



**UNIVERSIDAD FEDERAL DEL PARÁ  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE POSGRADO EN NEUROCIENCIA Y BIOLOGÍA CELULAR**

**JHON JAIRO BUENHOMBRE VASQUÉZ**

**PEZ-CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO DE BIENESTAR ANIMAL**

**BELÉM- PA  
2022**

JHON JAIRO BUENHOMBRE VASQUEZ

PEZ-CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO DE BIENESTAR ANIMAL

Documento presentado como requisito parcial para la obtención de título de Doctor por el programa de Posgrado en Neurociencia y Biología celular, de la Universidad Federal del Pará.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

**BELÉM- PA**  
**2022**

JHON JAIRO BUENHOMBRE VASQUEZ

PEZ-CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO DE BIENESTAR ANIMAL

Documento presentado como requisito parcial para la obtención de título de Doctor por el programa de Posgrado en Neurociencia y Biología celular, de la Universidad Federal del Pará.

Aprobada el: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr. (Orientador)  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. André Luiz Vilarde Walsh-Monteiro  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

---

Prof. Dr. Andre Guimaraes Maciel e Silva  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Bruno Rodrigues Dos Santos  
Universidade Federal do Pará

---

Profa. Dra. Astrid Rivera Rivera  
Universidad Antonio Nariño

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

B928p Buenhombre Vasquez, Jhon Jairo.  
PEZ-CEBRA (Danio rerio) COMO MODELO DE  
BIENESTAR ANIMAL / Jhon Jairo Buenhombre Vasquez. —  
2022.  
220 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2022.

1. Paulistinha. 2. Bem-estar animal. 3. Viés cognitivo. 4.  
Enriquecimento Ambiental. 5. Personalidade. I. Título.

CDD 370.153

---

Dedico este trabajo a Dios, a mis Padres, a mi Hermana, a mi Novia, a mi Sobrina y a mis amados Animales.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi orientador Dr. Amauri Gouveia Junior, por las grandes enseñanzas, las gratificantes conversaciones, el empeño, las sugerencias y la enorme paciencia que tuvo durante mi orientación. Fue muy grato tenerlo como orientador de este trabajo.

A Erika Daza por su apoyo incondicional, su enorme cariño y la inconmensurable colaboración prestada. Sin ella y la ayuda de Dios y mis padres no habría logrado desarrollar este trabajo.

A los profesores Dr. Bruno Duarte Gomes y Carlomagno Pacheco Bahia por las conversaciones y el apoyo brindado en los laboratorios para la realización de este proyecto.

A los profesores Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, Dr. André Luiz Vilard Walsh-Monteiro y Dr. Anderson Herculano Oliveira da Silva por las importantes contribuciones en el momento de la calificación de este trabajo.

A la Universidad Federal del Pará, Centro de Teoría e Investigación del Comportamiento, por compartir sus laboratorios para el desarrollo de este proyecto.

A los colegas de Doctorado y laboratorio Gabriel, Pêssi, Gloria, Luis, Erica, Bruno, Rodrigo y Héctor, por el compañerismo y colaboración prestada.

En fin, dedico este trabajo a todos los familiares y amigos que estuvieron involucrados directa o indirectamente en este trabajo y les doy mis más sinceros agradecimientos.

## RESUMEN

**BUENHOMBRE, V.J.J. Pez-cebra (*danio rerio*) como modelo como modelo de bienestar animal.** 2020, p. 195 Tesis (Doctorado) - Universidad Federal del Pará, ICB. Belém, 2022.

El pez cebra se ha convertido en un modelo importante para varias disciplinas como la neurociencia y el testeo de nuevas moléculas farmacológicas. Por ende, la forma como este es alojado y las consecuencias del alojamiento sobre su bienestar representan aspectos importantes a estudiar.

Son muy pocos los estudios que han evaluado el efecto del enriquecimiento ambiental sobre el bienestar del pez cebra y los impactos negativos o positivos del mismo están aún por ser dilucidados. Un reto importante es establecer las consecuencias no solo de la presencia del enriquecimiento sino también de la pérdida de este. Igualmente, la forma de presentación de un estímulo bien sea de forma predecible o impredecible influencia las respuestas fisiológicas y conductuales del animal. Por ende, la forma de presentación del enriquecimiento representa otro aspecto importante a valorar.

La evaluación de los estados emocionales (afectivos) es crucial para el estudio del bienestar del pez cebra, en particular para evaluar las influencias del entorno sobre el animal. Sin embargo, evaluar directamente estos estados es difícil debido a su naturaleza subjetiva. Por ende, el enfoque actual se centra en estimarlos a partir de los componentes fisiológicos y conductuales resultantes. Hoy en día existen pruebas estandarizadas robustas que evalúan y correlacionan las respuestas neuroendocrinas con criterios bien establecidos de valoración conductual de estrés y ansiedad en pez cebra. No obstante, no existen pruebas similares para medir los estados emocionales positivos en esta especie. Una métrica alternativa para evaluar el estado afectivo tanto positivo como negativo de los animales son las pruebas de sesgo cognitivo. Estas pruebas permiten a los investigadores inferir el estado emocional de un individuo a partir de la cognición.

Por ende, la evaluación de contrastes de alojamiento aparentemente negativos (Condiciones impredecibles y ausencia o pérdida de enriquecimiento) y positivos (Condiciones predecibles y presencia o ganancia de enriquecimiento) a través de un tipo de sesgo cognitivo (el sesgo de juicio cognitivo (SJC) en pez cebra puede constituir un modelo prometedor para entender los efectos del alojamiento sobre los estados afectivos y el bienestar de este pez. Adicionalmente se ha evidenciado que las variaciones individuales como la personalidad influyen el sistema

nervioso central, el comportamiento y los resultados del sesgo de juicio cognitivo en otras especies. Estas diferencias y sus impactos en el pez cebra aún no han sido estudiadas.

En consecuencia, el objetivo general de esta tesis fue establecer si el SJC puede ser utilizado en pez cebra para la evaluación de estados emocionales positivos y negativos producidos por modificaciones ambientales y su relación con la personalidad.

**Palabras clave: pez cebra, bienestar animal, sesgo de juicio cognitivo, estados emocionales, claro oscuro, cognición.**

## ABSTRACT

Zebrafish has become an important model for various disciplines such as neuroscience and the testing of new pharmacological molecules. Therefore, the way in which it is housed and the consequences of its accommodation on its well-being represent an important aspect to study.

Very few studies have evaluated the effect of environmental enrichment on the welfare of zebrafish and its negative or positive impacts have yet to be elucidated. An important challenge is to establish the consequences not only of the presence of enrichment but also of its loss. Likewise, the form of presentation of a stimulus, either predictably or unpredictably, influences the physiological and behavioural responses of the animal. Therefore, the form of presentation of the enrichment represents another important aspect to assess.

The evaluation of emotional (affective) states is crucial for the study of zebrafish welfare, in particular to evaluate the influences of the environment on the animal. However, directly assessing these states is difficult due to their subjective nature. Therefore, the current approach focuses on estimating them from the resulting physiological and behavioral components. Today there are robust standardized tests that assess and correlate neuroendocrine responses with well-established behavioural assessment criteria for stress and anxiety in zebrafish. However, there are no similar tests to measure positive emotional states in this species. An alternative metric to assess both the positive and negative affective states of animals is the cognitive bias. These tests allow researchers to infer an individual's emotional state from cognition.

Therefore, the evaluation of apparently negative (Unpredictable conditions and absence or loss of enrichment) and positive ones (Predictable conditions and presence or gain of enrichment) accommodation contrasts through a type of cognitive bias (cognitive judgment bias (CJB) in zebrafish may constitute a promising model to understand the effects of housing on affective states and well-being in this fish. Additionally, it has been shown that individual variations such as personality influence the central nervous system, behaviour and cognitive judgment bias results in other species. These differences and their impacts on zebrafish have not yet been studied.

Consequently, the general objective of this thesis was to establish if the cognitive judgment bias can be used in zebrafish for the evaluation of positive and negative emotional states produced by environmental modifications and its relationship with personality.

**Key words: zebrafish, animal welfare, cognitive bias, emotion, behaviour, cognition.**

## LISTA DE FIGURAS

### Artículo 2

- Figura 1 - Diagrama de flujo PRISMA..... 84
- Figura 2 - Cronograma del estudio que describe la secuencia de procedimientos utilizados durante el experimento 2 y su duración.....102
- Figura 3 - Diagrama del diseño experimental que muestra la secuencia de procedimientos y pruebas utilizadas durante el experimento 2..... 107
- Figura 4 - Respuestas de memoria de los peces a señales ambiguas y originales no reforzadas cuatro días después de la última sesión de entrenamiento (experimento 1) ..... 110
- Figura 5 - Efecto del EE en el aprendizaje..... 112
- Figura 6 - Efecto de la manipulación ambiental (cambio de las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces) en la prueba de sesgo de juicio cognitivo..... 114
- Figura 7 - Efecto de la manipulación ambiental (cambio de las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces) en la prueba de claro/oscurο.....115
- Figura 8 - Efecto de la manipulación ambiental (cambio de las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces) en la prueba de actividad durante la etapa en agua dulce.....116

### Artículo 3

- Figura 9 - Imagen ilustrativa del Acuario de campo abierto que muestra la dimensión de la cuadrícula para el análisis de locomoción.....146
- Figura 10 - Imagen ilustrativa de la prueba de inspección de depredador, cardumen y prueba de espejo.....148
- Figura 11 - Dendograma del análisis de clúster para la categorización de los peces en dos fenotipos comportamentales.....154
- Figura 12 - Sesiones de aprendizaje fenotipo tímido-reactivo.....155
- Figura 13 - Sesgo de juicio cognitivo fenotipo tímido-reactivo.....156
- Figura 14 - Prueba de claro/oscurο fenotipo tímido-reactivo.....157
- Figura 15 - Sesiones de aprendizaje en los dos fenotipos.....158
- Figura 16 - Prueba de claro/oscurο en los dos fenotipos.....159

## LISTA DE TABLAS

### Artículo 1

Tabla 1 - Características del estudio y resultados de las manipulaciones para modelar la ansiedad.....	85
Tabla 2 - Características de los estudios y resultados de las manipulaciones para desarrollar resiliencia al estrés en edad adulta.....	86
Tabla 3 - Características de los estudios y resultados de las manipulaciones que evaluaron el enriquecimiento ambiental frente a una condición estándar.....	87
Tabla 4 - Características del estudio y resultados de las manipulaciones que evaluaron condiciones estresantes de bajo nivel en el alojamiento y crianza.....	91
Tabla 5 - Influencias de la personalidad en el estrés y la calidad de vida.....	92
Tabla 6 - Influencias del genotipo sobre el estrés y la calidad de vida.....	94
Tabla 7 - Evaluación del riesgo de sesgo.....	95

### Artículo 3

Tabla 8 - Etograma de los comportamientos analizados en cada prueba, con el nombre utilizado en el texto y su descripción.....	145
--	-----

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo A - Aceptación de la revista: Revisiones de Neurociencia y Bioconducta.....	213
Anexo B - Sometimiento a la revista Cognición Animal.....	214
Anexo C - Parecer del comité de ética para la investigación.....	215
Anexo D - Datos suplementarios.....	216

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -hsd	11 $\beta$ deshidrogenasa de hidroxisteroide
5-HIAA	Ácido 5-hidroindolacético
AE	Alojamiento estándar
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
cart4	Transcriptor 4 de regulación para cocaína y anfetamina
cm	Centímetros
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
cnr1	Receptor cannabinoide 1
CONCEA	Consejo Nacional de Control de la Experimentación Animal
crf	Factor liberador de corticotropina
crf-bp	proteína de unión a crf
DOPAC	Ácido 3,4 dihidroxifenilacético
DOR	Receptor delta-opioide
EA	Enriquecimiento ambiental
ECI	Estrés crónico impredecible
ECMI	Estrés Crónico Medio Impredecible
EI	Evitación inhibitoria
G	Verde
R	Rojo
h	Horas
HPA	Hipotalámico hipofisario adrenal
HPI	Hipotalámico-hipófisis-ínter-renal
htr1ab	Receptor de serotonina 1ab
IL	Interleuquinas
INF $\gamma$	Interferón gamma
L	Litro
LA	Locomoción acumulada
M	Media
MA	Manipulaciones ambientales
mm	Milímetros
mr	Mineralocorticoides

NTPC	Núcleo de teoría e investigación en comportamiento
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
pCREB	Elemento de unión a proteína de respuesta AMP
PHB2	Prohibitina
pomc	Propiomelanocortina
ppp3r1a	Subunidad B de calcineurina tipo 1
prl	Prolactina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Segundos
SAM	Simpático adreno-medular
SD	Desviación estándar
SJC	Sesgo de juicio cognitivo
SLC25A5	ADP/ATP translocasa 2
SNBC	Pristinamicina I sintetasa 2
spd	Speigeldanio
SYRCLE	Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation
TC	Tiempo de congelación
TL	Tupfel cola larga
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TU	Tuebingen
WT	Tipo salvaje
VDAC3	Proteína 3 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje
WIK	Wild Indian Karyotype

## LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
®	Marca Registrada
±	Mas o menos
>	Mayor
%	Porcentaje
<	Menor

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS DE LA TESIS</b> .....	22
<b>2.1 Objetivo General</b> .....	22
<b>2.2 Revisión sistemática</b> .....	22
<b>2.3 Experimento 1</b> .....	22
<b>2.4 Experimento 2</b> .....	22
<b>2.5 Experimento 3</b> .....	22
<b>2.6 Experimento 4</b> .....	22
<b>3. ARTÍCULOS</b> .....	23
<b>3.1 Artículo I:</b> Diferentes influencias de los modelos de ansiedad, del enriquecimiento ambiental, de las condiciones estándar de alojamiento y de la variación individual (sexo, personalidad y línea genética) sobre el estrés y la calidad de vida en peces cebra adultos y juveniles: una revisión sistemática.....	23
<b>3.2 Artículo II:</b> El enriquecimiento ambiental y sus diferentes niveles influyen en los estados afectivos y la cognición del pez cebra.....	97
<b>3.4 Artículo III:</b> Influencias del enriquecimiento ambiental estructural y la personalidad sobre el sesgo de juicio cognitivo y los comportamientos tipo ansiedad del pez cebra adulto.....	139
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	183
<b>5. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	189
<b>LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b> .....	191
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES</b> .....	193
<b>ANEXOS</b> .....	212

## **NOTA EXPLICATIVA Y RACIONAL DE LOS EXPERIMENTOS DE LA TESIS.**

Esta tesis fue estructurada a partir de la realización de 4 experimentos y la elaboración de 3 artículos científicos.

El primer experimento se realizó para evaluar la personalidad animal en los peces cebra y extraer las dimensiones de personalidad (Osadía y Timidez) para los peces que se usarían en el tercer y cuarto experimento.

El segundo experimento fue una prueba de memoria, este experimento emulaba las condiciones del SCJ y fue realizado para corroborar dos suposiciones prácticas antes de llevar a cabo el SCJ en el tercer y cuarto experimento. Primero necesitábamos verificar que los peces podían llevar a cabo la siguiente tarea: permanecer en un área verde para obtener un resultado positivo (comida) y evitar un área roja para evadir un resultado aparentemente negativo (sin comida). Esta tarea debía recordarse cuatro días después del entrenamiento ya que este sería el tiempo necesario para realizar las manipulaciones ambientales a evaluar mediante el SCJ. En segundo lugar, necesitábamos verificar si los peces interpretaban los colores puros entrenados (verde o rojo) de manera diferente que los colores ambiguos no entrenados (verde y rojos amarillentos), ya que un estímulo ambiguo entre los estímulos originalmente entrenados es requerido para que el SJC funcione.

El tercer experimento investigamos los impactos de tres niveles de enriquecimiento (Ninguno, Medio, Alto) y los efectos de diferentes cambios en estos niveles o condiciones de alojamiento (aumento gradual, disminución gradual, aumento repentino, disminución repentina y permanecer constante) sobre el estado afectivo de los peces cebra utilizando una prueba de SCJ, una prueba de claro/oscuro y una prueba de actividad para ello. La prueba de sesgo cognitivo se basó en un entrenamiento de discriminación previa frente a dos colores (aproximación a un color verde recompensado y evitación de uno rojo no recompensado). Una vez entrenados se les presentó los estímulos de forma ambigua (rojo amarillo y verde amarillo). La lógica es que peces con estados emocionales negativos escojan el rojo amarillo (sesgo negativo) y peces con estados emocionales positivos el verde amarillo (sesgo positivo). La prueba de claro/oscuro y actividad miden conductas relacionadas a la ansiedad y se realizarán para observar si los resultados del sesgo covariaban con los de estas pruebas.

Por lo tanto, se esperaba que los peces en condiciones de enriquecimiento y situaciones constantes y predecibles (Condiciones que aparentemente generan estados

positivos) reducirían los comportamientos de ansiedad y mostrarían un sesgo de juicio positivo frente a los estímulos ambiguos. Esperabamos los resultados opuestos para los peces alojados en condiciones estériles y variables (Condiciones que aparentemente generan estados negativos).

El cuarto experimento, consistió en una réplica del tercer experimento, pero utilizando peces que en su mayoría presentaron una personalidad tímida. Esto para comparar los resultados de los peces osados del tercer experimento con los tímidos de este mismo.

El artículo I permitió la estructuración y la discusión de los cuatro experimentos. Este artículo es una revisión sistemática de literatura sobre la influencia que ejercen las variaciones individuales y las diferentes manipulaciones ambientales sobre las respuestas de estrés y la calidad de vida del pez cebra.

El artículo II se elaboró a partir del segundo y tercer experimento. Este artículo evaluó la influencia del enriquecimiento ambiental estructural y la forma como este era ofertado sobre el SJC y los comportamientos tipo ansiedad en pez cebra.

El artículo III se realizó a partir de la comparación de los resultados del tercer y cuarto experimento. Este último evaluó la influencia del enriquecimiento ambiental estructural y la personalidad sobre el SJC y los comportamientos tipo ansiedad en pez cebra.

De esta manera la tesis fue dividida en capítulos donde cada uno corresponde a un artículo.

## 1. INTRODUCCIÓN

No existe una definición única de bienestar animal, sin embargo, varios autores coinciden en que es un estado de salud física y mental, que se produce como consecuencia de una buena adaptación al ambiente y a sus desafíos normales (OHL; PUTMAN, 2014). Este estado se ve reflejado en la ausencia de enfermedades, lesiones y emociones negativas y en la presencia de emociones positivas (BOISSY, 2019). Es este sentido el estudio de las emociones animales es muy importante para el bienestar animal (BOISSY; LEE, 2014) y para otras disciplinas como la psicología, la psiquiatría (KEEHN, 2018), la neurociencia (BURGDORF et al., 2017), la psicofarmacología (CZÉH; WIBORG; FUCHS, 2018) y el estudio del dolor (RICE et al., 2018).

El término emoción se ha definido tradicionalmente como una experiencia subjetiva que se acompaña de dos componentes principales, una respuesta conductual y una respuesta fisiológica (BOISSY, 2019; FRANKS, 2019). El aspecto subjetivo de la emoción es difícil de estudiar en animales, ya que este componente generalmente se infiere a través del reporte verbal en humanos y por lo tanto su medición en los animales al carecer de habla solo se puede inferir indirectamente a través de los elementos conductuales y fisiológicos, dejando de lado la parte subjetiva "fenomenológica" (BOISSY, 2019; FRANKS, 2019).

Estas evaluaciones conductuales y fisiológicas proporcionan una gran cantidad de información con respecto al componente de "excitabilidad emocional" (intensidad o actividad del animal), pero tienen algunos inconvenientes para medir la valencia emocional (si la emoción es positiva o negativa) (MENDL; BURMAN; PAUL, 2010; PAUL; MENDL, 2018; RUSSELL, 2003). Por ejemplo, la respuesta del eje hipotalámico hipofisario adrenal HPA y simpático adreno-medular SAM se activa de manera similar en situaciones adversas y gratificantes (BALDOCK; SIBLY, 1990; MARCHANT et al., 1995; RUSHEN, 1991).

