386/2018, de 19 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia", *Boletín Oficial del Estado*, 20 de noviembre de 2018, (280), pp. 112804-112806.
- España (2021) "Real Decreto 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia", *Boletín Oficial del Estado*, 24 de febrero de 2021, (47), pp. 22616-22618.
- España (2023) "Ley 7/2023, de 28 de marzo, de protección de los derechos y el bienestar de los animales", *Boletín Oficial del Estado*, 29 de marzo de 2023, (75), pp. 45618-45671.
- Fontana, B. D., Alnassar, N. y Parker, M. O. (2022) "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.

- García Valcarce, D., Fernández Riesco, M., Cuesta-Martín, L., Esteve-Codina, A., Martínez-Vázquez, J. M. y Robles, V. (2023) "Stress decreases spermatozoa quality and induces molecular alterations in zebrafish progeny", *BMC biology*, 21(1), 70. doi:10.1186/S12915-023-01570-W.
- Giacomini, A. C., Abreu, M. S., Zanandrea, R., Saibt, N., Friedrich, M. T., Koakoski, G., Gusso, D., Piato, A. L. y Barcellos, L. (2016) "Environmental and Pharmacological Manipulations Blunt the Stress Response of Zebrafish in a Similar Manner", *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1-6. doi:10.1038/srep28986.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, 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.
- Hsu, A. Y., Wang, T., Syahirah, R., Liu, S., Li, K., Zhang, W., Wang, J., Cao, Z., Tian, S., Matosevic, S., Staiger, C. J., Wan, J. y Deng, Q. (2022) "Rora Regulates Neutrophil Migration and Activation in Zebrafish", *Frontiers in Immunology*, 13:756034. doi: 10.3389/fimmu.2022.756034.
- Joshi, S. (2022) "Zebrafish Model for Drug Discovery and Screening", en Bhandari, P.R., Bharani, K.K., Khurana, A. (eds) *Zebrafish Model for Biomedical Research*. Singapur: Springer, pp. 229-258.
- Kaliya-Perumal, A. K. y Ingham, P. W. (2022) "Musculoskeletal regeneration: A zebrafish perspective", *Biochimie*, 96, pp. 171-181. doi: 10.1016/j.biochi.2021.10.014.
- Kwiatkowska, I., Hermanowicz, J. M., Iwinska, Z., Kowalczyk, K., Iwanowska, J. y Pawlak, D. (2022) "Zebrafish- An Optimal Model in Experimental Oncology", *Molecules*, 27 (13), 4223. doi: 10.3390/molecules27134223.
- Liew, A. K. Y., Teo, C. H. y Soga, T. (2022) "The Molecular Effects of Environmental Enrichment on Alzheimer's Disease", *Molecular Neurobiology*, 59(12), pp. 7095-7118. doi: 10.1007/s12035-022-03016-w.
- Llave Propín, A. de la (2022) *Efecto de corrientes de agua, como elemento de enriquecimiento ambiental, sobre la calidad de la carne en trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)*. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Madrid.
- Marcon, M., Mocelin, R., Benvenuti, R., Costa, T., Herrmann, A. P., de Oliveira, D. L., Koakoski, G., Barcellos, L. J. G. y Piato, A. (2018) "Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish", *Journal of Experimental Biology*, 221(4). doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.176735>.
- Márquez-Arias, A., Santillán-Doherty, A. M., Arenas-Rosas, R. V., Gasca-Matías, M. P., Muñoz-Delgado, J. y Villanueva-Valle, J. (2014) "Efecto del enriquecimiento ambiental en un grupo de monos araña (*Ateles geoffroyi*) en cautiverio", *Salud Mental*, 37(5), pp. 437-442.
- Näslund, J., Rosengren, M., Del Villar, D., Gansel, L., Norrgård, J. R., Persson, L., Winkowski, J. J. y Kvingedal, E. (2013) "Hatchery tank enrichment affects cortisol levels and shelter-seeking in Atlantic salmon (*Salmo salar*)", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(4), pp. 585-590. doi:10.1139/CJFAS-2012-0302.
- Näslund, J. y Johnsson, J. I. (2016) "Environmental enrichment for fish in captive environments: Effects of physical structures and substrates", *Fish and Fisheries*, 17(1), pp. 1-30. doi:10.1111/FAF.12088.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2020) *Taxonomy browser (Danio rerio)*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=7955> (Accedido: 25 de enero de 2023).
- Noldus (2001) *EthoVision XT (Versión 16) [Programa de ordenador]*. Wageningen: Noldus.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2022) *Bienestar Animal*. Disponible en: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/bienestar-animal/> (Accedido: 23 de enero de 2023).
- Parichy, D. M. (2015) "Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution", *eLife*, 4:e05635. doi:10.7554/ELIFE.05635.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea (2010) "Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos", *Diario oficial de la Unión Europea, Serie L, 22 de septiembre de 2010, (276)*, pp. 33-79.

- Pounder, K. C., Mitchell, J. L., Thomson, J. S., Pottinger, T. G., Buckley, J. y Sneddon, L. U. (2016) "Does environmental enrichment promote recovery from stress in rainbow trout?", *Applied Animal Behaviour Science*, 176, pp. 136-142. doi:10.1016/J.APPLANIM.2016.01.009.
- Robayo Noguera, L.C. (2021) *Efectos del estrés crónico en los comportamientos de dominancia y subordinación y en el metaboloma del pez cebra (Danio rerio)*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de los Andes.
- Rubio Limonta, M. y Silveira Coffigny, R. (2009) "Bienestar de los animales acuáticos, con fines de control sanitario", *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 10 (8), pp. 1-12.
- Sadoul, B. y Geffroy, B. (2019) "Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes", *Journal of Fish Biology*, 94(4), pp. 540-555. doi:10.1111/JFB.13904.
- 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.
- Tort, L. (2011) "Stress and immune modulation in fish", *Developmental & Comparative Immunology*, 35 (12), pp. 1366-1375. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.002.
- Ullah, I., Zuberi, A., Khan, K. U., Ahmad, S., Thörnqvist, P. O. y Winberg, S. (2017) "Effects of enrichment on the development of behaviour in an endangered fish mahseer (*Tor putitora*)", *Applied Animal Behaviour Science*, 186, pp. 93-100. doi:10.1016/J.APPLANIM.2016.10.016.
- Zabegalov, K. N., Wang, D., Yang, L. E., Wang, J. *et al.* (2021) "Decoding the role of zebrafish neuroglia in CNS disease modeling", *Brain Research Bulletin*, 166, pp. 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.020>.
- Zhang, Z., Fu, Y., Zhang, X. y Chen, S. (2021) "A Comparative Study on Two Territorial Fishes: The Influence of Physical Enrichment on Aggressive Behavior", *Animals*, 11(7), 1868. <https://doi.org/10.3390/ani11071868>.