Con respecto a las pruebas de comportamiento, estas tienen una alta confiabilidad y validez dada tanto por la validación farmacológica como por la validación cruzada (MAXIMINO et al., 2010a; PAUL; HARDING; MENDL, 2005). Sin embargo por lo general solo miden estados emocionales negativos relacionados a la ansiedad (MAXIMINO et al., 2010; PAUL et al., 2005), presentan dificultades para su interpretación ya que los resultados pueden explicarse por dos o más estados emocionales (FILE, 1996; PAUL; HARDING; MENDL, 2005; RAMOS; MORMÈDE, 1997), los comportamientos posteriores a la prueba pueden ser mejores indicadores de emoción que la respuesta durante la prueba en sí (HENDRIE; WEISS;

EILAM, 1996) y finalmente la respuesta conductual puede verse influenciada por las diferencias individuales (DEMIN et al., 2019; VOLGIN et al., 2019) y las condiciones ambientales del laboratorio (ALESTRÖM et al., 2020; CRABBE; WAHLSTEN; DUDEK, 1999; HOGG, 1996; LIEGGI et al., 2019).

Dado lo mencionado anteriormente, nuevas definiciones y metodologías extrapoladas de la psicología humana que vinculan la subjetividad a la evaluación de las emociones están siendo actualmente utilizadas en animales (BOISSY; LEE, 2014; DÉSIÉ et al., 2004; PAUL; HARDING; MENDEL, 2005). Dentro de estas nuevas tentativas, se propone integrar el componente cognitivo en la evaluación de las emociones animales como complemento de las evaluaciones neurofisiológicas y conductuales existentes (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; BOISSY, 2019; MELLOR, 2015; MENDEL; BURMAN; PAUL, 2010). En psicología humana se ha demostrado que los procesos cognitivos influyen y son influenciados por los estados emocionales del individuo. Por ejemplo, las personas que informan un estado emocional negativo (Ansiedad) muestran una mayor atención a un estímulo amenazante que aquellas en un estado emocional positivo (por ejemplo, (MATHEWS, 1994; MINEKA; OEHLBERG, 2008; MOGG et al., 2008). Del mismo modo, las personas en un estado de infelicidad o depresión son más propensas a recordar situaciones negativas, mientras que las personas felices tienden a recordar las buenas situaciones (por ejemplo, (BOWER, 1981; DALGLEISH & WERNER-SEIDLER, 2014; ANDREW MATHEWS, 1992; MINEKA & OEHLBERG, 2008). Finalmente, las personas tristes son más pesimistas al juzgar eventos futuros o ambiguos, mientras que las personas felices son más optimistas (por ejemplo, (EYSENCK et al., 1991; MACLEOD; BYRNE, 1996; NYGREN et al., 1996; SZPUNAR; SCHACTER, 2013; ZÁVORKA et al., 2015). Por lo tanto, esta interacción mutua entre las emociones y la cognición en los humanos (PAUL; HARDING; MENDEL, 2005; SCHWARZ, 2000) conduce a la adaptación de técnicas no verbales de psicología cognitiva para evaluar las emociones en los animales (DÉSIÉ et al., 2004; GREIVELDINGER; VEISSIER; BOISSY, 2011).

En general, el término "sesgo cognitivo" se utiliza para definir los efectos de los estados emocionales sobre los procesos cognitivos, que incluyen la memoria, la atención y la toma de decisiones o el juicio (RAOULT et al., 2017). Los efectos sobre este último se denominan "sesgo del juicio", este es el más utilizado y se ha introducido como procedimiento estándar en la evaluación de estados emocionales en animales (HARDING; PAUL; MENDEL, 2004; MARCHANT-FORDE, 2015; MENDEL; BURMAN; PAUL, 2010).

La prueba de sesgo cognitivo incluye una modificación del entorno o la historia de vida del animal, esto permite conocer los contextos y circunstancias específicas en los que se desarrolla un parámetro conductual o fisiológico y por lo tanto, facilita la distinción de aquellos estados emocionales en los cuales es más probable que ocurran los parámetros observados (BERRIDGE; ROBINSON, 2003; LAMBERT; CARDER, 2019; MAKOWSKA; WEARY, 2013; PROCTOR; CARDER, 2016, 2014, 2015a, 2015b). Aunque esto puede parecer obvio, las investigaciones sobre las emociones en animales no siempre teorizan, manipulan o miden las emociones con relación a un contexto (GREENAWAY; KALOKERINOS; WILLIAMS, 2018). Además, la evaluación de los contextos ayuda a comprender qué tipos de entornos promueven experiencias positivas (BOISSY; ERHARD, 2014), que tipo de ambiente disminuye los efectos adversos frente a un estresor (SIMPSON; KELLY, 2011; SINGHAL et al., 2014) y por lo tanto que tipo de alojamiento ayuda a mejorar el bienestar y la salud de los animales (ALAIN BOISSY & ERHARD, 2014).

Por otra parte el estudio del rol que desempeñan las diferencias individuales como la personalidad es importante en las pruebas de comportamiento ya que varios estudios muestran que no todos los individuos reaccionan de la misma manera a una situación o estímulo específico (BAKER; WONG, 2019; BOISSY; ERHARD, 2014). Se ha visto que algunos rasgos de la personalidad pueden influir sobre varios parámetros en estas pruebas, como por ejemplo generando un nivel más bajo de actividad, tolerancia al dolor o temperatura (VONK, et al., 2017). Lo que podría explicar por qué algunas veces una situación o estímulo particular que normalmente induciría una respuesta emocional determinada, posteriormente no la produce (FORKMAN et al., 2007; HEDLUND; LØVLIE, 2015; KOOLHAAS; REENEN, 2016). Adicionalmente ya que se ha encontrado que la personalidad puede influenciar los sesgos cognitivos en animales (ASHER et al., 2016; BARNARD et al., 2018; KREMER et al., 2021; LECORPS; WEARY; VON KEYSERLINGK, 2018) es importante evaluar si sucede lo mismo en el pez cebra.

## **2. OBJETIVOS DE LA TESIS**

### **2.1 Objetivo General**

Establecer si el sesgo de juicio cognitivo puede ser utilizado en pez cebra para la evaluación de estados emocionales positivos y negativos producidos por modificaciones ambientales y su relación con la personalidad.

### **2.2 Revisión sistemática**

Establecer las bases teóricas para la estructuración y la discusión de los cuatro experimentos.

### **2.3 Experimento 1**

Evaluar la personalidad animal de los peces y extraer las dimensiones de personalidad osadía o timidez.

### **2.4 Experimento 2**

Comprobar que los peces pueden establecer una asociación discriminativa entre dos colores (rojo y verde) y recordarla durante cuatro días.

Verificar si los peces interpretan los colores puros entrenados (verde o rojo) de manera diferente que los colores ambiguos no entrenados (verde y rojos amarillentos)

### **2.5 Experimento 3**

Investigar si el enriquecimiento ambiental estructural y la forma como es ofertado influencia el sesgo de juicio cognitivo y los comportamientos tipo ansiedad en pez cebra adulto.

### **2.6 Experimento 4**

Determinar la influencia que ejerce la dimensión de la personalidad (Osadía vs. Tímidez) y el enriquecimiento ambiental estructural sobre el sesgo de juicio cognitivo y los comportamientos tipo ansiedad en pez cebra adulto.

### 3. ARTÍCULOS

#### 3.1 Artículo I

Jhon Buenhombre, Erika Alexandra Daza-Cardona, Pêssi Sousa and Amauri Gouveia Jr (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* Volume 131, December 2021, Pages 765-79. Artículo Publicado.

**Diferentes influencias de los modelos de ansiedad, del enriquecimiento ambiental, de las condiciones estándar de alojamiento y de la variación individual (sexo, personalidad y línea genética) sobre el estrés y la calidad de vida en peces cebras adultos y juveniles: una revisión sistemática.**

#### RESUMEN

Las manipulaciones ambientales (MA) antagonistas y de larga duración han inducido o reducido con éxito las respuestas de estrés y la calidad de vida del pez cebra. Por ejemplo, el enriquecimiento ambiental (EA) generalmente reduce los comportamientos relacionados con la ansiedad y mejora la inmunidad, mientras que el estrés crónico impredecible (ECI) y los estresores relacionados con el alojamiento en acuarios generan efectos opuestos. Sin embargo, no existe consistencia en los resultados para algunas MA como para la exposición aguda a factores estresantes, el enriquecimiento ambiental social y algunos elementos del enriquecimiento ambiental estructural. Por lo tanto, tener en cuenta las variaciones dentro de la especie (sexo, personalidad y tensión), aumentar la complejidad de las intervenciones, mejorar la estandarización de los protocolos y contemplar la posibilidad de que el EA pueda actuar como un estresor leve en un espectro entre demasiada ECI ó muy poca (condiciones estándar) intensidad de estrés o estimulación, podría reducir las inconsistencias de los resultados. Lo anterior también serviría para explorar los mecanismos que subyacen la resiliencia al estrés y para estandarizar los protocolos de MA. Por lo tanto, esta revisión analiza y compara de forma crítica el conocimiento existente a lo largo de la última década sobre las diferentes manipulaciones ambientales en pez cebra y las influencias que el sexo, las líneas genéticas y la

personalidad pueden tener sobre las respuestas conductuales, fisiológicas y aquellas relacionadas con la eficacia biológica.

**Palabras clave:** Resistencia al estrés, pez cebra, enriquecimiento ambiental, línea genética, sexo, personalidad, neurofisiología, comportamiento.

**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.**

**ABSTRACT**

Antagonist and long-lasting environmental manipulations (EM) have successfully induced or reduced the stress responses and quality of life of zebrafish. For instance, environmental enrichment (EE) generally reduces anxiety-related behaviours and improves immunity, while unpredictable chronic stress (UCS) and aquarium-related stressors generate the opposite effects. However, there is an absence of consistency in outcomes for some EM, such as acute exposure to stressors, social enrichment and some items of structural enrichment. Therefore, considering intraspecies variation (sex, personality, and strain), increasing intervention complexity while improving standardisation of protocols and contemplating the possibility that EE may act as a mild stressor on a spectrum between too much (UCS) and too little (standard conditions) stress intensity or stimulation, would reduce the inconsistencies of these outcomes. It would also help explore the mechanism behind stress resilience and to standardise EM protocols. Thus, this review critically analyses and compares knowledge existing over the last decade concerning environmental manipulations for zebrafish and the influences that sex, strain, and personality may have on behavioural, physiological, and fitness-related responses.

**Keywords:** Stress resilience, Zebrafish, Environmental enrichment, Strain, Sex, Personality, Neurophysiology, Behaviour

## INTRODUCCIÓN

El estrés y la calidad de vida son preocupaciones significativas entre los investigadores interesados en modelos preclínicos de trastornos mentales relacionados con el estrés (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015; DEMIN et al., 2020a; SANTARELLI et al., 2014) y el bienestar animal (COLDITZ; HINE, 2016). En general, la resiliencia al estrés y la buena calidad de vida son dos términos relacionados, asociados con el mantenimiento de parámetros fisiológicos y conductuales normales de estrés o el rápido retorno a la línea de base después de un desafío (DEPASQUALE et al., 2016). En consecuencia, también se asocian con un incremento en la salud y la aptitud biológica debido a una mejor adaptación a los factores estresantes posteriores (COLDITZ; HINE, 2016).

Además, la interacción de factores genéticos y ambientales influye fuertemente en estos y otros rasgos biológicos relacionados, como la fisiología, el comportamiento, la salud y la eficacia biológica en el pez cebra (*Danio rerio*) (SONG et al., 2016; VOLGIN et al., 2019). Del mismo modo, la personalidad (consistencia del comportamiento y la fisiología a través del tiempo y el contexto) (TOMS; ECHEVARRIA, 2014) da forma a las respuestas biológicas de los peces cebra y, a su vez, influye y está influenciada por las interacciones ambientales y genéticas (DEMIN et al., 2019; TOMS; ECHEVARRIA, 2014). Por lo tanto, tener en cuenta las diferencias individuales (sexo y personalidad), las líneas genéticas y los factores ambientales en conjunto, es crucial para mejorar nuestra comprensión de la resiliencia al estrés y la calidad de vida del pez cebra.

El impacto de múltiples factores genéticos y ambientales y de las diferencias individuales en los fenotipos de estrés conductual y fisiológico ha sido ampliamente estudiado en varios modelos animales, particularmente en roedores (*e.g.* (MAGALHÃES et al., 2019; SONG et al., 2016). Sin embargo, un espectro más amplio de animales estudiados podría promover la relevancia traslacional de los modelos de estrés al proporcionar características clave superpuestas y mecanismos de función biológica conservados entre especies (GERLAI, 2020). Por lo tanto, el pez cebra podría ser un modelo preclínico complementario prometedor ya que ofrecería muchas convergencias y diferencias relacionadas al estrés. Por ejemplo, además de presentar un comportamiento complejo, la respuesta endocrina del pez cebra lo hace particularmente útil para la investigación de estrés traslacional debido a sus similitudes con los humanos, como el uso de cortisol en lugar de corticosterona, como si ocurre en los roedores (EGAN et al., 2009). También se ha convertido en un modelo popular en varios campos debido a sus múltiples ventajas en la investigación (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014).

Por lo general, la investigación ha modelado las interacciones genéticas y ambientales a través de modificaciones en el medio ambiente en el que viven los animales (DEMIN et al., 2019, 2020b; VOLGIN et al., 2019). Por ejemplo, algunos estudios han abordado las influencias de las manipulaciones ambientales sobre los fenotipos conductuales y fisiológicos del estrés del pez cebra (EGAN et al., 2009) y su impacto en la mejora de su calidad de vida. Sin embargo, los estudios que evalúan estos aspectos en esta especie son escasos (MARCON et al., 2018a).

Las modificaciones al medio ambiente por lo general consisten en la exposición a estímulos estresantes y el enriquecimiento ambiental o a condiciones estándar (VOLGIN et al., 2019). Diversos estudios han demostrado que una sobrecarga de estrés agudo, la exposición a un estrés crónico impredecible y la incapacidad para hacer frente a estos desafíos se han asociado con el desarrollo de una serie de trastornos de comportamiento y médicos (BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA-CORDERO, 2020; DEPASQUALE et al., 2019) y, en consecuencia, una baja calidad de vida (TONI et al., 2019a). Estas alteraciones son frecuentes en las condiciones estériles estándar de laboratorio (KIRSTEN et al., 2018; KISTLER et al., 2011; NÄSLUND & JOHNSON, 2016b) pero pueden ser atenuadas o incluso revertidas por manipulaciones en el alojamiento (BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA-CORDERO, 2020; CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015). Por lo tanto, el enriquecimiento ambiental parece ser una alternativa no farmacológica ventajosa para tratar y prevenir los trastornos relacionados con el estrés y mejorar la calidad de vida.

El enriquecimiento ambiental proporcionó muchos beneficios en el pez cebra, como niveles más bajos de ansiedad y cortisol (GIACOMINI et al., 2016), reducción de la agresión y la monopolización de los alimentos (BASQUILL; GRANT, 1998), mejora el aprendizaje (DEPASQUALE et al., 2016), aumenta la fertilidad (WAFER et al., 2016), la toma de decisiones (KAREKLAS; ELWOOD; HOLLAND, 2018), entre otros (VOLGIN et al., 2018a). Sin embargo, algunos estudios han encontrado un aumento en la ansiedad (WILKES et al., 2012) o han detectado efectos adversos como el aumento de la agresión (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015; WOODWARD; WINDER; WATT, 2019). Esta falta de consistencia puede deberse a diferencias en los protocolos (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015; MARCON et al., 2018a) y poco conocimiento sobre el papel que varias características individuales (sexo, línea genética, personalidad) puedan tener sobre los resultados (DEMIN et al., 2019; ROCHE; CAREAU; BINNING, 2016). Por ejemplo, existen diferencias genéticas críticas en las

respuestas de estrés entre varias de las líneas genéticas de pez cebra disponibles comercialmente (AUDIRA et al., 2020; EGAN et al., 2009).

Además, los individuos de un mismo linaje de peces cebra también presentan diferencias notables en cómo perciben y reaccionan al mismo estímulo en condiciones de laboratorio estandarizadas (ZABEGALOV et al., 2018). Asimismo, el sexo tiene una influencia significativa en la respuesta de estrés conductual (WONG et al., 2012) y fisiológica (OSWALD et al., 2012; RAMBO et al., 2017; REOLON et al., 2018; WONG; FRENCH; RUSS, 2019).

Como hemos visto, las diferencias de protocolo (por ejemplo, grado y duración), edad del animal, linaje, personalidad y sexo pueden afectar los resultados de las manipulaciones ambientales en el pez cebra (DEMIN et al., 2019; VOLGIN et al., 2019). Por lo tanto, se deben considerar estas variables en el diseño experimental de manipulaciones ambientales para mejorar la reproducibilidad y traducibilidad de los datos (DEMIN et al., 2019). En consecuencia, esta revisión sistemática tiene como objetivo analizar y sintetizar de manera crítica los conocimientos existentes sobre el uso de diferentes manipulaciones ambientales y su efecto sobre el estrés y la calidad de vida en el pez cebra, considerando las diferencias individuales antes mencionadas. Tenemos la intención de cubrir la literatura publicada en la última década lo más completamente posible, aunque podríamos haber pasado por alto algunos estudios. Esperamos que esta revisión añada más claridad al tipo de manipulaciones que confieren resistencia al estrés y generan efectos positivos o negativos en la calidad de vida. Finalmente, buscamos simplificar cómo interactúan las diferencias individuales para conferir esa resiliencia y que tipo de manipulaciones que se ajustan mejor a una personalidad, sexo y linaje para mejorar la calidad de vida del animal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Revisión sistemática**

Se utilizó la declaración PRISMA (elementos de reporte preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis) (MOHER et al., 2009) para reportar nuestros hallazgos de literatura relevante.

Dos revisores independientes realizaron una búsqueda sistemática de estudios sobre los efectos de las manipulaciones ambientales, la línea genética y la personalidad sobre la resiliencia al estrés y la calidad de vida, a través de la búsqueda en tres bases de datos diferentes (PubMed, Scopus y Web of Science) en dos momentos diferentes, uno en febrero de 2020, con

una actualización en octubre de 2020. Utilizamos la siguiente estrategia de búsqueda para cada base de datos bibliográfica: Título, resumen, palabras clave o tema: (“pez cebra” Y “enriquecimiento” Y “estrés”) (“pez cebra” Y “enriquecimiento” Y “bienestar”) (“pez cebra” Y “personalidad” Y “estrés”) (“pez cebra” Y “personalidad” Y “bienestar”) (“pez cebra” Y “cepa” Y “estrés”) (“pez cebra” Y “cepa” Y “bienestar”). El período de inclusión en la revisión fue de enero de 2010 a julio de 2020. Después de una revisión de resumen y del título, seleccionamos los artículos; se consultó y consideró el texto completo de los manuscritos de acuerdo con los criterios de selección antes mencionados. Dos investigadores independientes se ocuparon de la selección y elegibilidad, y un tercer investigador resolvió cualquier desacuerdo. Además, se incluyeron estudios relevantes adicionales citados por los artículos seleccionados, que cumplieron con nuestros criterios de inclusión.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyeron estudios originales que evaluaron la influencia de la personalidad, la línea genética y las manipulaciones ambientales sobre la respuesta al estrés y la calidad de vida en el pez cebra. Agregamos solo artículos relacionados con etapas adultas y juveniles, aunque también consideramos algunos estudios que evaluaron la etapa larvaria. Definimos la manipulación ambiental como cualquier enriquecimiento ambiental o condiciones estándar. No incluimos manipulaciones farmacológicas o toxicológicas, aunque hicimos una excepción para estudios que comparan manipulaciones farmacológicas y enriquecimiento ambiental al mismo tiempo. Cubrimos trabajos que utilizaron métodos experimentales para manipular las condiciones del hábitat y artículos que analizaban los diferentes hábitats naturales donde los animales fueron capturados. Se excluyeron trabajos sin grupo control (un grupo con condiciones de laboratorio estándar) e intervenciones que potencialmente interfirieron con el efecto primario de las manipulaciones ambientales. Definimos la personalidad como una respuesta conductual consistente a través del tiempo y las situaciones, incluyendo términos como temperamento, síndrome conductual, tipo de comportamiento, rasgo conductual y estilo de afrontamiento. Para ser incluidos, los estudios tuvieron que abordar la manipulación ambiental, la línea genética y la personalidad como causas (variables independientes) y las medidas de las respuestas al estrés y la calidad de vida como resultados (variables dependientes); se excluyó cualquier otro tipo de diseño experimental. Solo consideramos estudios publicados, revisados por pares y escritos en inglés. Se excluyeron del análisis los trabajos sin descripción clara de la manipulación ambiental, la designación de la personalidad o la línea genética. Finalmente, se evaluaron los posibles sesgos que afectaron a los artículos

seleccionados utilizando la herramienta SYRCLE (Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation).

## **RESULTADOS**

### **Modificaciones del protocolo de estudio**

Aunque no consideramos las diferencias de sexo en el alcance de la revisión inicial, las incluimos porque muchos de los artículos seleccionados reportaron diferencias significativas de género que influyeron en el estrés y la calidad de vida.

### **Resultados de la búsqueda**

Nuestra estrategia de búsqueda resultó en 2293 artículos, de los cuales 828 fueron proporcionados por PubMed, 904 por Web of Science y 561 por Scopus. Después de omitir 990 duplicados, se proyectaron 1303 artículos por el título y el resumen. Un total de 193 estudios cumplieron nuestros criterios de inclusión basados en el título y el resumen. Después de leer los textos completos, decidimos incluir 89 artículos en este estudio. El proceso de selección se muestra en la Figura 1. La lista completa de artículos que componen nuestra muestra con una descripción de los experimentos, y la lista de variables y categorías utilizadas para estratificar nuestros análisis, están disponibles en las Tablas 1-6.

Aquí presentamos los principales hallazgos de nuestro estudio basados en las manipulaciones ambientales, la personalidad y la línea genética. Los resultados de la evaluación de sesgo se pueden encontrar en la Tabla 7. Con respecto a los resultados sobre el estrés y la calidad de vida, 56 de los 89 estudios revisados evaluaron las manipulaciones ambientales independientemente de la personalidad o la línea genética. Veintidós de los 89 estudios abarcaron los impactos de la personalidad, y diez cubrieron la influencia de la línea genética. Trece estudios evaluaron el efecto del sexo al mismo tiempo que el medio ambiente, la personalidad y la línea genética.

### **Calidad del estudio**

La Tabla 7, muestra el riesgo de evaluación sesgada de los estudios incluidos. Once estudios tuvieron un alto riesgo de sesgo en las características basales y tres en el cegamiento. Tres estudios reportaron alto riesgo en la aleatorización de viviendas, seis en el cegamiento, veinte en el reporte de resultados y ninguno en el cálculo de potencia o tamaño de muestra. Siguiendo los resultados de la herramienta SYRCLE Risk of Bias, todos los estudios tuvieron un riesgo general poco claro de sesgo.

## **Diferentes resultados para medir el estrés y la calidad de vida en el pez cebra**

Se han utilizado diversos resultados conductuales, fisiológicos, neurobiológicos y relacionados con la eficacia biológica para evaluar los efectos de las manipulaciones ambientales sobre el estrés y la calidad de vida en el pez cebra.

### **Resultados conductuales**

Tres paradigmas conductuales basados en la novedad, a saber, el campo abierto, el claro/oscuro y el tanque novedoso, fueron los indicadores más utilizados para la medición de comportamiento relacionado a la ansiedad o al estrés, con 8, 9 y 30 estudios utilizando estos paradigmas, respectivamente (Tabla 1-6). Por lo tanto, el tanque novedoso ha sido el más aplicado. Por lo general, en estos modelos, la ansiedad se refleja en la reducción de la exploración y el aumento de congelación, movimientos erráticos, tigmotaxia (campo abierto), escototaxia (claro/oscuro) y geotaxis (tanque novedoso). Para obtener más información sobre los parámetros de comportamiento típicos utilizados en estas pruebas, véase (COLLIER; KALUEFF; ECHEVARRIA, 2017; KALUEFF et al., 2013) Contrario a la inactividad, la hiperactividad también se ha utilizado como una medida de la ansiedad en el campo abierto (SHAMS et al., 2018) y en el tanque de alojamiento (VON KROGH et al., 2010), aunque no se conoce los fundamentos de estas dos últimas medidas.

Además de evaluar cómo los animales exploraron y se habituaron a entornos novedosos, varios estudios utilizaron otras respuestas conductuales como la disminución de la cohesión del cardumen (10 estudios), el aumento de la agresión (14 artículos) y la reducción de la latencia para alimentarse (5 artículos) como respuestas conductuales relacionadas al estrés (Tabla 1-6). El deterioro en la adquisición de memoria espacial y asociativa también fue relacionado con la ansiedad. Estas medidas se evaluaron utilizando el paradigma de evitación inhibitoria (7 estudios) y el condicionamiento clásico en diferentes modelos de laberinto (11 artículos). Uno de los 7 estudios de evitación inhibitoria también examinó la extinción en respuesta al estrés (KENNEY et al., 2017) (Tabla 1-6).

La presencia de un cardumen elevado fue propuesta recientemente como un indicador de la emoción positiva, pero se evaluó solo en una investigación (FRANKS; GRAHAM; VON KEYSERLINGK, 2018). Asimismo, algunos estudios utilizaron una valoración basada en preferencias de recursos o ambientes, en la que los investigadores evalúan las áreas donde los animales pasan más tiempo y entran con más frecuencia. Estas áreas están asociadas con estímulos positivos/gratificantes (FIFE-COOK & FRANKS, 2019; VOLGIN et

al., 2018b). Se encontraron seis estudios que evaluaron la preferencia de lugar como indicador de posibles ítems y circunstancias que el animal puede experimentar como positivas (Tabla 3 y 5).

### **Resultados fisiológicos y neurobiológicos**

Como en otras especies, las catecolaminas y los corticosteroides son los principales facilitadores de la respuesta al estrés en el pez cebra (DEMIN et al., 2020a). En consecuencia, el aumento de los niveles de cortisol fue el parámetro fisiológico más común para evaluar el estrés. Veintiséis de los 88 estudios seleccionados midieron cortisol del tronco, cortisol de cuerpo entero o cortisol en el agua del tanque (Tabla 1-6). Se utilizó melatonina en un estudio (TUDORACHE et al., 2018), junto con el cortisol. Sin embargo, esta crucial hormona no esteroide involucrada en la respuesta al estrés (GENARIO et al., 2019) fue evaluada solo para la personalidad y no para las manipulaciones ambientales.

Además del cortisol, se evaluó la expresión de varios genes implicados en la regulación del eje hipotalámico-hipófisis-ínter-renal (HPI) que incluyeron: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el receptor de serotonina 1a (htr1a), el transcriptor 4 de regulación para cocaína y anfetamina (cart4), el factor liberador de corticotropina (crf), la proteína de unión a crf (crf-bp), el receptor cannabinoide 1 (cnr1), los receptores glucocorticoides ( $gr\alpha$ ,  $gr\beta$ ), mineralocorticoides (mr), proopiomelanocortina (pomc), prolactina (prl) e hipocretina/orexina y fos). Once de los 88 estudios seleccionados midieron la expresión de estos genes (Tabla 1-6). Además, la 11 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -hsd) fue evaluada por un estudio para la personalidad (OSWALD et al., 2012). Mientras que la regulación ascendente de estos receptores se ha relacionado con mecanismos adaptativos para mantener la integridad neuronal y prevenir la sobrecarga, la regulación descendente de estos genes también se ha relacionado con la ansiedad (CHAKRAVARTY et al., 2013).

Los receptores de dopamina D2 (drd2a y drd2b) y el receptor delta-opioide (DOR; oprd1b) fueron evaluados por Thörnqvist et al., 2019 para medir los cambios relacionados con la personalidad, ya que los opioides parecen influir en los sistemas dopaminérgicos, y es probable que las interacciones entre estos sistemas sean esenciales para generar divergencias intraespecíficas en los fenotipos de comportamiento (THÖRNQVIST et al., 2019a). Del mismo modo, los genes involucrados en la regulación del reloj biológico también fueron evaluados para considerar la personalidad (TUDORACHE et al., 2018).

Además, se evaluaron los marcadores moleculares de ansiedad reportados en modelos de roedores como la subunidad B de calcineurina tipo 1 (ppp3r1a) y elemento de unión a proteína de respuesta AMP (pCREB) por (CHAKRAVARTY et al., 2013). En el mismo estudio, un aumento en VDAC3, PHB2, SNBC y SLC25A5 del perfil del proteoma cerebral se implicó con disfunción mitocondrial debido a ECI en peces cebra. Del mismo modo, en un estudio de (PIATO, ROSEMBERG, et al., 2011), los marcadores del sistema purinérgico ATP y su metabolito ADP se asociaron con el estrés agudo.

Los cambios morfológicos relacionados con la neuroplasticidad y la neurogénesis también se han relacionado con el estrés, ya que parece que algunos factores estresantes pueden afectar la neurogénesis. En contraste, otros mejoran la proliferación celular, el aprendizaje y la resiliencia al estrés (DEPASQUALE et al., 2016). Cinco estudios evaluaron el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). El número de células teñidas en regiones proliferantes y el número de espinas dendríticas en respuesta al estrés se evaluaron en cuatro estudios (Tabla 1-6). Además, un estudio evaluó el cambio en el volumen cerebral debido a manipulaciones ambientales (DEPASQUALE et al., 2016).

Finalmente, los niveles de monoaminas serotonina (GIACOMINI et al., 2016), dopamina (FULCHER et al., 2017) y sus metabolitos han estado involucrados con la regulación del estrés del pez cebra y los perfiles de personalidad (TRAN et al., 2016). En esta revisión, estos niveles fueron examinados por siete estudios (Tabla 1-6).

### **Resultados relacionados a la eficacia biológica**

Aumento de la supervivencia (medición de la tasa de mortalidad), crecimiento (medida como aumento de peso y tamaño), salud de los peces (medición de la respuesta inmune) y éxito reproductivo (medición del tamaño de la cola y la tasa de desove) se midieron en 5, 8, 2 y 7 estudios respectivamente (Tabla 1-6). Algunos autores argumentaron que estas medidas evaluaron la capacidad de los animales para adaptarse fisiológicamente a su entorno en cautiverio y mantener la funcionalidad de sus sistemas biológicos y todos ellos se han asociado con una buena calidad de vida en el pez cebra (NÄSLUND & JOHANSSON, 2016b). Además, el estrés oxidativo se evaluó midiendo el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un estudio. En este estudio, el cortisol elevado se asoció con el aumento de la respiración mitocondrial y la producción de ROS como subproducto (MARCON et al., 2018b).

La diferencia en el tamaño y metabolismo de los peces también se han evaluado como covariables para la personalidad (5 estudios) y la línea genética (1 estudio). Esto lo describiremos en las secciones correspondientes abajo.

### **Influencias medioambientales sobre el estrés y la calidad de vida en el pez cebra**

Encontramos muchas estrategias reportadas para evaluar la respuesta al estrés y la calidad de vida en el pez cebra. Clasificamos estas estrategias en aquellas que (1) evalúan las modificaciones ansiogénicas, (2) evalúan los factores de desarrollo para generar resiliencia al estrés en la edad adulta, (3) evalúan el enriquecimiento ambiental frente a las condiciones estándar y (4) evalúan los factores estresantes relacionados con la cría y el alojamiento. También describimos cada una de estas estrategias (Ansiogénica, de desarrollo, de enriquecimiento, de cría y de vivienda) en términos del recurso que proporciona (los insumos) y sus efectos sobre los animales (resultados).

### **Manipulaciones ambientales para modelar la ansiedad**

En general, las manipulaciones ambientales para estudiar el estrés se han centrado en modelar la ansiedad y evaluar posibles fenotipos fisiológicos y conductuales asociados (COLLIER; KALUEFF; ECHEVARRIA, 2017; DEMIN et al., 2020a; STEWART et al., 2012). Revisamos diez estudios que evaluaron ese paradigma. Las manipulaciones utilizadas en estos estudios incluyeron exposición aguda o crónica a una amplia gama de factores de estrés, a saber, privación de alimentos, novedad, restricción en un tubo, feromona de alarma, exposición a depredadores, exposición a conspecíficas, hacinamiento, aislamiento social, exposición al aire, exposición a la luz brillante, exposición a la caja oscura, persecución con redes, hipotermia local, sacudidas y cambios en los niveles de agua y temperatura. En la Tabla 1 se enumeran las principales características de la exposición aguda y crónica a factores estresantes (insumos de recursos) utilizados en los estudios examinados. En cuanto a la exposición crónica, cinco estudios utilizaron como modelos los protocolos de ECI, que se basaron en combinaciones de los diferentes estímulos mencionados anteriormente, donde el tiempo y la secuencia de la presentación del factor estresante se modificaron diariamente para evitar la habituación y mantener la imprevisibilidad (PIATO et al., 2011b).

La duración del protocolo ECI varió desde un mínimo de siete días (PIATO et al., 2011b; RAMBO et al., 2017) hasta un máximo de cinco semanas (SONG et al., 2018). Independientemente de la duración, el ECI tuvo éxito en producir un aumento de los comportamientos relacionados con la ansiedad, como se refleja en el incremento en la geotaxis

(CHAKRAVARTY et al., 2013; PIATO et al., 2011b; SONG et al., 2018), escototaxis (CHAKRAVARTY et al., 2013), ataques de congelación (CHAKRAVARTY et al., 2013), locomoción reducida (CHAKRAVARTY et al., 2013; PIATO et al., 2011b) y agresión en machos (RAMBO et al., 2017). Además, se informó un aumento de la cohesión del cardumen y una disminución de la latencia para formar cardumen después de la exposición al ECI (CHAKRAVARTY et al., 2013; PIATO et al., 2011b). Asimismo, el ECI afectó la función cognitiva en la evitación inhibitoria y los efectos parecieron empeorar con el tiempo (PIATO et al., 2011b).

En cuanto a las respuestas fisiológicas y neuronales, el ECI aumentó los niveles de cortisol (MANUEL et al., 2014; PIATO et al., 2011b; SONG et al., 2018), la expresión del CRF (CHAKRAVARTY et al., 2013; PIATO et al., 2011b), calcineurina (CHAKRAVARTY et al., 2013), BDNF (CHAKRAVARTY et al., 2013; MANUEL et al., 2014; SONG et al., 2018),  $m_r$ ,  $g_r\alpha$ ,  $g_r\beta$  (MANUEL et al., 2014), perfil del proteoma cerebral (CHAKRAVARTY et al., 2013) y la densidad de espinas dendríticas en las neuronas telencefálicas (SONG et al., 2018). Además, el protocolo ECI disminuyó la expresión de GR (PIATO et al., 2011b), pCREB, y la neurogénesis en el tectum óptico (CHAKRAVARTY et al., 2013).

Cinco estudios evaluaron la exposición aguda a factores estresantes, en los que los peces estuvieron expuestos a uno de los siguientes estímulos: depredador simpátrico, feromona de alarma, persecución con redes y restricción. Estos estímulos se presentaron a alta intensidad y con una duración relativamente corta. Un estudio evaluó el efecto de la habituación sobre un nuevo factor estresante agudo y la supresión de esta habituación por feromonas de alarma y agentes farmacológicos (WONG et al., 2010).

La duración de la exposición aguda a factores estresantes fue muy variable, oscilando entre 30 segundos (APONTE; PETRUNICH-RUTHERFORD, 2019; TRAN; CHATTERJEE; GERLAI, 2014) a 90 minutos (PIATO et al., 2011a) y los resultados reportados fueron bastante inconsistentes tanto para la duración como para el tipo de factor estresante. Mientras que (APONTE & PETRUNICH-RUTHERFORD, 2019) no encontraron ningún efecto del estrés agudo aplicado por una red durante 30 segundos sobre los comportamientos similares a la ansiedad y los niveles de cortisol, (TRAN et al., 2014) encontraron un aumento en el cortisol después de aplicar la red y (PIATO, ROSEMBERG, et al., 2011) un aumento de la geotaxis después de una restricción aguda. Del mismo modo, la exposición aguda a una feromona de alarma y a un depredador simpátrico durante 6 minutos afectó la memoria espacial y asociativa en una prueba de laberinto (GAIKWAD et al., 2011), pero la restricción aguda

durante 90 minutos no afectó la memoria de los animales entrenados en la tarea de evitación inhibitoria (PIATO et al., 2011a). Además, la feromona de alarma aumentó la geotaxis (WONG et al., 2010), pero no se encontraron diferencias para la locomoción y la formación de cardumen después de aplicar una restricción aguda durante 90 minutos (PIATO et al., 2011a).

En cuanto a las respuestas neurofisiológicas, el estrés neto agudo aumentó la hidrólisis del ATP, disminuyó la actividad del ADA citosólico y cambió la expresión del gen *entpd* y *adora* (PIATO et al., 2011a). Además, el estrés agudo elevó las citoquinas proinflamatorias - interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (SONG et al., 2018) y no se encontraron diferencias para los neurotransmisores (TRAN; CHATTERJEE; GERLAI, 2014).

### **Influencias de las manipulaciones ambientales en los primeros años de vida**

En el pez cebra, muy pocos estudios han explorado los efectos de las manipulaciones ambientales durante el desarrollo sobre la resiliencia al estrés (FONTANA et al., 2020). En nuestra revisión, tan solo siete estudios evaluaron los efectos de estar expuesto a experiencias desafiantes o enriquecimiento durante el desarrollo sobre la resiliencia ante eventos estresantes futuros. En la tabla 2, se registran las principales características de la exposición a factores estresantes o de enriquecimiento en los primeros años de vida empleada en los estudios examinados.

Las manipulaciones de los primeros años de vida incluyeron la exposición a factores estresantes relevantes como depredador, no depredador, aislamiento, persecución de redes y enriquecimiento. Además, 3 de los 6 estudios compararon la influencia de complejos (novedad social y/o objetos de enriquecimiento) o ambientes estresantes en la resiliencia al estrés (DEPASQUALE et al., 2016; LINDSEY; TROPEPE, 2014; SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011). La duración de la exposición temprana a factores estresantes varió de siete días (SHAMS et al., 2017) a seis meses (LINDSEY; TROPEPE, 2014; SHAMS et al., 2018) comenzando desde el día 0 (FULCHER et al., 2017; SHAMS et al., 2018) hasta el 25 (DEPASQUALE et al., 2016) post-fertilización.

La duración, el tiempo de inicio y el tipo de factor estresante en los primeros años de vida ejercieron una influencia diferente en la resiliencia al estrés en peces cebras juveniles y adultos. Por ejemplo, no se describieron diferencias en las respuestas conductuales para un término conciso (7 días) de exposición a un factor estresante en peces jóvenes y adultos (SHAMS et al., 2018). Una exposición a término relativamente medio (77-103 días) tanto a la complejidad (objetos de enriquecimiento cambiados con el tiempo) como a un estrés leve

(persecución neta diaria) resultó en un aprendizaje mejorado en una prueba de laberinto y menos ansiedad (geotaxis reducida) cuando los peces cebra fueron probados como juveniles (entre 77 y 90 días) (DEPASQUALE et al., 2016). Del mismo modo, el enriquecimiento a largo plazo (180 días) resultó en un aprendizaje mejorado en un laberinto (SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011) y los peces que habían experimentado previamente el enriquecimiento durante un año eran menos ansiosos (geotaxis reducida) (DEPASQUALE et al., 2016). El aislamiento a largo plazo (180 días) durante la ontogénesis también redujo los comportamientos relacionados a la ansiedad (tigmotaxia) y la cohesión del cardumen, aunque aumentó la locomoción (SHAMS et al., 2018). Por el contrario, cinco meses de aislamiento, seguidos de un Estrés Crónico Medio Impredecible (ECMI) no produjeron ninguna diferencia en las respuestas conductuales (FULCHER et al., 2017).

En general, el estrés en los primeros años de vida fue capaz de reducir la respuesta al cortisol en peces expuestos a futuros desafíos. La exposición visual a largo plazo (90 días) a peces hetero específicos (depredadores y no depredadores) durante el desarrollo resultó en una reducción de los niveles de cortisol cuando el pez cebrilla fue desafiado con una persecución de red aguda durante 120 segundos o se volvió a exponer al depredador diez días después. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias para los niveles basales de cortisol entre los grupos de control y los expuestos (ABREU et al., 2018). Asimismo, no se notificaron diferencias para el cortisol basal en animales criados en aislamiento o grupo social durante seis meses (LINDSEY; TROPEPE, 2014).

Los autores reportaron resultados contradictorios para experiencias tempranas en los neurotransmisores obtenidos después de las pruebas de comportamiento en peces adultos. Shams et al. (2018a) reportaron que tanto el aislamiento social a corto (7 días) como a largo plazo (180 días) redujo los niveles de DOPAC en comparación con la crianza social, pero no encontraron diferencias para la dopamina, la serotonina y su metabolito. Por el contrario, Fulcher et al. (2017) no informó diferencias en los niveles de DOPAC en peces estresados (ECMI durante 15 días) o no estresados que fueron aislados o alojados en grupos durante cinco meses. Sin embargo, encontraron que los peces criados con estrés social exhibieron niveles de dopamina más altos que los peces aislados y los peces criados con estrés social exhibieron niveles significativamente más altos de 5-HIAA en comparación con los peces estresados con aislamiento y los peces de control aislados. Algunos estudios evaluaron los cambios estructurales en el cerebro debido a la manipulación durante el desarrollo. Lindsey and Tropepe (2014) encontraron que el aislamiento social o la novedad social redujeron el número de células

proliferantes al tiempo que aumentaban el número de nuevas neuronas. DePasquale et al. (2016b) observó que los peces enriquecidos tenían un cerebro y telencéfalo más grandes.

Con respecto a los resultados relacionados con la eficacia biológica, algunos estudios informaron que el aislamiento durante el desarrollo aumentó el peso corporal y que el aumento se abolió después de 15 días de ECMI (FULCHER et al., 2017). Por el contrario, Lindsey and Tropepe (2014) no encontraron diferencias en los parámetros de crecimiento entre los animales criados en grupo y los criados en aislamiento. Sin embargo, una disminución en la longitud del cuerpo y el peso se describió para la novedad tras el aislamiento. Curiosamente, Spence et al. (2011) encontraron que los peces criados en entornos estructuralmente complejos eran más pequeños que los criados en un entorno austero.

### **Impactos del enriquecimiento ambiental frente a condiciones estándar**

En general, las comparaciones entre condiciones enriquecidas (complejas) y empobrecidas (restringidas) fueron las manipulaciones ambientales más comunes (31 de 56 estudios) revisadas. Al igual que en otras revisiones (FIFE-COOK & FRANKS, 2019; NÄSLUND & JOHNSON, 2016b; TONI, MANCIOCCO, et al., 2019), las manipulaciones examinadas aquí se han centrado en factores clave identificados para reducir los impactos negativos del estrés y mejorar la calidad de vida. En la Tabla 3 se enumeran las principales características del enriquecimiento ambiental y las condiciones estándar (insumos de recursos) utilizadas en los estudios examinados.

El EA abarcó la exposición a estimulación física, sensorial, cognitiva y social más alta que la recibida en condiciones de alojamiento estándar (AE). El enriquecimiento más común (16 estudios) ha sido la adición de complejidad estructural compuesta de estructuras físicas (piedras, rocas, grava, plantas vivas y de plástico, piedras de aire, arena, ollas de arcilla, imágenes de soporte de papel y objetos artificiales). Dicho enriquecimiento se llevó a cabo de muchas maneras, desde la presentación de artículos simples como pilares de plástico (WILKES et al., 2012) a combinaciones más naturalistas y complejas (SCHROEDER et al., 2014) de los diversos objetos mencionados anteriormente.

Los factores sensoriales (7 estudios) involucraban diferentes fondos, colores, estimulación auditiva, provisión concomitante de sombra y flujo de agua con enriquecimiento estructural o flujo de agua solamente. La estimulación cognitiva (3 estudios) se realizó añadiendo novedad, recompensas alimentarias y previsibilidad de la recompensa alimentaria. Las manipulaciones sociales se evaluaron por separado o en conjunto con el enriquecimiento

estructural o con los factores estresantes del alojamiento y la cría. Estos incluyeron: diferentes densidades (6 estudios) y ratios sexuales (1 estudio), alojamiento en grupo vs. aislamiento (6 estudios), contacto visual vs olfativo (1 estudio) y comparaciones entre viviendas individuales, en pareja y en grupo (2 estudios).

La duración de los protocolos de enriquecimiento y condiciones estándar revisados fue muy variable, desde una exposición rápida de 5 minutos en la cámara de ensayo (WEBER; GHORAI, 2013) hasta 9 meses y dos semanas (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018a). Algunos autores informaron que el pez cebra prefería el enriquecimiento estructural a los ambientes estériles (DEPASQUALE et al., 2019; KISTLER et al., 2011; SCHROEDER et al., 2014) y el alojamiento en grupos en lugar de plantas artificiales (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015a). Sin embargo, el pez cebra no mostró preferencia por un refugio que proporcionaba sombra al tanque o plantas artificiales sobre áreas abiertas (JONES et al., 2019). Asimismo, C. J. Reolon et al. (2018) no encontraron diferencias en la preferencia por el enriquecimiento sobre un ambiente estéril.

Sobre todo, el enriquecimiento físico-sensorial y cognitivo fue capaz de reducir los comportamientos relacionados a la ansiedad, como lo demuestran varios autores que reportaron que el enriquecimiento estructural generó una reducción en la geotaxis (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015a; LEE; PAULL; TYLER, 2018; SOARES et al., 2020), escototaxis (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015a; MANUEL et al., 2015c) y locomoción (VON KROGH et al., 2010), en comparación con las condiciones estériles. La provisión de flujo de agua (ejercicio) (DEPASQUALE; LERI, 2018), música (BARCELLOS et al., 2018) y el confinamiento en un fondo blanco (ROSEMBERG et al., 2011) también fueron capaces de reducir la geotaxis. Sin embargo, al agregar uno o dos artículos de enriquecimiento (una planta de plástico y papel de respaldo), Woodward et al. (2019) no encontraron diferencias para la tigmotaxia y la locomoción, y al usar pilares de plástico, Wilkes et al. (2012b) incluso encontraron un incremento en la geotaxis, sin diferencias en la locomoción.

Curiosamente, Marcon (2018b) informó que el EA aumentó la geotaxis en peces no estresados, pero atenuó y redujo el aumento en la geotaxis producida por el ECI. Además, Barcellos et al. (2018) mostraron que la música redujo la locomoción en la prueba de claro/oscuro pero la aumentó en la prueba de tanque novedoso.

El enriquecimiento social ha mostrado impactos más variables en los comportamientos relacionados a la ansiedad. Sorprendentemente, Shams et al. (2015)

informaron que el aislamiento social durante 90 días redujo la tigmotaxia y Parker et al. (2012) que el aislamiento durante dos semanas redujo la geotaxis. Por el contrario, Shams et al., (2017) encontraron que el aislamiento agudo (24 horas) o crónico (6 meses) no producía diferencias en la ansiedad (geotaxis y ángulo de giro) o locomoción. White et al. (2017) encontró la geotaxis más baja para peces alojados en grupo, niveles intermedios en los peces aislados y la geotaxis más alta y movimientos erráticos más elevados en los peces alojados en parejas. También describieron que el alojamiento en grupo tenía un efecto protector contra el dolor (recorte de aletas), ya que los peces alojados en grupo reanudaban los comportamientos normales más rápidamente que los peces aislados, y peces alojados en parejas ni siquiera volvían a los niveles de pretratamiento (WHITE et al., 2017). Parker et al. (2012) sugirieron que la dinámica social influye en la geotaxis, ya que los peces de las viviendas colectivas pasaron el mayor tiempo en la parte inferior, mientras que los peces de las viviendas pareadas con contacto o solo con contacto visual mostraron niveles intermedios de geotaxis, seguido por peces alojados en pares solo con contacto olfativo y los peces aislados que pasaron el menor tiempo en la parte inferior. No se reportaron diferencias para el cardumen (SHAMS et al., 2017) o la locomoción (SHAMS et al., 2017; SHAMS; CHATTERJEE; GERLAI, 2015) como consecuencia del aislamiento.

Con respecto a otros comportamientos, los autores informaron que el enriquecimiento estructural redujo la latencia para alimentarse (SURIYAMPOLA et al., 2016a; VON KROGH et al., 2010) y describieron impactos contradictorios de los diferentes tipos de EA sobre la agresión, la exploración de cardumén y el aprendizaje. Por ejemplo, la vegetación (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015), el flujo de agua (SURIYAMPOLA et al., 2016a), los pilares de plástico (WILKES et al., 2012), las plantas de plástico y un fondo de papel (WOODWARD; WINDER; WATT, 2019) aumentaron la agresión. Por el contrario, el enriquecimiento cognitivo mediante la adición de novedad redujo (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018a) o no mostró diferencias en la agresión (LEE; PAULL; TYLER, 2018). De manera similar, Weber and Ghorai (2013) mostraron que la provisión de refugio reducía los comportamientos agonísticos en peces a los que se le suministro Pb2 + durante el desarrollo. El estatus dominante influyó en las preferencias de enriquecimiento (LEE; PAULL; TYLER, 2018; SCHROEDER et al., 2014); la monopolización de los recursos y otras dinámicas sociales podrían explicar el aumento de la agresión en algunos estudios (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b; LEE; PAULL; TYLER, 2018).

Los resultados del enriquecimiento estructural sobre la formación de cardumen fueron bastante heterogéneos. Si bien algunos autores no encontraron diferencias en el

cardumen entre condiciones enriquecidas y estériles (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015; KISTLER et al., 2011; WILKES et al., 2012), otros informaron una reducción (SURIYAMPOLA et al., 2016a) o un incremento (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018a) en la cohesión del cardumen debido al enriquecimiento estructural, aparte del aumento de cardumen elevado en ambientes muy enriquecidos (seminaturales) (FRANKS; GRAHAM; VON KEYSERLINGK, 2018).

Considerando la exploración, al agregar enriquecimiento estructural, algunos autores no encontraron diferencias en este comportamiento (KISTLER et al., 2011; WILKES et al., 2012). Sin embargo, el enriquecimiento estructural (MANUEL et al., 2015b) y la previsibilidad de la entrega de alimentos (HOLLEY et al., 2014) indujeron un comportamiento más exploratorio, independiente del nivel de ración, la edad, las interacciones sociales o la predisposición genética subyacente.

Sorprendentemente, solo tres estudios evaluaron los efectos del EA en el aprendizaje y demostraron que proporcionar un enriquecimiento alimenticio (*Artemia* como recompensa) (MANUEL et al., 2015c) o el enriquecimiento estructural reducían el aprendizaje de evitación inhibitoria (MANUEL et al., 2015b) y aumentaban las habilidades espaciales en un laberinto (SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011).

En cuanto a las respuestas fisiológicas, los efectos del EA sobre el cortisol fueron muy variables. Mientras que von Krogh et al. (2010) encontraron niveles más altos en peces de ambientes enriquecidos, otros no encontraron diferencias para la música (BARCELLOS et al., 2018) o el enriquecimiento estructural (MARCON et al., 2018a; WILKES et al., 2012) en los niveles de cortisol. Además, Marcon et al., (2018b) encontraron que un protocolo de ECI aumentaba los niveles de cortisol en animales alojados en condiciones estándar mientras que estos niveles eran atenuados en peces alojados en ambientes enriquecidos. Una respuesta muy similar fue reportada en el mismo artículo para las especies reactivas de oxígeno.

Las comparaciones del enriquecimiento social sobre el cortisol también fueron bastante contradictorias. Algunos autores (PARKER et al., 2012a; SHAMS et al., 2017) mostraron que los peces alojados individualmente tienen niveles de cortisol basal más bajos que los alojados en grupo; sin embargo, White et al., (2017) encontraron que el cortisol era significativamente más alto entre los peces alojados en parejas que entre los alojados individualmente o en grupo.

Algunos artículos examinaron la influencia de la dinámica social y el enriquecimiento en los niveles de cortisol. Por ejemplo, Giacomini et al. (2015) reportaron niveles de cortisol más altos en los peces alojados en grupos que en los aislados, en respuesta a la persecución con red y el tanque novedoso. Giacomini et al. (2016) reveló que, aunque un factor estresante agudo aumentaba los niveles de cortisol en grupos de peces cebra alojados en un ambiente estéril, en aquellos peces alojados individualmente con enriquecimiento la respuesta de cortisol disminuía frente a los factores estresantes agudos antes mencionados. Para peces mantenidos en parejas después de cinco días, Keck et al. (2015) encontraron que el cortisol era más alto en parejas con vegetación que en alojamiento individual o parejas sin vegetación. Sin embargo, para el día 10, las relaciones estaban invertidas: los pares sin vegetación y los peces aislados tenían niveles de cortisol más altos que los pares con vegetación. Adicionalmente, se reportó que la introducción de un pez estresado también puede provocar una respuesta de cortisol en los peces residentes, como se muestra por Giacomini et al. (2015).

Muy pocos estudios (solo dos) evaluaron los cambios neuronales debido al EA. Shams et al. (2015) encontraron disminución de los niveles de serotonina en peces aislados, pero sin diferencias en los niveles de dopamina y los metabolitos de estos neurotransmisores 5HIAA y DOPAC. Shams et al. (2017) encontraron niveles elevados de serotonina cuando los peces fueron expuestos a un estímulo social después de un aislamiento agudo y una disminución en 5HIAA, dopamina, y DOPAC después de un aislamiento agudo y crónico. Asimismo, solo cuatro estudios evaluaron la neurogénesis y la expresión génica debido al EA, con resultados contradictorios. Algunos estudios informaron que el EA generó niveles más altos de PCNA (VON KROGH et al., 2010), BDNF (BARCELLOS et al., 2018) y proporciones elevadas de  $nr/gr\alpha$  y  $gr\beta/gr\alpha$  (MANUEL et al., 2015b), mientras que otros encontraron que en peces alojados con EA los niveles de PCNA, diferenciación neurogénica, *cart4* (MANUEL et al., 2015b), *crf* y *cnr1* (MANUEL et al., 2015b, 2015c) eran más bajos que en los peces con alojamiento sin EA.

En cuanto a los resultados relacionados a la eficacia biológica, Barcellos et al. (2018) mostraron que el EA disminuyó la expresión de  $IL-1\beta$  e  $INF-\gamma$  pro-inflamatorias, pero no afectó a  $IL-4$ ,  $IL-10$  y  $TNF-\alpha$ . Los efectos evaluados sobre el crecimiento fueron contradictorios, donde algunos autores (LEE; PAULL; TYLER, 2018; VON KROGH et al., 2010) no encontraron diferencias entre EA y condiciones estériles. Mientras que otros, Woodward et al. (2019) encontraron peces más pesados en condiciones de enriquecimiento leve que con enriquecimiento elevado. Por otra parte, Spence et al. (2011) encontraron peces más

pequeños en ambientes enriquecidos que en condiciones estériles. En cuanto a la reproducción, algunos autores (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015; LEE; PAULL; TYLER, 2018) no encontraron efectos del EA sobre el rendimiento reproductivo, aunque Woodward et al. (2019) encontraron que los peces de los tanques de de enriquecimiento leve produjeron más huevos que aquellos alojados en tanques de control o tanques altamente enriquecidos. Sin embargo, no se observaron diferencias en la proporción de óvulos fecundados entre tratamientos. Por último, un estudio (KECK et al., 2015) informó que el EA redujo la morbilidad y la mortalidad debido a la agresión en peces alojados en parejas.

### **Factores de estrés relacionados con la cría y el alojamiento en acuarios estándar**

Se examinaron 10 de 56 estudios que evaluaron condiciones de alojamiento y cría que los peces normalmente enfrentan durante su ciclo de vida y se cree producen bajos niveles de estrés. Estas circunstancias incluyeron algunos de los factores estresantes mencionados para ECI y otros estímulos tales como vibraciones, diferentes colores de fondo, diferentes tipos e intensidad de luz, luz apagada de día, luces encendidas de noche, exposición al espectro de luz azul o roja, la introducción de plantas y peces de plástico, agua correntosa, aumento y disminución de pH y adición de extracto de alimentos. Estos estudios tuvieron una duración de 20 minutos (STEWART et al., 2015) a 3 meses (CASTRANOVA et al., 2011). En la Tabla 4 se presentan las principales características de manejo del acuario (aportaciones de recursos) utilizadas por los estudios examinados.

Los estresores de bajo nivel que normalmente se encuentran en un acuario fueron capaces de aumentar los comportamientos relacionados con la ansiedad, dependiendo de la duración y el tipo de factor estresante. Pavlidis et al. (2015) encontraron un aumento en la geotaxis, locomoción y cohesión del cardumen en peces expuestos a factores estresantes crónicos relacionados con el acuario (12 días). Sin embargo, no revelaron diferencias en los peces sometidos a factores estresantes agudos. Cuando se analizan individualmente, cada factor de manejo y alojamiento evaluado influyó de manera diferente sobre el aprendizaje, la agresión y el cardumen. Por ejemplo, Gronquist y Berges (2013) no encontraron diferencias en la agresión en peces expuestos a diferentes densidades de población, iluminación, privación de alimentos o extracción de agua. Sin embargo, Pavlidis et al. (2013) encontraron que la densidad de población juega un papel importante en la expresión del comportamiento agresivo en los machos mantenidos en 1 litro de agua. En su estudio, las densidades de 3 peces/L presentaron los números más altos de comportamientos agonísticos; 4 y 5 peces/L presentaron niveles más bajos que tres peces/L; 6 peces/L casi no presentaron agresión, y diez peces/L no presentaron

comportamientos agonísticos. Además, las altas densidades de población también podrían masculinizar el pez cebra domesticado, esto probablemente mediado por el cortisol a través de la respuesta al estrés (RIBAS et al., 2017b).

La temperatura también ejerció una influencia significativa en los comportamientos. En comparación con peces alojados a 26 °C, peces alojados a 18 °C tenían un nivel de actividad más bajo y peces alojados a 34 °C una locomoción más alta (TONI et al., 2019b). Además, los peces alojados a 18 °C y 34 °C muestran un deterioro de las capacidades cognitivas durante el laberinto Y, en comparación con los alojados a 26 °C (ANGIULLI et al., 2020). Por último, en contraste con los alojados a 34 °C, peces alojados a 26 °C presentaron menos geotaxis, escototaxis, congelación y formación de cardumen y más locomoción y agresión (ANGIULLI et al., 2020).

En cuanto a las respuestas fisiológicas, la diferencia en el cortisol parecía depender de la duración e intensidad de los factores estresantes. Por ejemplo, Pavlidis et al. (2015a) encontraron niveles elevados de cortisol para los factores estresantes ambientales y de crianza de alto grado a largo plazo, pero no encontraron diferencias para los factores estresantes de bajo grado a largo plazo. Por lo general, el hacinamiento y los factores estresantes del manejo elevan los niveles de cortisol (PAVLIDIS et al., 2013; PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015; RAMSAY et al., 2009); sin embargo, Gronquist y Berges (2013) no encontraron diferencias para el hacinamiento, diferentes luces o vibraciones. Encontraron un aumento solo en el cortisol y las proteínas de choque térmico en peces expuestos a privación de alimentos.

Además, se observaron algunos cambios específicos en relación con el hacinamiento y el trasfondo. No hubo diferencia en el cortisol de peces cebra mantenidos en 2, 5, 10 o 20 peces por 0.5 L, ni en los mantenidos en diferentes volúmenes de agua disponibles (10 peces por 0.25, 0.5, y 1 L). Sin embargo, el hacinamiento resultó en mayores concentraciones de cortisol que los controles (0,2 peces/L), excepto para los peces mantenidos en diez peces por 2 L. Además, los peces expuestos a fondos más brillantes (verde y blanco) presentaron mayores concentraciones de cortisol que los peces expuestos a un acuario negro o transparente (PAVLIDIS et al., 2013).

Solo dos estudios evaluaron los cambios neuronales relacionados con los factores de estrés de vivienda y manejo, con Pavlidis et al. (2015a) sugiriendo que los factores de estrés de alto grado a largo plazo regularon varios genes relacionados con el estrés, incluyendo el factor liberador de corticotropina, crf, pro-opiomelanocortina, pomc, receptor glucocorticoide,

gr, prolactina, prl, hiporetina/orexina, hcrt, factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF y c-fos. Este último fue ascendentemente regulado para peces expuestos al estrés a largo plazo, independientemente de la intensidad del factor estresante, en comparación con los controles. Toni et al. (2019a) encontraron que las proteínas asociadas con sinapsis y liberación de neurotransmisores se redujeron a 18 °C y 34 °C.

En cuanto a los resultados relacionados con la eficacia biológica, los factores estresantes durante la cría aumentaron la mortalidad acumulada en peces infectados con *Mycobacterium* spp. (RAMSAY et al., 2009). Además, la supervivencia se relacionó inversamente con la densidad de cría, presentándose menor supervivencia en las densidades más altas que en las más bajas (RIBAS et al., 2017b). Por último, la ganancia de peso, la tasa de crecimiento específico y la ganancia de longitud para 5 peces/2 litros y 15 peces/2 litros fueron superiores a 25,34 y 45/2 litros (RABBANE et al., 2017).

### **Personalidad, línea genética e influencias sexuales sobre el estrés y la calidad de vida en el pez cebra**

#### **Influencia de la personalidad sobre el estrés y la calidad de vida**

Veintidós estudios evaluaron diferencias individuales en rasgos fenotípicos estables, incluyendo audacia, comportamiento exploratorio, agresión, sociabilidad y actividad locomotora. Se utilizaron varias pruebas para medir la pertenencia a los rasgos, a saber, campo abierto (10 estudios), tanque novedoso (4 estudios), prueba de emergencia (4 estudios), laberinto Y (1 estudio), latencia de alimentación (2), exposición a depredadores (1 estudio), cohesión del cardumen (2 estudios), exploración en el tanque de origen (1 estudio), búsqueda de refugio (2 estudios), latencia para explorar objetos (1 estudio) y prueba de actividad (1 estudio). Estas tareas se utilizaron para clasificar a los peces en una escala de un nivel superior a un nivel inferior en cada categoría, y típicamente sus rangos en una (17 estudios) o varias (5 estudios) categorías se utilizaron para dividir a los peces en dos grupos: proactivo y reactivo, o audaz y tímido. Los principales efectos de la personalidad sobre el estrés y la calidad de vida se describen en la Tabla 5.

Varios estudios han demostrado que el pez cebra posee respuestas de estrés conductual consistentes y divergentes a través de múltiples ensayos distintos (TRAN; GERLAI, 2013). En general, los individuos reactivos mostraron comportamientos similares a la ansiedad más altos que los proactivos (BAKER et al., 2018; TOMS; ECHEVARRIA, 2014; TUDORACHE et al., 2018; WONG et al., 2012; WONG; FRENCH; RUSS, 2019), y los

individuos proactivos eran más agresivos (TUDORACHE et al., 2018; YUAN et al., 2018). Del mismo modo, las covariaciones entre estos patrones de comportamiento y las respuestas fisiológicas fueron evidentes para el cortisol basal (TUDORACHE; SCHAAF; SLABBEKOORN, 2013) y los niveles de cortisol después de un desafío (TUDORACHE; SCHAAF; SLABBEKOORN, 2013; WONG; FRENCH; RUSS, 2019), aunque no se encontraron diferencias por (Oswald et al., 2012) entre animales audaces y tímidos con respecto a los niveles de cortisol.

Además, Tudorache et al. (2018) encontraron que el ritmo diurno de los niveles de actividad, el cortisol y la melatonina siguen diferentes patrones en individuos audaces y tímidos. Los peces audaces tenían niveles máximos de actividad más altos (especialmente en las primeras horas de la fase de luz) y un rango de actividad más completo que los peces tímidos. Además, en los animales audaces, la melatonina y el cortisol fluctuaron significativamente durante el día, mientras que los individuos tímidos regularmente tenían valores altos de cortisol y melatonina intermedia, sin ritmo detectable. Además, la rítmica del pez audaz disminuyó cuando se le desafió con condiciones de luz constantes, mientras que la rítmica de los individuos tímidos permaneció inalterada.

Los estudios revisados reportaron un impacto significativo de la personalidad en el aprendizaje, aunque algunos describieron resultados contradictorios. Por ejemplo, Baker y Wong (2019) mostraron que los peces reactivos tenían una adquisición más rápida de memoria de miedo (asociación de señal de alarma) y un recuerdo más fuerte cuatro días después del condicionamiento que los peces proactivos. Por el contrario, Kareklas et al. (2018) encontraron que el aprendizaje no estaba relacionado con las diferencias de personalidad dentro de los cardúmenes; también encontraron que las decisiones de grupo requerían un acuerdo entre diferentes personalidades. Los cardúmenes con mayor variación de audacia eran más propensos a dividirse durante los ensayos de entrenamiento y tomaban más tiempo para alcanzar una decisión colectiva. Asimismo, Vital y Martins (2013) no encontraron diferencias entre individuos sociales y no sociales en el aprendizaje de evitación. Sin embargo, mostraron que los grupos con individuos sociales experimentados escaparon más rápido que los grupos con individuos no sociales experimentados. Stewart et al. (2013) no encontraron diferencias en la habituación en el tanque novedoso o el campo abierto entre peces audaces y tímidos.

Las interacciones entre personalidad y dinámica social fueron exploradas con resultados contradictorios. Zajitschek et al. (2017) no encontraron ninguna relación significativa entre la audacia y el rango de dominancia, aunque el rango de dominancia afectó

la actividad de la descendencia. Sin embargo, Dahlbom et al. (2011) revelaron que la audacia podría usarse para predecir la dominancia y el estatus subordinado. Además, solo un estudio evaluó los efectos de la personalidad en la preferencia por un entorno o situación. Rey et al. (2015) postularon que si se les da la opción de seleccionar temperaturas que van desde 21C° a 35 C°, los peces proactivos muestran una clara preferencia por temperaturas más altas y peces reactivos para temperaturas más bajas con una ventana térmica más amplia.

Con respecto a los cambios neurobiológicos, varios estudios reportaron influencias clave de la personalidad en la regulación génica y los neurotransmisores. Tran et al. (2016) no encontraron diferencias en dopamina o DOPAC entre peces hiperactivos e hipoactivos, pero los animales hipoactivos exhibieron niveles de serotonina cerebral más altos que los hiperactivos. Para la regulación de genes, Oswald et al. (2012) encontraron que los peces audaces tenían una expresión significativamente menor de genes que regulan la producción de hormonas del estrés (*crh* y *11β-hsd*), (*grs*) y BDNF que los individuos tímidos. Sin embargo, Tudorache et al. (2013) no pudieron confirmar las diferencias para *grα* y *grβ* y *mr*. Además, los peces audaces tenían una expresión más alta de receptores de dopamina D2 y receptores de opioides delta *drd2a*, *drd2b* y *opr1b* que los peces tímidos (THÖRNQVIST et al., 2019b). Tudorache et al. (2018) reportaron que la expresión de 1478 genes involucrados en la regulación del reloj biológico difería significativamente entre peces audaces y tímidos.

Algunos autores han demostrado que los resultados relacionados con la eficacia biológica también estaban bastante influenciados por la personalidad. Por ejemplo, los peces proactivos mostraron una tasa metabólica estándar, tasa metabólica máxima (YUAN et al., 2018), y rendimiento de arranque rápido (respuesta durante los encuentros con depredadores) (KERN et al., 2016) más altas que los peces reactivos. Influencias de la personalidad sobre la masa (OSWALD et al., 2012), longitud estándar (KERN et al., 2016; OSWALD et al., 2012; VARGAS et al., 2018) y peso (VARGAS et al., 2018) no fueron observadas. Sin embargo, Roy and Bhat (2018a) encontraron que los peces más pequeños eran más audaces y menos activos, mientras que los peces más grandes eran más cautelosos y activos.

El impacto de la personalidad sobre la reproducción también fue evidente. Por ejemplo, Ariyomo y Watt (2012) observaron que los machos más audaces y agresivos fertilizaban más huevos que los individuos tímidos. Sin embargo, no observaron diferencias en el número total de huevos entre peces proactivos y reactivos. Los animales proactivos parecían tener un mayor éxito reproductivo. Vargas et al. (2018) encontraron un mayor porcentaje de viabilidad de

desove, mayor supervivencia total y tasas de crecimiento en etapas larvarias en peces proactivos.

### **Influencia de la línea genética en el estrés y la calidad de vida**

Diez estudios examinaron las influencias del linaje sobre el estrés y la calidad de vida. En estos estudios quedó claro que el pez cebra presentaba importantes diferencias de comportamiento y fisiología entre líneas genéticas y entre líneas silvestres y domésticas. Los efectos significativos de las líneas genéticas sobre el estrés y la calidad de vida se describen en la Tabla 6. En general, la generación f1 de peces salvajes presentó menor actividad y un comportamiento más tímido que las líneas AB y speigeldanio (spd), y los linajes AB y spd tuvieron una audacia similar, aunque las diferencias de audacia relacionadas con la cepa variaron entre ensayos (MUSTAFA; ROMAN; WINBERG, 2019).

Además, varios estudios informaron varias diferencias de comportamiento entre líneas domésticas. Los peces AB presentaron un patrón diurno, mientras que los peces Tuebingen (TU) realizaron una actividad más uniformemente distribuida durante el día y la noche (VIGNET et al., 2013). TU parecía menos ansioso que AB, como lo demuestra su menor geotaxis, mayor locomoción y recuperación más rápida después de un estresor luminoso (VIGNET et al., 2013). Del mismo modo, la línea Leo presentó más comportamientos similares a la ansiedad (Geotaxis and Escototaxis) que el cola larga de tipo salvaje (WT) (MAXIMINO et al., 2013). Además, Quadros et al. (2016) reportaron diferentes respuestas entre líneas Leo y WT cola corta no estresadas y estresadas (sustancia de alarma) y entre pruebas. En la prueba de cilindros, encontraron que la línea Leo era más ansiosa para peces no estresados o estresados (latencia hacia arriba, movimientos erráticos y geotaxis) que la WT. En el tanque novedoso y la prueba declaro/oscurito, la WT no estresada era menos ansiosa (geotaxis y escototaxis) que la Leo. Sin embargo, cuando estaban estresados, la WT fue más ansiosa (congelación, movimientos erráticos, geotaxis y escototaxis) que la Leo. Sackerman et al. (2010) informaron que la WIK tenía menos geotaxis que la AB y esta última pasó más tiempo congelada en un laberinto en cruz que las PETCO o GloFish®.

También existen diferencias significativas entre las líneas sobre el aprendizaje. Por ejemplo, en el estudio de Gorissen et al. (2015), mientras que los peces Tupfel cola larga (TL) mostraron un rápido aprendizaje de evitación, los peces AB no pudieron aprender esta tarea. Sin embargo, un estudio informó que las líneas genéticas AB, TU y TL podían adquirir condicionamiento por miedo, pero TU tenía una tasa de extinción más rápida que AB y TL.

Vignet et al. (2013) encontraron que AB tenía un mejor rendimiento de aprendizaje de color que TU. Curiosamente, el entorno y la personalidad interactúan con el aprendizaje, aunque solo un estudio analizó esto. Roy et al. (2019) sugirieron que los peces de poblaciones capturadas en estado salvaje y los peces de poblaciones domésticas tenían diferentes preferencias de color; mientras que el primero exhibió capacidades de aprendizaje inverso, el segundo no.

En cuanto a las respuestas fisiológicas, las líneas genéticas AB y TL difieren en la actividad del eje HPI. En comparación con TL, AB tenía niveles de cortisol basal más altos, mostró mayor crf cerebral, gr-beta, BDNF, pcna, neurod1, cart4, igf1, soc3a, expresiones de mpeg 1.1 y 1.2, y no aumentó los niveles de cortisol debido a una prueba de evitación inhibitoria (GORISSEN et al., 2015). Asimismo, la expresión de marcadores moleculares relacionados con el crecimiento después del ayuno como desafío metabólico fue muy diferente cuando se hicieron comparaciones entre seis líneas genéticas de tipo silvestre: PET, TU, TL, AB, SJA y WIK. El ayuno resultó en una disminución de los niveles de glucosa en sangre en AB, PET, TL y TU, pero no afectó estos niveles en las líneas genéticas SJA y WIK. Del mismo modo, el ayuno no afectó los niveles de ARNm miostatina en AB, PET, TU y WIK, pero disminuyó los niveles de miostatina-1 y 2 ARNm en SJA (MEYER et al., 2013).

Solo un estudio evaluó las diferencias en los neurotransmisores entre las líneas. Maximino et al. (2013) informaron de que Leo tenía niveles más bajos de serotonina, un mayor recambio de serotonina y una actividad de la monoamino oxidasa ligeramente superior a la de WT longfin.

### **Efectos del sexo en el estrés y la calidad de vida**

Aunque las influencias del sexo no se consideraron inicialmente en el ámbito de esta revisión, encontramos varias diferencias entre sexos que merecen ser mencionadas. Por ejemplo, varios estudios encontraron que las hembras eran más osadas (DAHLBOM et al., 2011; OSWALD et al., 2012), menos ansiosas (AMPATZIS; DERMON, 2016; SOARES et al., 2020) y agresivas (ARIYOMO; WATT, 2015; DAHLBOM et al., 2012) que los machos. Oswald et al. (2012) informaron de que las hembras eran más grandes que los machos y presentaban niveles significativamente más bajos de cortisol (OSWALD et al., 2012; RAMBO et al., 2017; REOLON et al., 2018; WONG; FRENCH; RUSS, 2019), niveles más altos de glucosa en sangre (OSWALD et al., 2012) y una respuesta de rendimiento de inicio rápido más sólida (KERN et al., 2016). También diferían significativamente en la expresión de varios genes relacionados con el estrés en el cerebro (OSWALD et al., 2012). Además, las preferencias por

los elementos de EA se vieron influenciadas por el género (SCHROEDER et al., 2014) así como por los efectos de EA en la condición corporal; las hembras de los tanques enriquecidos tenían una condición corporal más alta que las hembras de los tanques sin enriquecimiento, pero este no era el caso de los machos (LEE; PAULL; TYLER, 2018).

La frecuencia de los comportamientos relacionados con la ansiedad también difería entre los sexos. Los machos presentaron menos geotaxis y congelación (WONG et al., 2012), y más locomoción (REOLON et al., 2018; WONG; FRENCH; RUSS, 2019), agresión (RAMBO et al., 2017) y formación de cardumen (ROY; BHAT, 2018a) que las hembras. Se describieron interacciones entre el sexo y la personalidad. Las hembras de alta actividad tenían menos geotaxis que las de baja actividad, mientras que los machos no mostraban esa relación (TRAN; GERLAI, 2013). Del mismo modo, se observaron interacciones entre la línea y el sexo. Los machos AB tenían más escototaxis que los capturados en libertad y los speigeldanio, y en esta cepa, los machos tenían menos geotaxis que las hembras (MUSTAFA; ROMAN; WINBERG, 2019). Los machos PN influyeron en la respuesta basal del grupo a un estímulo aversivo, mientras que no se describieron diferencias de sexo en la cepa de Scientific Hatcheries (VITAL; MARTINS, 2013).

Los efectos del sexo fueron evidentes al realizar segregación sexual. El peso de los peces segregados sexualmente era mayor y su cortisol menor que el de los animales sin segregar (sexo mixto), y las hembras segregadas sexualmente presentaban una memoria que persistía más tiempo y podía restablecerse más rápidamente (REOLON et al., 2018). Además, las hembras segregadas sexualmente parecen ser más ansiosas que los machos (AMPATZIS; DERMON, 2016; SOARES et al., 2020).

El sexo influye considerablemente las MA, sin embargo, algo que generalmente se pasa por alto es que la diferenciación del sexo en el pez cebra es más compleja de lo que se pensaba. Parece que su mecanismo genético de determinación de sexo es muy sensible a los factores ambientales (SANTOS; LUZIO; COIMBRA, 2017). Por ejemplo, la baja temperatura afecta al crecimiento, así como a la diferenciación y maduración de las gónadas, mientras que la alta temperatura induce un efecto contrario (LUZIO et al., 2016). Además, la proporción de sexos puede estar sesgada hacia los machos cuando el pez cebra está expuesto a altas temperaturas (ABOZAID; WESSELS; HÖRSTGEN-SCHWARK, 2012; BROWN et al., 2015; LUZIO et al., 2016; RIBAS et al., 2017a), hipoxía (ROBERTSON et al., 2014), altas densidades (LIEW et al., 2012; RIBAS et al., 2017b) y niveles bajos de alimentación (LAWRENCE; EBERSOLE; KESSELI, 2007).

Del mismo modo, la proporción de sexos afecta a la territorialidad de los machos y a comportamientos específicos como la agresión y el cortejo (GRONQUIST AND BERGES, 2013), pero a menudo se pasa por alto.

## **Discusión**

En el presente estudio, revisamos y resumimos sistemáticamente los hallazgos actuales sobre la respuesta al estrés y la calidad de vida del pez cebra a causa de diferentes MA y las posibles influencias de las variaciones intraespecíficas (personalidad, linaje y sexo) en los resultados. Las MA han inducido con éxito una serie de estados emocionales en el pez cebra y han influido en varios aspectos de su biología, como se refleja en los diversos fenotipos conductuales, neurofisiológicos y morfológicos en respuesta a una amplia gama de estímulos y factores de estrés. Estos factores hacen de la MA en el pez cebra un excelente modelo complementario de los trastornos afectivos y la calidad de vida.

Basándonos en los manuscritos revisados, destacamos tres aspectos críticos a tener en cuenta en la investigación actual sobre las MA. En primer lugar, el aumento de la complejidad de las intervenciones, junto con la mejora de la estandarización de los protocolos, reduciría la variabilidad de los resultados y mejoraría la investigación traslacional de las MA. En segundo lugar, en la misma línea, las características intrínsecas y las diferencias individuales del pez cebra deben ser comparadas y consideradas a la hora de interpretar los resultados de las MA. Por último, en lugar de formar parte de un fenómeno diferente, el EA puede actuar como un estresor leve en un espectro entre el exceso ECI y la escasa intensidad o baja estimulación del estrés (acuuario estándar actual). La consideración de esta noción donde el EA actúa como un estresor leve y las comparaciones directas de diferentes niveles de estimulación (modelos de ansiedad, enriquecimiento ambiental, estresor relacionado con el acuario) aclararían las propiedades de un MA que son importantes para aumentar la resiliencia al estrés. Esto, a su vez, ayudaría a mejorar nuestras normas actuales de cría y los datos de referencia para estudiar los trastornos relacionados con el estrés.

## **Características importantes en los procesos de cría y experimentación que pueden alterar los resultados**

La estandarización de los procedimientos de cría y experimentales es esencial para las MA, especialmente a la luz de la preocupación por los fracasos traslacionales y los problemas de replicación de las investigaciones publicadas (GERLAI, 2019; KORTZFLEISCH et al., 2020; LIEGGI et al., 2019) y la participación de diferentes laboratorios en enfoques

multidisciplinarios (FARES et al., 2013; ZABEGALOV et al., 2018). Sin embargo, los artículos revisados evidenciaron varias modificaciones en los aparatos de prueba, los puntos finales y los procedimientos experimentales entre los grupos de laboratorios para el mismo tipo de pruebas. Además, se observaron varias diferencias en parámetros importantes de cría.

Por ejemplo, varias variaciones en los protocolos de evitación inhibitoria (EI) dificultan la aclaración de los efectos de las MA en el aprendizaje (MANUEL et al., 2014; PIATO et al., 2011a, 2011b; REOLON et al., 2018). Estas modificaciones ponen en duda la fiabilidad de esta prueba para medir los procesos de aprendizaje y memoria debidos a MA en el pez cebra. Como era de esperar, los efectos en el aprendizaje utilizando EI fueron muy variables para las intervenciones aparentemente iguales (MANUEL et al., 2014; PIATO et al., 2011b) y no se encontraron diferencias para MA aparentemente antagonistas (MANUEL et al., 2014, 2015b, 2015c). Se produjeron variaciones similares para otras mediciones fisiológicas y pruebas de comportamiento.

En cuanto a la cría, la densidad de población fue el parámetro de alojamiento que más varió entre las MA revisadas. Las densidades de población inadecuadas y los entornos posiblemente estériles fuerzan el contacto social y no permiten a los individuos evitar las interacciones sociales negativas (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b). Por lo tanto, esta característica puede explicar varios resultados confusos, particularmente en las manipulaciones sociales, pero rara vez se consideró esto al interpretar los resultados.

Definir lo que constituye una densidad óptima es de primordial importancia, ya que el pez cebra suele alojarse en pequeños tanques con altas densidades (GERLAI, 2019). Sin embargo, la relación entre el número de peces por unidad de volumen de agua, el flujo de agua y el estrés puede no ser directa ni intuitiva (LIEGGI et al., 2019) y la literatura revisada no fue clara en cuanto a lo que constituye una densidad de población ideal. Solo un estudio examinó de forma exhaustiva y sistemática las densidades de población (PAVLIDIS et al., 2013), mientras que los demás sugieren arbitrariamente una determinada densidad de población como "alta" o "baja" (CASTRANOVA et al., 2011; GRONQUIST; BERGES, 2013; RABBANE et al., 2017; RIBAS et al., 2017b). Al contrario de lo que recomiendan las directrices actuales (ALESTRÖM et al., 2020), parece que el tamaño del tanque y el número de peces influyen por separado en el establecimiento de la territorialidad y la formación de jerarquías de dominancia (Pavlidis et al., 2013), lo que puede determinar los niveles de agresión y ansiedad. Son necesarios estudios similares para evaluar este parámetro en ambos sexos, diferentes linajes y personalidades, especialmente para los efectos de ansiedad y eficacia biológica.

Otras características de la cría que variaron ampliamente entre los artículos revisados incluyen factores comúnmente reportados como el ciclo de luz, la temperatura, la calidad del agua, la alimentación y los sistemas acuáticos. Sin embargo, falta un análisis detallado y sistemático de cómo los diferentes rangos de estas características para el alojamiento afectan a los resultados (ALESTRÖM et al., 2020; GERLAI, 2019; LIEGGI et al., 2019). Además, es importante señalar que hay muchas otras características y factores no reportados que aún no conocemos y que pueden alterar los resultados (GERLAI, 2019; LIEGGI et al., 2019).

Se ha recomendado una mayor estandarización de los procedimientos de cría y el intercambio de información de cría entre laboratorios (ALESTRÖM et al., 2020). Asimismo, se recomienda encarecidamente el uso de recursos para la planificación de experimentos con animales (PREPARE) (SMITH et al., 2018) y la elaboración de informes adecuados (ARRIVE) (SERT et al., 2020) para aumentar nuestro conocimiento sobre variables que normalmente están ausentes en las publicaciones. Además, muchos de los factores ambientales, genéticos, de sexo, de personalidad y sociales revisados junto con sus interacciones son algunos ejemplos interesantes de parámetros importantes a tener en cuenta. Entonces, estos factores deben ser examinados y reexaminados sistemáticamente (GERLAI, 2019; LIEGGI et al., 2019).

Las condiciones controladas rara vez están estandarizadas entre los laboratorios y, por lo tanto, pueden enmascarar una contribución a los resultados del tratamiento. Sin embargo, como se muestra en la siguiente sección, algunas manipulaciones parecen más propensas a los problemas de reproducibilidad y replicabilidad y, contrariamente a lo que se esperaba, la complejidad puede aumentar la robustez de las MA.

### **Las intervenciones complejas pueden mejorar la solidez de las MA**

Aunque las MA revisadas muestran un impacto dramático en las respuestas conductuales y fisiológicas de los peces cebra adultos y juveniles, los datos revisados fueron muy variables para algunas manipulaciones como la exposición a estresores agudos, las manipulaciones sociales y algunos elementos de enriquecimiento estructural. Como se mencionó anteriormente, las variaciones en los procedimientos experimentales y los protocolos de cría podrían explicar varias de las inconsistencias de estos resultados. Sin embargo, otras MA como el ECI y algunos tipos de EA (varios elementos naturalistas, estimulación sensorial y cognitiva) mostraron patrones consistentes en los comportamientos similares a la ansiedad y las respuestas neuro inmunes, a pesar de la naturaleza heterogénea del estímulo y de la variación

de los protocolos. Por lo tanto, parece que las MA complejas y de larga duración para estudiar el estrés y la calidad de vida son más robustas y menos propensas a las diferencias en los protocolos que las intervenciones simplistas y de corta duración.

Por ejemplo, el ECI es una manipulación compleja que es difícil de estandarizar (DEMIN et al., 2020a). Además, la naturaleza, la duración y la intensidad relativa de los factores de estrés variaron entre las baterías de estrés crónico revisadas. Asimismo, las condiciones de alojamiento, como la densidad de población, la temperatura del agua, el ciclo día/noche y otros ajustes importantes, difieren entre los protocolos (Tabla 1). Sin embargo, este paradigma ha presentado las respuestas conductuales, fisiológicas y neurológicas más consistentes entre las MA revisados. Los protocolos de ECI generalmente aumentan las respuestas conductuales y fisiológicas relacionadas a la ansiedad de los peces y varios genes involucrados en estas respuestas (por ejemplo, CHAKRAVARTY et al., 2013; PIATO et al., 2011b; SONG et al., 2018a). Aunque se necesita una mejor estandarización en los protocolos de los futuros estudios para tener en cuenta las variables de confusión, una batería compleja de manipulaciones estresantes diarias impredecibles de alta intensidad y una duración de más de 7 días parece representar un modelo fiable de estrés crónico en peces cebra jóvenes y adultos.

Del mismo modo, el EA generalmente consistió en paradigmas de larga duración con varias diferencias en los procedimientos de investigación y cría, lo que hace difícil sacar conclusiones uniformes entre los hallazgos. Sin embargo, algunos tipos de EA, como las combinaciones naturalistas y complejas de varios objetos, el enriquecimiento sensorial y la estimulación cognitiva (por ejemplo, COLLYMORE et al., 2015; CAROLE J. LEE et al., 2018; SOARES et al., 2020) en general expresaron patrones similares de reducción de las conductas de ansiedad, independientemente de los detalles técnicos (Tabla 3). Solo un estudio (WILKES et al., 2012) que utilizó un elemento muy simplista y poco natural mostró un aumento de las conductas similares a la ansiedad, aunque este efecto se evidenció solo durante el día 1 de enriquecimiento y luego desapareció durante los 7 días restantes del estudio. Por lo tanto, parece que el enriquecimiento fisiológico-sensorial y cognitivo en el pez cebra produce sistemáticamente el opuesto funcional de los paradigmas de ECI para los comportamientos.

Además, se han evidenciado respuestas neuro inmunes antagónicas entre ECI y EA, con ECI produciendo elevación de citoquinas proinflamatorias (KIRSTEN et al., 2021; SONG et al., 2018) y aumentando la expresión de la señalización HPI (CHAKRAVARTY et al., 2013; MANUEL et al., 2014; PIATO et al., 2011b) mientras que algunos EA (enriquecimiento sensorial y estimulación cognitiva) produjeron una reducción de los niveles de estas respuestas

(BARCELLOS et al., 2018; MANUEL et al., 2015c). Sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar el mecanismo múltiple y las interacciones que hay detrás de este aparente antagonismo en el pez cebra, ya que muy pocos estudios han evaluado los cambios neuronales e inmunológicos a causa de las MA.

Por el contrario, las manipulaciones agudas revisadas para modelar la ansiedad normalmente implicaban un episodio estresante único y de corta duración (Tabla 1). Estos paradigmas han dado lugar a resultados contradictorios sin patrones claros, incluso para el mismo tipo de estresor y duración. Por ejemplo, un protocolo aparentemente fácil de estandarizar como el uso de una red por 30 segundos como estresor no ha aumentado de forma fiable los niveles de cortisol en un estudio reciente (APONTE; PETRUNICH-RUTHERFORD, 2019), mientras que experimentos anteriores mostraron lo contrario (TRAN; CHATTERJEE; GERLAI, 2014). Estos resultados disímiles pueden deberse a variaciones en los protocolos experimentales y de cría, en particular el contexto social. El estudio que encontró un aumento de los niveles de cortisol usando una red utilizó el aislamiento social antes del estresor (TRAN; CHATTERJEE; GERLAI, 2014) mientras que el otro experimento utilizó el alojamiento en grupo (APONTE; PETRUNICH-RUTHERFORD, 2019). Además, un estudio que utilizó el mismo estresor durante 1 minuto no encontró efectos en la expresión de las respuestas neuro inmunes, mientras que el ECI elevó estas respuestas en el mismo estudio (KIRSTEN et al., 2021).

Las diferencias en las respuestas de estrés agudo del pez cebra dependen en gran medida de la naturaleza de los estímulos estresores (DEMIN et al., 2020). Por lo tanto, hay que tener un cuidado meticuloso con los detalles metodológicos de los estresores agudos, ya que parecen ser muy sensibles a las variaciones en la cría, los procedimientos experimentales y la naturaleza del estresor. Añadir complejidad a los estresores agudos mediante su combinación podría ser una opción para añadir solidez a estos paradigmas (COLLIER; KALUEFF; ECHEVARRIA, 2017), aunque se necesita más investigación para corroborar esta posibilidad.

En cuanto al enriquecimiento social, se sugiere que esta manipulación puede ser beneficiosa, ya que el pez cebra es una especie altamente social que se agrupa en grupos estrechos en la naturaleza y en el laboratorio (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b; SHAMS; CHATTERJEE; GERLAI, 2015). Sin embargo, los resultados de las manipulaciones sociales han sido muy variables sin que surja un patrón claro de los experimentos. Algunos estudios han encontrado comportamientos más ansiógenos para el aislamiento (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015a), otros para el alojamiento en

grupo (PARKER et al., 2012a; SHAMS; CHATTERJEE; GERLAI, 2015) y otros para el alojamiento en pareja (WHITE et al., 2017), mientras que otros no encontraron diferencias ni para el aislamiento ni para el alojamiento en grupo (PAGNUSSAT et al., 2013; SHAMS et al., 2017). Del mismo modo, las respuestas fisiológicas fueron muy variables entre los protocolos para las manipulaciones sociales (Tabla 3).

Las variaciones en los protocolos experimentales y de cría pueden explicar la disparidad de los resultados de las manipulaciones sociales. En particular, algunas observaciones de comportamiento se realizaron en el tanque de alojamiento, mientras que otras se hicieron en los aparatos de las pruebas. Entonces cabría esperar que las respuestas fueran muy diferentes en los peces del tanque de alojamiento que en aquellos peces sacados de ese acuario. Asimismo, podría ser que para los peces alojados en grupo, el hecho de ser sometidos a pruebas de forma individual pueda suponer una novedad adicional, ya que no están acostumbrados al aislamiento (PARKER et al., 2012a) mientras que para los peces alojados individualmente, el hecho de ser sometidos a pruebas de forma aislada pasa desapercibido (SHAMS; CHATTERJEE; GERLAI, 2015). Además, es posible que en condiciones de alojamiento inadecuadas (*e.g.*, estériles y con altas densidades de población), el aislamiento social pueda proporcionar alivio del estrés social (agresión, encuentros agonísticos, competencia, etc.), especialmente para los peces subordinados (SHAMS et al., 2017). Lo mencionado anteriormente son posibles explicaciones para el inesperado efecto de tipo ansiolítico encontrado para el aislamiento en algunos estudios (GIACOMINI et al., 2015; PARKER et al., 2012a; SHAMS; CHATTERJEE; GERLAI, 2015) y por qué al añadir enriquecimiento físico estos efectos no se presentaron (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015a). Las interacciones con el entorno y los factores relacionados con la prueba deben examinarse cuidadosamente para el enriquecimiento social.

Asimismo, la dinámica social podría afectar significativamente a los resultados de las manipulaciones sociales, ya que se sabe que el estatus social en un grupo altera los niveles de estrés y las respuestas inmunitarias (FILBY et al., 2010). La dinámica social es especialmente importante en grupos pequeños, sobre todo cuando se alojan en parejas, ya que, en esta condición, los peces cebras muestran una mayor agresión y jerarquías de dominancia (MILLER et al., 2017; TELES; OLIVEIRA, 2016), lo que podría explicar el aumento de los efectos de tipo ansiógeno para el alojamiento en parejas (WHITE et al., 2017).

Como se muestra, no se reveló ningún patrón claro a partir de los escasos y conflictivos estudios revisados para las manipulaciones sociales. Lo que está claro es que en

los paradigmas sociales intervienen muchos factores, aparte de la mera presencia o ausencia de otros peces. Por lo tanto, en lugar de investigar estos modelos como una manipulación unilateral, sería sensato añadir más complejidad y considerar los múltiples factores que podrían interactuar con este paradigma. Por ejemplo, estableciendo condiciones de alojamiento que permitan a los peces expresar características prosociales y menos agresivas y/o menos monopolizadoras de recursos (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b), sería posible comprobar si el aislamiento tiene efectos ansiolíticos en el pez cebra o si estos impactos se deben a un alojamiento inadecuado. Del mismo modo, sería ideal repensar si la retirada de cada pez cebra de su grupo para someterlo a una prueba específica puede dar lugar a una mayor variabilidad en las respuestas, y si la evaluación en conjunto de todos los peces cebra agrupados podrían producir datos más homogéneos (PAGNUSSAT et al., 2013).

### **Diferencias intraespecíficas**

Las variaciones intraespecíficas, como las diferencias de personalidad, sexo y línea genética, afectan en gran medida a los fenotipos del pez cebra y pueden influir en la mayoría de los resultados de los artículos revisados, pero a menudo se pasan por alto. Asimismo, los peces domésticos variaron bastante en varios resultados conductuales y fisiológicos con respecto a los peces capturados en la naturaleza en diversos estudios. También se han descrito interacciones entre la personalidad y la dinámica social (DAHLBOM, 2013; KAREKLAS; ELWOOD; HOLLAND, 2018), el sexo y la personalidad (TRAN; GERLAI, 2013) el sexo y el linaje (MUSTAFA; ROMAN; WINBERG, 2019; VITAL; MARTINS, 2013) y una estrecha interacción, a menudo desapercibida, entre el medio ambiente y la diferenciación sexual (SANTOS; LUZIO; COIMBRA, 2017). Por lo tanto, los estudios de MA deben ser cautelosos al generalizar los resultados sin considerar estas individualidades e interacciones.

Es posible que se produzcan interacciones mucho más complejas entre estas variaciones intraespecíficas (DEMIN et al., 2020b), pero estas posibles relaciones no se estudiaron directamente en ninguno de los artículos revisados, lo que justifica que se realicen más investigaciones en profundidad al respecto. Estas interacciones también pueden explicar por qué algunas respuestas mostraron patrones constantes mientras que otras variaron bastante, para el mismo tipo de manipulación.

Por ejemplo, al evaluar los efectos del enriquecimiento estructural, parece que las diferentes estirpes y entornos sociales no afectaron a los resultados de los comportamientos de ansiedad, pero sí influyeron en los niveles de agresión. Los estudios que encontraron un

aumento de los comportamientos agonísticos debido al EE utilizaron peces capturados en estado salvaje (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015; SURIYAMPOLA et al., 2016a) y nacre (WOODWARD; WINDER; WATT, 2019), mientras que los que utilizaron líneas domésticas de tipo salvaje no encontraron diferencias en la agresión. Además, los estudios que encontraron efectos agonísticos del enriquecimiento estructural mantuvieron a los peces en tanques diminutos, con muy pocos peces por grupo (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015; SURIYAMPOLA et al., 2016a; WILKES et al., 2012; WOODWARD; WINDER; WATT, 2019). Por lo tanto, posiblemente, las complejas interacciones entre el linaje, la sociabilidad y el entorno modificaron las respuestas al estrés y la calidad de vida en los modelos de pez cebra.

Es crucial destacar otros factores de confusión relacionados con las variaciones intraespecíficas. Por lo general, se informaba que la cepa utilizada era la WT, sin darse cuenta ni considerar que la WT puede corresponder a muchas líneas genéticas diferentes. Las WT abarcan líneas como AB, Tübingen long fin (TL) y Wild Indian Karyotype (WIK) (AUDIRA et al., 2020). Los peces también pueden obtenerse de proveedores comerciales o directamente de la naturaleza, entonces sólo las líneas de laboratorio definidas genéticamente (incluyendo AB y TU) se deberían denominar como tal. Para los peces obtenidos de la naturaleza o disponibles comercialmente, de los que no se dispone información sobre su genética, sería mejor denominarlos como población salvaje o comercial (VIGNET et al., 2013). Además, como las líneas genéticas del pez cebra no suelen ser totalmente consanguíneas, se espera que las subpoblaciones de las líneas difieran genéticamente. Cuando se utilizan directamente peces de tiendas de mascotas sin establecer una población de laboratorio, es importante tener en cuenta que muchas condiciones ambientales desconocidas y no controladas podrían afectar a su desarrollo antes de llegar a las instalaciones del laboratorio y, por tanto, a su fenotipo (GERLAI, 2019).

Asimismo, los resultados de la personalidad o de las diferencias individuales deben examinarse de forma crítica, teniendo en cuenta que los rasgos de personalidad deben ser consistentes (lo que difiere notablemente de "estable") a lo largo del tiempo y entre contextos (TOMS; ECHEVARRIA, 2014). La mayoría de los estudios revisados han analizado la consistencia a través de los contextos, pero no a lo largo del tiempo, o han examinado la consistencia a lo largo del tiempo, pero sólo en una única situación. Estos estudios pueden haber evaluado entonces la plasticidad conductual en lugar de los rasgos de personalidad (TOMS; ECHEVARRIA, 2014).

Aunque las variaciones intraespecíficas pueden complicar la controlabilidad y, por tanto, afectar a la fiabilidad y reproducibilidad de los datos (ARNOLD et al., 2013), estas variaciones representan mejor a las poblaciones humanas altamente heterogéneas (BROWN et al., 2011), mostrando así una validez poblacional generalmente Buena (STEWART et al., 2014). Por lo tanto, un estudio de las diferentes interacciones entre las MA y la variación intraespecífica puede proporcionar conocimientos sobre las diferencias individuales humanas en respuesta a los tratamientos no farmacológicos o la progresión de la enfermedad, aumentando así la validez traslacional (DEMIN et al., 2019; VOLGIN et al., 2019).

### **Posible interacción entre el estrés y el EA**

La inclusión de algunos elementos como enriquecimiento estructural y social no siempre da lugar a efectos positivos y los hallazgos contradictorios han puesto de manifiesto las numerosas variaciones existentes. Esta falta de consistencia en los protocolos de enriquecimiento entre diferentes laboratorios puede provenir de la falta de consenso en cuanto a la definición de lo que realmente constituye el enriquecimiento ambiental (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015) y cómo funciona (*e.g.*, procesos fisiológicos y neurológicos) (JONES; WEBSTER; SALVANES, 2021).

Añadir complejidad es una de las definiciones más frecuentes de EA en el pez cebra y otras especies. Sin embargo, esta definición puede ser engañosa. Por ejemplo, tanto el ECI como el EA han estudiado cómo las manipulaciones ambientales (*e.g.*, estresando a los peces o introduciendo objetos antes de las pruebas) afectan a los fenotipos conductuales y fisiológicos del pez cebra (COLLIER et al., 2017; VOLGIN et al., 2018a). Y tanto el ECI como el EA pueden aumentar la complejidad ambiental añadiendo objetos o estímulos. Por lo tanto, es importante destacar que la adición de complejidad es solo una de las muchas características que conforman al EA, pero no una que lo defina (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015).

Además de la complejidad, el EA ha sido definido como una manipulación que promueve el bienestar y que reduce el estrés (NÄSLUND & JOHNSON, 2016a; VOLGIN et al., 2018b). Alternativamente, varias teorías como la "adaptación a los estresores cruzados", "la inoculación del estrés", la "habitación al estrés" y la "teoría de la U invertida de la resiliencia al estrés" (SMAIL et al., 2020) proponen que el EA actúa como un estresor leve que mejora la eficiencia de los circuitos de estrés (a través de cambios morfológicos y moleculares) y afina la capacidad del animal para responder adecuadamente a varios desafíos (SMAIL et al., 2020).

Entonces, el EA puede funcionar como un estresor leve en un espectro entre demasiada ECI y muy poca intensidad o estimulación de estrés (acuario estándar actual). Por ejemplo, la exposición en los primeros años de vida tanto al enriquecimiento ambiental como a los estresores leves mejoran el aprendizaje (DEPASQUALE et al., 2016; SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011) y reduce las respuestas relacionadas con la ansiedad (ABREU et al., 2018; DEPASQUALE et al., 2016; SHAMS et al., 2018). Estos efectos también pueden persistir durante un tiempo (1 año) en los peces que ya no están expuestos al enriquecimiento o a estresores leves (DEPASQUALE et al., 2016). Se necesitan más investigaciones para corroborar esta posibilidad, ya que muy pocos estudios han evaluado esto en el pez cebra. Sin embargo, las evidencias tanto en roedores como en humanos muestran que el EA o un estresor leve pueden producir una estimulación suficiente para mejorar la función cerebral y aumentar la resiliencia respecto a la de los animales que carecen de estímulos y a la de los animales con altos niveles de estrés desadaptativo (ASHOKAN; HEGDE; MITRA, 2016; LIU et al., 2018).

Del mismo modo, la naturaleza disímil de los paradigmas de EA puede hacer que algunos sean demasiado débiles para ejercer un efecto, mientras que otros podrían causar niveles de estrés excesivos (SMAIL et al., 2020). Esto también podría explicar la variabilidad de las distintas MA revisadas. Por lo tanto, explorar la posibilidad del EA como un estresor leve ayudaría a establecer los niveles óptimos de estimulación que promueven la resiliencia al estrés en el pez cebra. Asimismo, para otros peces, se observó que el efecto del enriquecimiento físico es dependiente de la intensidad, y el tiempo de latencia para alcanzar la estabilidad social depende de la intensidad del enriquecimiento (ZHANG et al., 2021). Por lo tanto, la interacción de los niveles de enriquecimiento y los tipos de enriquecimiento debe ser examinada en el pez cebra. El estudio de diferentes niveles de enriquecimiento ayudaría a explorar el mecanismo detrás del EA y a estandarizar los protocolos de las MA. Es importante señalar que, aunque el EA puede activar una respuesta de estrés leve, generalmente este se percibe como una recompensa (SMAIL et al., 2020). Por ejemplo, los peces aumentan la defensa territorial para obtener EA (JOHNSSON; CARLSSON; SUNDSTROM, 2000), trabajan por EA (GALHARDO; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2011; SULLIVAN; LAWRENCE; BLACHE, 2016) y eligen EA en las pruebas de preferencias (STEVENS; REED; HAWKINS, 2021). Por tanto, la valoración de los estímulos (CERQUEIRA et al., 2017) es también una característica importante a tener en cuenta a la hora de evaluar los diversos componentes del EA.

## **Consideraciones importantes sobre los EE y su parametrización**

El alojamiento enriquecido puede complicar la estandarización al aumentar la variación de los datos obtenidos, dada la amplia gama de protocolos de EA (VOLGIN et al., 2018b). No obstante, la variabilidad en los protocolos y en los datos estuvo presente tanto en los modelos convencionales (de ansiedad y condiciones estándar de acuario) como en los paradigmas de EA revisados. Además, hasta donde sabemos, aún no se ha explorado la posibilidad de que el EA afecte a la variabilidad de los datos en el pez cebra.

Algunos estudios en roedores que han realizado comparaciones sistemáticas multi-cohorte y entre laboratorios no encontraron un aumento en la variabilidad de los datos para múltiples parámetros comunes de comportamiento y fisiología, debido a los protocolos de EA altamente estandarizados (ANDRÉ et al., 2018; WOLFER et al., 2004). Por lo tanto, la variabilidad en algunos de los puntos finales revisados podría ser causada por la falta de estandarización en parámetros importantes del diseño del EA y no por el modelo en sí mismo. El tamaño y la dirección de los resultados pueden variar debido a varios factores como el tipo y la combinación de enriquecimiento, la variación intraespecífica, el tiempo y la duración del enriquecimiento y los parámetros estudiados (LIEGGI et al., 2019). Por lo tanto, es necesario abordar estos factores para estandarizar el EA y analizar sistemáticamente si existe una influencia del EA en la variabilidad de los datos en el pez cebra.

También hay que tener en cuenta que unas condiciones estándar elevadas no disminuyen la variabilidad individual (WOLFER et al., 2004) incluso para poblaciones isogénicas (ROMÁN et al., 2018) y que otros factores no relacionados con el EA pueden producir una alta variabilidad entre cohortes (ANDRÉ et al., 2018) y entre grupos (WOLFER et al., 2004). (ANDRÉ et al., 2018) indicaron que los factores de cohorte tienen más relevancia biológica que algunos efectos menores producidos por el EA. Aproximaciones similares fueron encontradas por (A. M. STEWART et al., 2013) para el pez cebra, aunque este estudio solo evaluó las condiciones estándar sin comparar los efectos para el EA. Por lo tanto, es importante considerar que no sólo la adición de objetos o compañeros sociales dentro del tanque, sino también el diseño del tanque (por ejemplo, el material, el tamaño, la forma y el color), el flujo de agua y varias condiciones del entorno que rodea el acuario (LIEGGI et al., 2019) también pueden confundir la evaluación del EA y otras MA.

Otro aspecto importante a considerar es que el EA es una intervención multifactorial que abarca las interacciones de múltiples elementos y estimula al animal a través de diferentes

dominios (DEMIN et al., 2019; GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b; SMAIL et al., 2020). Es especialmente importante la interacción entre el enriquecimiento estructural y el entorno social y viceversa. A partir de estudios en la naturaleza, se sabe que el tamaño del grupo varía en función de las condiciones ambientales, lo que a su vez influiría en los comportamientos (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b; ROY; BHAT, 2018b; ROY; SHUKLA; BHAT, 2017; SURIYAMPOLA et al., 2016b). Como los entornos sociales y ambientales en el pez cebra reaccionan a los cambios de la dinámica social (por ejemplo, la competencia por los recursos, la dominancia, la agresión, las experiencias sociales, el contagio emocional y la amortiguación social) (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b; LIEGGI et al., 2019; ROY; SHUKLA; BHAT, 2017; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021) estas interacciones pueden tener grandes impactos en el comportamiento y la fisiología (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b; SHAMS et al., 2017) y deben considerarse en conjunto al evaluar el EA u otras MA.

Del mismo modo, es importante evaluar las variaciones intraespecíficas, ya que esto podría influir también en el EA. Entonces, se necesitan más estudios para establecer normas de cría y MA que tengan más en cuenta la variación intraespecífica (DEMIN et al., 2019; VOLGIN et al., 2019). Además, el pez cebra tiene preferencias innatas por ciertos entornos (NÄSLUND & JOHNSON, 2016b). Por lo tanto, la selección de los elementos utilizados para el EA debe basarse en el hábitat y el comportamiento natural (DEPASQUALE; LERI, 2018).

Por último, es importante tener en cuenta el tipo de materiales con los que se fabrican los diferentes objetos de enriquecimiento. Habría que realizar pruebas para garantizar que los materiales están libres de sustancias nocivas y no producen micropartículas que afecten a los peces por ingestión o acumulación (ALESTRÖM et al., 2020). Del mismo modo, dado que los accesorios de plástico no suelen esterilizarse por autoclave o blanqueadores, es importante explorar las consecuencias que el crecimiento de biofilms en las estructuras que componen el EA puede tener sobre el pez cebra.

Hasta donde sabemos, no hay estudios que caractericen las comunidades bacterianas que podrían crecer en el biofilm de las estructuras del EA, como las plantas de plástico, ni sus efectos sobre el comportamiento y la fisiología del pez cebra. No obstante, cada vez hay más pruebas que sugieren que la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la regulación del desarrollo, la función y el comportamiento del cerebro. Los peces cebra con desequilibrios de la microbiota intestinal, denominada disbiosis, y los animales sin gérmenes presentan disfunciones conductuales y neuronales (BRUCKNER et al., 2020;

HEIJTZ et al., 2011). Así pues, la posible colonización del intestino por bacterias que pueden crecer en el biofilm que recubre las estructuras del EA merece un mayor estudio, al igual que sus posibles consecuencias (positivas o negativas) en la interacción intestino-cerebro.

## CONCLUSIÓN

Dado que las condiciones de alojamiento y cría de bajo nivel de estrés pueden influir negativamente en el sistema inmunitario y en la fisiología y el comportamiento del pez cebra, los resultados obtenidos en esas condiciones de alojamiento pueden estar sesgados y las conclusiones pueden ser erróneas. La comparación directa de los diferentes niveles de estrés o estimulación proporcionados por las condiciones estándar (bajas), EA (medias) y ECI (altas) presentan una excelente oportunidad para definir los rangos óptimos de cría. Del mismo modo, como el EA puede funcionar como un estresor leve, los puntos en común y las diferencias entre estos tres niveles de estimulación y sus interacciones con la variación intraespecífica pueden utilizarse en futuros estudios para la prevención e intervención en los trastornos relacionados con el estrés mediante intervenciones no farmacológicas y no quirúrgicas. Además, la comprensión de los mecanismos morfológicos y moleculares por los que el EA produce resiliencia al estrés (SMAIL et al., 2020) es clave para desarrollar medicamentos novedosos y más específicos.

Por otra parte, podrían surgir preocupaciones válidas sobre la interferencia del EA en algunos estudios y el aumento de la variabilidad de los parámetros conductuales y fisiológicos debido al EA. Sin embargo, los estudios realizados en otras especies parecen indicar que los protocolos de EA altamente estandarizados no aumentan la variabilidad de los datos ni alteran los resultados del laboratorio. Estos estudios también sugieren que los factores de cohorte y el ambiente que rodea al acuario producen más variabilidad que el EA. Por lo tanto, estos hallazgos deben ser corroborados para el pez cebra. Además, como los efectos del EA pueden persistir después de su retirada, el EA podría utilizarse antes de las intervenciones que requieren entornos inertes y relativamente sencillos, aunque los efectos de la retirada del EA merecen un examen más profundo. Del mismo modo, podrían aplicarse diversos tipos de enriquecimiento sensorial al tipo de estudios que se verían afectados por el enriquecimiento estructural.

Para estandarizar el EA son necesarios estudios de multi-cohortes y multi-laboratorios, así como transparencia para informar del diseño del EA con detalles finos (*e.g.*, tiempo y duración, tipo y combinación y parámetros a estudiar), resultados del EA y posibles

influencias e interacciones entre el EA y la variación intraespecífica y el EA y los entornos sociales. Además, quedan por estudiar muchos otros aspectos del EA, como por ejemplo la proliferación de biopelículas o la acumulación de contaminantes debido al material con el que se realiza el enriquecimiento y sus efectos en los peces.

Por último, el reconocimiento de que numerosos factores relacionados con el desarrollo, la genética y las pruebas en sí pueden afectar a los resultados de las MA es esencial para comprender la dinámica y las complejas interacciones del estrés y la calidad de vida y cómo se produce la resiliencia contra los efectos nocivos del estrés. Por lo tanto, los estudios que evalúen más de una variable son necesarios para abarcar y comprender esta complejidad y quizás para producir resultados más sólidos y traslativos.

## REFERENCIAS

ABOZAID, H., WESSELS, S., HÖRSTGEN-SCHWARK, G., 2012. Elevated Temperature Applied during Gonadal Transformation Leads to Male Bias in Zebrafish (*Danio rerio*). *Sex. Dev.* 6, 201–209. <https://doi.org/10.1159/000336297>

ABREU, M.S., OLIVEIRA, T.A., KOAKOSKI, G., BARRETO, R.E., BARCELLOS, L.J.G., 2018. Modulation of Cortisol Responses to an Acute Stressor in Zebrafish Visually Exposed to Heterospecific Fish During Development. *Zebrafish* 15, 228–233. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1509>

ALESTRÖM, P., D'ANGELO, L., MIDTLYNG, P.J., SCHORDERET, D.F., SCHULTE-MERKER, S., SOHM, F., WARNER, S., 2020. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab. Anim.* 54, 213. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>

AMPATZIS, K., DERMON, C.R., 2016. Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 312, 385–393. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2016.06.047>

ANDRÉ, V., GAU, C., SCHEIDELER, A., AGUILAR-PIMENTEL, J.A., AMARIE, O. V., BECKER, L., GARRETT, L., HANS, W., HÖLTER, S.M., JANIK, D., MORETH, K., NEFF, F., ÖSTEREICHER, M., RACZ, I., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., BEKEREDJIAN, R., GRAW, J., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., OLLERT, M., SCHMIDT-WEBER, C., WOLF, E., WURST, W., GAILUS-DURNER, V., BRIELMEIER, M., FUCHS, H., HRABÉ DE ANGELIS, M., 2018. Laboratory mouse housing conditions can be improved using

common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol.* 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005019>

ANGIULLI, E., PAGLIARA, V., CIONI, C., FRABETTI, F., PIZZETTI, F., ALLEVA, E., TONI, M., 2020. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62331-1>

APONTE, A., PETRUNICH-RUTHERFORD, M.L., 2019. Acute net stress of young adult zebrafish (*Danio rerio*) is not sufficient to increase anxiety-like behavior and whole-body cortisol. *PeerJ.* <https://doi.org/10.7717/peerj.7469>

ARIYOMO, T.O., WATT, P.J., 2015. Effect of hunger level and time of day on boldness and aggression in the zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 86, 1852–1859. <https://doi.org/10.1111/JFB.12674>

ARNOLD, K.E., BOXALL, A.B.A., BROWN, A.R., CUTHBERT, R.J., GAW, S., HUTCHINSON, T.H., JOBLING, S., MADDEN, J.C., METCALFE, C.D., NAIDOO, V., SHORE, R.F., SMITS, J.E., TAGGART, M.A., THOMPSON, H.M., 2013. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. *Biol. Lett.* 9. <https://doi.org/10.1098/RSBL.2013.0492>

ASHOKAN, A., HEGDE, A., MITRA, R., 2016. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology* 69, 189–196. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2016.04.009>

AUDIRA, G., SIREGAR, P., STRUNGARU, S.A., HUANG, J.C., HSIAO, C. DER, 2020. Which zebrafish strains are more suitable to perform behavioral studies? A comprehensive comparison by phenomic approach. *Biology (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/biology9080200>

BAKER, M.R., GOODMAN, A.C., SANTO, J.B., WONG, R.Y., 2018. Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*. *Sci. Rep.* 8, 12114. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30630-3>

BAKER, M.R., WONG, R.Y., 2019. Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. *Sci. Rep.* 9, 9935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46319-0>

- BARBA-ESCOBEDO, P.A., GOULD, G.G., 2012. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: Strain and anxiolytic effects. *Genes, Brain Behav.* 11, 366–373. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00770.x>
- BARCELLOS, H.H.A., KOAKOSKI, G., CHAULET, F., KIRSTEN, K.S., KREUTZ, L.C., KALUEFF, A. V., BARCELLOS, L.J.G., 2018. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. *PeerJ* 6, e5162. <https://doi.org/10.7717/peerj.5162>
- BASQUILL, S.P., GRANT, J.W.A., 1998. An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebra fish (*Danio rerio*). *Can. J. Zool.* 76, 770–772. <https://doi.org/10.1139/z97-232>
- BHAT, A., GREULICH, M.M., MARTINS, E.P., 2015. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (*Danio rerio*) populations. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125097>
- BRENES, J.C., FORNAGUERA, J., SEQUEIRA-CORDERO, A., 2020. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. *Front. Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00804>
- BROWN, A.R., BICKLEY, L.K., PAGE, G. LE, HOSKEN, D.J., PAULL, G.C., HAMILTON, P.B., OWEN, S.F., ROBINSON, J., SHARPE, A.D., TYLER, C.R., 2011. Are Toxicological Responses in Laboratory (Inbred) Zebrafish Representative of Those in Outbred (Wild) Populations? – A Case Study with an Endocrine Disrupting Chemical. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4166–4172. <https://doi.org/10.1021/ES200122R>
- BROWN, A.R., OWEN, S.F., PETERS, J., ZHANG, Y., SOFFKER, M., PAULL, G.C., HOSKEN, D.J., WAHAB, M.A., TYLER, C.R., 2015. Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E1237–E1246. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1416269112>
- BRUCKNER, J.J., STEDNITZ, S.J., GRICE, M.Z., LARSCH, J., TALLAFUSS, A., WASHBOURNE, P., EISEN, J.S., 2020. The microbiota promotes social behavior by neuro-immune modulation of neurite complexity. *bioRxiv* 2020.05.01.071373. <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.071373>
- CASTRANOVA, D., LAWTON, A., LAWRENCE, C., BAUMANN, D.P., BEST, J., COSCOLLA, J., DOHERTY, A., RAMOS, J., HAKKESTEEG, J., WANG, C., WILSON, C., MALLEY, J., WEINSTEIN, B.M., 2011. The effect of stocking densities on reproductive

performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 8, 141–146.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0688>

CERQUEIRA, M., MILLOT, S., CASTANHEIRA, M.F., FÉLIX, A.S., SILVA, T., OLIVEIRA, G.A., OLIVEIRA, C.C., MARTINS, C.I.M., OLIVEIRA, R.F., 2017. Cognitive appraisal of environmental stimuli induces emotion-like states in fish. *Sci. Rep.*  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13173-x>

CHAKRAVARTY, S., REDDY, B.R., SUDHAKAR, S.R., SAXENA, S., DAS, T., MEGHAH, V., BRAHMENDRA SWAMY, C. V., KUMAR, A., IDRIS, M.M., 2013. Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. *PLoS One* 8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063302>

COLDITZ, I.G., HINE, B.C., 2016. Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare. *Anim. Prod. Sci.*  
<https://doi.org/10.1071/AN15297>

COLLIER, A.D., KALUEFF, A. V., ECHEVARRIA, D.J., 2017. Zebrafish models of anxiety-like behaviors, in: *The Rights and Wrongs of Zebrafish: Behavioral Phenotyping of Zebrafish*.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-33774-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33774-6_3)

COLLYMORE, C., TOLWANI, R.J., RASMUSSEN, S., 2015. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 280–5.

CROFTON, E.J., ZHANG, Y., GREEN, T.A., 2015. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neurosci. Biobehav. Rev.*  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.017>

DAHLBOM, S.J., 2013. *Bully or Bullied?: The Zebrafish as a Model for Social Stress and Depression.*, Faculty of Medicine.

DAHLBOM, S.J., BACKSTRÖM, T., LUNDSTEDT-ENKEL, K., WINBERG, S., 2012. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 228, 333–338. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2011.12.011>

DAHLBOM, S.J., LAGMAN, D., LUNDSTEDT-ENKEL, K., SUNDSTRÖM, L.F., WINBERG, S., 2011. Boldness Predicts Social Status in Zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One* 6, e23565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023565>

DEMIN, K.A., LAKSTYGAL, A.M., ALEKSEEVA, P.A., SYSOEV, M., DE ABREU, M.S., ALPYSHOV, E.T., SERIKULY, N., WANG, D.M., WANG, M.Y., TANG, Z.C., YAN, D.N., STREKALOVA, T. V., VOLGIN, A.D., AMSTISLAVSKAYA, T.G., WANG, J.J., SONG, C., KALUEFF, A. V., 2019. The role of intraspecies variation in fish neurobehavioral and neuropharmacological phenotypes in aquatic models. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.015>

DEMIN, K.A., LAKSTYGAL, A.M., VOLGIN, A.D., DE ABREU, M.S., GENARIO, R., ALPYSHOV, E.T., SERIKULY, N., WANG, D., WANG, JIANTAO, YAN, D., WANG, M., YANG, L.E., HU, G., BYTOV, M., ZABEGALOV, K.N., ZHDANOV, A., HARVEY, B.H., COSTA, F., ROSEMBERG, D.B., LEONARD, B.E., FONTANA, B.D., CLEAL, M., PARKER, M.O., WANG, JIAJIA, SONG, C., AMSTISLAVSKAYA, T.G., KALUEFF, A. V., 2020a. Cross-species Analyses of Intra-species Behavioral Differences in Mammals and Fish. *Neuroscience.* <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.12.035>

DEMIN, K.A., TARANOV, A.S., ILYIN, N.P., LAKSTYGAL, A.M., VOLGIN, A.D., DE ABREU, M.S., STREKALOVA, T., KALUEFF, A. V., 2020b. Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish. *Stress.* <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1724948>

DEPASQUALE, C., FETTROW, S., STURGILL, J., BRAITHWAITE, V.A., 2019. The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.03.015>

DEPASQUALE, C., LERI, J., 2018. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Processes.* <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.04.006>

DEPASQUALE, C., NEUBERGER, T., HIRRLINGER, A.M., BRAITHWAITE, V.A., 2016. The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behaviour. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152564. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2564>

EGAN, R.J., BERGNER, C.L., HART, P.C., CACHAT, J.M., CANAVELLO, P.R., ELEGANTE, M.F., ELKHAYAT, S.I., BARTELS, B.K., TIEN, A.K., TIEN, D.H., MOHNOT, S., BEESON, E., GLASGOW, E., AMRI, H., ZUKOWSKA, Z., KALUEFF, A. V., 2009.

Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>

FARES, R.P., BELMEGUENAI, A., SANCHEZ, P.E., KOUCHI, H.Y., BODENNEC, J., MORALES, A., GEORGES, B., BONNET, C., BOUVARD, S., SLOVITER, R.S., BEZIN, L., 2013. Standardized Environmental Enrichment Supports Enhanced Brain Plasticity in Healthy Rats and Prevents Cognitive Impairment in Epileptic Rats. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053888>

FIFE-COOK, I., FRANKS, B., 2019. Positive Welfare for Fishes: Rationale and Areas for Future Study. *Fishes* 4, 31. <https://doi.org/10.3390/fishes4020031>

FILBY, A.L., PAULL, G.C., BARTLETT, E.J., VAN LOOK, K.J.W., TYLER, C.R., 2010. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol. Behav.* 101, 576–587. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2010.09.004>

Fontana, B.D., Gibbon, A.J., Cleal, M., Sudwarts, A., Pritchett, D., Miletto Petrazzini, M.E., Brennan, C.H., Parker, M.O., 2020. Moderate early life stress improves adult zebrafish (*Danio rerio*) working memory but does not affect social and anxiety-like responses. *Dev. Psychobiol.* <https://doi.org/10.1002/dev.21986>

FRANKS, B., GRAHAM, C., VON KEYSERLINGK, M., 2018. Is Heightened-Shoaling a Good Candidate for Positive Emotional Behavior in Zebrafish? *Animals* 8, 152. <https://doi.org/10.3390/ani8090152>

FULCHER, N., TRAN, S., SHAMS, S., CHATTERJEE, D., GERLAI, R., 2017. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. *Zebrafish* 14, 23–34. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1295>

GAIKWAD, S., STEWART, A., HART, P., WONG, K., PIET, V., CACHAT, J., KALUEFF, A. V., 2011. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. *Behav. Processes.* <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2011.04.004>

GALHARDO, L., ALMEIDA, O., OLIVEIRA, R.F., 2011. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 130, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.12.008>

GENARIO, R., GIACOMINI, A.C.V.V., DEMIN, K.A., DOS SANTOS, B.E., MARCHIORI, N.I., VOLGIN, A.D., BASHIRZADE, A., AMSTISLAVSKAYA, T.G., DE ABREU, M.S., KALUEFF, A. V., 2019. The evolutionarily conserved role of melatonin in CNS disorders and behavioral regulation: Translational lessons from zebrafish. *Neurosci. Biobehav. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.025>

GERLAI, R., 2020. Evolutionary conservation, translational relevance and cognitive function: The future of zebrafish in behavioral neuroscience. *Neurosci. Biobehav. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.009>

GERLAI, R., 2019. Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 178, 30–38. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2018.02.005>

GIACOMINI, A.C.V.V., DE ABREU, M.S., KOAKOSKI, G., IDALÊNCIO, R., KALICHAK, F., OLIVEIRA, T.A., DA ROSA, J.G.S., GUSSO, D., PIATO, A.L., BARCELLOS, L.J.G., 2015. My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. *Physiol. Behav.* 139, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.035>

GIACOMINI, A.C.V.V. V., ABREU, M.S., ZANANDREA, R., SAIBT, N., FRIEDRICH, M.T., KOAKOSKI, G., GUSSO, D., PIATO, A.L., BARCELLOS, L.J.G.G., 2016. Environmental and pharmacological manipulations blunt the stress response of zebrafish in a similar manner. *Sci. Rep.* 6, 28986. <https://doi.org/10.1038/srep28986>

GORISSEN, M., MANUEL, R., PELGRIM, T.N.M., MES, W., DE WOLF, M.J.S., ZETHOF, J., FLIK, G., VAN DEN BOS, R., 2015. Differences in inhibitory avoidance, cortisol and brain gene expression in TL and AB zebrafish. *Genes, Brain Behav.* 14, 428–438. <https://doi.org/10.1111/gbb.12220>

GRAHAM, C., VON KEYSERLINGK, M.A.G., FRANKS, B., 2018a. Free-choice exploration increases affiliative behaviour in zebrafish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.02.005>

GRAHAM, C., VON KEYSERLINGK, M.A.G., FRANKS, B., 2018b. Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.11.005>

GRONQUIST, D., BERGES, J.A., 2013. Effects of Aquarium-Related Stressors on the Zebrafish: A Comparison of Behavioral, Physiological, and Biochemical Indicators. *J. Aquat. Anim. Health* 25, 53–65. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.747450>

- HEIJTZ, R.D., WANG, S., ANUAR, F., QIAN, Y., BJÖRKHOLM, B., SAMUELSSON, A., HIBBERD, M.L., FORSSBERG, H., PETTERSSON, S., 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1010529108>
- HOLLEY, E.D., LUDWIG, K.J., MCEWEN, D.C., WISENDEN, B.D., 2014. Predictability of food supply, but not ration, increases exploratory behaviour in zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.12441>
- JOHANSSON, J.I., CARLSSON, M., SUNDSTROM, L.F., 2000. Habitat preference increases territorial defence in brown trout (*Salmo trutta*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 48, 373–377. <https://doi.org/10.1007/s002650000244>
- JONES, N.A.R., SPENCE, R., JONES, F.A.M., SPENCE-JONES, H.C., 2019. Shade as enrichment: testing preferences for shelter in two model fish species. *J. Fish Biol.* 95, 1161–1165. <https://doi.org/10.1111/jfb.14129>
- JONES, N.A.R., WEBSTER, M.M., SALVANES, A.G.V., 2021. Physical enrichment research for captive fish: Time to focus on the DETAILS. *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/JFB.14773>
- KALUEFF, A. V., GEBHARDT, M., STEWART, A.M., CACHAT, J.M., BRIMMER, M., CHAWLA, J.S., CRADDOCK, C., KYZAR, E.J., ROTH, A., LANDSMAN, S., GAIKWAD, S., ROBINSON, K., BAATRUP, E., TIERNEY, K., SHAMCHUK, A., NORTON, W., MILLER, N., NICOLSON, T., BRAUBACH, O., GILMAN, C.P., PITTMAN, J., ROSEMBERG, D.B., GERLAI, R., ECHEVARRIA, D., LAMB, E., NEUHAUSS, S.C.F., WENG, W., BALLY-CUIF, L., SCHNEIDER, H., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
- KALUEFF, A. V., STEWART, A.M., GERLAI, R., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- KAREKLAS, K., ELWOOD, R.W., HOLLAND, R.A., 2018. Grouping promotes risk-taking in unfamiliar settings. *Behav. Processes*. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.01.003>
- KECK, V.A., EDGERTON, D.S., HAJIZADEH, S., SWIFT, L.L., DUPONT, W.D., LAWRENCE, C., BOYD, K.L., 2015. Effects of Habitat Complexity on Pair-Housed Zebrafish. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 378–83.

- KENNEY, J.W., SCOTT, I.C., JOSSELYN, S.A., FRANKLAND, P.W., 2017. Contextual fear conditioning in zebrafish. *Learn. Mem.* <https://doi.org/10.1101/lm.045690>.117
- KERN, E.M.A., ROBINSON, D., GASS, E., GODWIN, J., LANGERHANS, R.B., 2016. Correlated evolution of personality, morphology and performance. *Anim. Behav.* 117, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.04.007>
- KIRSTEN, K., FIOR, D., KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G., 2018. First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19276-3>
- KIRSTEN, K., POMPERMAIER, A., KOAKOSKI, G., MENDONÇA-SOARES, S., DA COSTA, R.A., MAFFI, V.C., KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G., 2021. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. *Stress* 24, 107–112. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1724947>
- KISTLER, C., HEGGLIN, D., WÜRBEL, H., KÖNIG, B., 2011. Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 135, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.014>
- Kortzfleisch, V.T. von, Karp, N.A., Palme, R., Kaiser, S., Sachser, N., Richter, S.H., 2020. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments.’ *Sci. Reports* 2020 101 10, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73503-4>
- LAWRENCE, C., EBERSOLE, J.P., KESSELI, R. V., 2007. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Biol. Fishes* 2007 812 81, 239–246. <https://doi.org/10.1007/S10641-007-9195-8>
- LEE, C.J., PAULL, G.C., TYLER, C.R., 2018a. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 94, jfb.13865. <https://doi.org/10.1111/jfb.13865>
- LEE, C.J., TYLER, C.R., PAULL, G.C., 2018b. Can simple tank changes benefit the welfare of laboratory zebrafish *Danio rerio*? *J. Fish Biol.* 92, 653–659. <https://doi.org/10.1111/jfb.13535>

- LIEGGI, C., KALUEFF, A. V, LAWRENCE, C., COLLYMORE, C., 2019. The Influence of Behavioral, Social, and Environmental Factors on Reproducibility and Replicability in Aquatic Animal Models. *ILAR J.* 60, 270. <https://doi.org/10.1093/ILAR/ILZ019>
- LIEW, W.C., BARTFAI, R., LIM, Z., SREENIVASAN, R., SIEGFRIED, K.R., ORBAN, L., 2012. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLoS One* 7, e34397. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034397>
- LINDSEY, B.W., TROPEPE, V., 2014. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Dev. Neurobiol.* 74, 1053–1077. <https://doi.org/10.1002/dneu.22183>
- LIU, H., ZHANG, C., JI, Y., YANG, L., 2018. Biological and Psychological Perspectives of Resilience: Is It Possible to Improve Stress Resistance? *Front. Hum. Neurosci.* 0, 326. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2018.00326>
- LUZIO, A., SANTOS, D., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.A., MONTEIRO, S.M., COIMBRA, A.M., 2016. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. *Aquat. Toxicol.* 174, 22–35. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2016.02.003>
- MAGALHÃES, R., GANZ, E., RODRIGUES, M., BARRIÈRE, D.A., MÉRIAUX, S., JAY, T.M., SOUSA, N., 2019. Biomarkers of resilience and susceptibility in rodent models of stress, in: *Stress Resilience: Molecular and Behavioral Aspects*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813983-7.00020-3>
- MANUEL, R., GORISSEN, M., STOKKERMANS, M., ZETHOF, J., EBBESSON, L.O.E., VAN DEN VIS, H., FLIK, G., VAN DEN BOS, R., VIS, H. VAN DE, FLIK, G., BOS, R. VAN DEN, 2015a. The Effects of Environmental Enrichment and Age-Related Differences on Inhibitory Avoidance in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Zebrafish* 12, 152–165. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1045>
- MANUEL, R., GORISSEN, M., ZETHOF, J., EBBESSON, L.O.E.E., VAN DE VIS, H., FLIK, G., VAN DEN BOS, R., 2014. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: Stronger effects in the resting phase than in the active phase. *J. Exp. Biol.* 217, 3919–3928. <https://doi.org/10.1242/jeb.109736>

- MANUEL, R., ZETHOF, J., FLIK, G., BOS, R. VAN DEN, 2015b. Providing a food reward reduces inhibitory avoidance learning in zebrafish. *Behav. Processes* 120, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.08.013>
- MARCON, M., MOCELIN, R., BENVENUTTI, R., COSTA, T., HERRMANN, A.P., DE OLIVEIRA, D.L., KOAKOSKI, G., BARCELLOS, L.J.G.G., PIATO, A., 2018a. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 221, jeb176735. <https://doi.org/10.1242/jeb.176735>
- MARCON, M., MOCELIN, R., SACHETT, A., SIEBEL, A.M., HERRMANN, A.P., PIATO, A., 2018b. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. *PeerJ* 6, e5136. <https://doi.org/10.7717/peerj.5136>
- MAXIMINO, C., PUTY, B., MATOS OLIVEIRA, K.R., HERCULANO, A.M., 2013. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. *Genes, Brain Behav.* <https://doi.org/10.1111/gbb.12047>
- MEYER, B.M., FROEHLICH, J.M., GALT, N.J., BIGA, P.R., 2013. Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.004>
- MILLER, T.H., CLEMENTS, K., AHN, S., PARK, C., JI, E.H., ISSA, F.A., 2017. Social status-dependent shift in neural circuit activation affects decision making. *J. Neurosci.* 37, 2137–2148. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1548-16.2017>
- MOHER, D., LIBERATI, A., TETZLAFF, J., ALTMAN, D.G., GROUP, T.P., 2009. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLOS Med.* 6, e1000097. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1000097>
- MUSTAFA, A., ROMAN, E., WINBERG, S., 2019. Boldness in Male and Female Zebrafish (*Danio rerio*) Is Dependent on Strain and Test. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00248>
- NÄSLUND, J., JOHNSON, J.I., 2016a. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish a. Fish Fish.* 17, 1–30. <https://doi.org/10.1111/faf.12088>

- NÄSLUND, J., JOHNSON, J.I., 2016b. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish Fish.* 17, 1–30. <https://doi.org/10.1111/faf.12088>
- OSWALD, M.E., DREW, R.E., RACINE, M., MURDOCH, G.K., ROBISON, B.D., 2012. Is Behavioral Variation along the Bold-Shy Continuum Associated with Variation in the Stress Axis in Zebrafish? *Physiol. Biochem. Zool.* 85, 718–728. <https://doi.org/10.1086/668203>
- PAGNUSSAT, N., PIATO, A.L., SCHAEFER, I.C., BLANK, M., TAMBORSKI, A.R., GUERIM, L.D., BONAN, C.D., VIANNA, M.R.M., LARA, D.R., 2013. One for all and all for one: The importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish.* <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0867>
- PARKER, M.O., MILLINGTON, M.E., COMBE, F.J., 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, e34992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034992>
- PAVLIDIS, M., DIGKA, N., THEODORIDI, A., CAMPO, A., BARSAKIS, K., SKOURADAKIS, G., SAMARAS, A., TSALAFOUTA, A., 2013. Husbandry of Zebrafish, *Danio Rerio*, and the Cortisol Stress Response. *Zebrafish* 10, 524–531. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0819>
- PAVLIDIS, M., THEODORIDI, A., TSALAFOUTA, A., 2015. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 60, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.014>
- PIATO, A.L., CAPIOTTI, K.M., TAMBORSKI, A.R., OSES, J.P., BARCELLOS, L.J.G., BOGO, M.R., LARA, D.R., VIANNA, M.R., BONAN, C.D., 2011a. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.018>
- PIATO, A.L., ROSEMBERG, D.B., CAPIOTTI, K.M., SIEBEL, A.M., HERRMANN, A.P., GHISLENI, G., VIANNA, M.R., BOGO, M.R., LARA, D.R., BONAN, C.D., 2011b. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. *Neurochem. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0509-z>

- RABBANE, M.G., RAHMAN, M.M., RAHMAN, M.M., HOSSAIN, M.A., HOSSAIN, M.A., 2017. Effects of stocking density on growth of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). *Bangladesh J. Zool.* <https://doi.org/10.3329/bjz.v44i2.32760>
- RAMBO, C.L., MOCELIN, R., MARCON, M., VILLANOVA, D., KOAKOSKI, G., DE ABREU, M.S., OLIVEIRA, T.A., BARCELLOS, L.J.G., PIATO, A.L., BONAN, C.D., 2017. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. *Behav. Brain Res.* 171, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.032>
- RAMSAY, J.M., WATRAL, V., SCHRECK, C.B., KENT, M.L., 2009. Husbandry stress exacerbates mycobacterial infections in adult zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *J. Fish Dis.* 32, 931–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01074.x>
- REOLON, G.K., DE MELO, G.M., DA ROSA, J.G. DOS S., BARCELLOS, L.J.G., BONAN, C.D., 2018. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 336, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.006>
- RIBAS, L., LIEW, W.C., DÍAZ, N., SREENIVASAN, R., ORBÁN, L., PIFERRER, F., 2017a. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E941–E950. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1609411114>
- RIBAS, L., VALDIVIESO, A., DÍAZ, N., PIFERRER, F., 2017b. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. *J. Exp. Biol.* 220, 1056–1064. <https://doi.org/10.1242/jeb.144980>
- ROBERTSON, C.E., WRIGHT, P.A., KÖBLITZ, L., BERNIER, N.J., 2014. Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2014.0637>
- ROCHE, D.G., CAREAU, V., BINNING, S.A., 2016. Demystifying animal “personality” (or not): Why individual variation matters to experimental biologists. *J. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1242/jeb.146712>
- ROSEMBERG, D.B., RICO, E.P., MUSSULINI, B.H.M., PIATO, Â.L., CALCAGNOTTO, M.E., BONAN, C.D., DIAS, R.D., BLASER, R.E., SOUZA, D.O., DE OLIVEIRA, D.L., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019397>

- ROY, T., BHAT, A., 2018a. Population, sex and body size: Determinants of behavioural variations and behavioural correlations among wild zebrafish *Danio rerio*. *R. Soc. Open Sci.* <https://doi.org/10.1098/rsos.170978>
- ROY, T., BHAT, A., 2018b. Repeatability in boldness and aggression among wild zebrafish (*Danio rerio*) from two differing predation and flow regimes. *J. Comp. Psychol.* <https://doi.org/10.1037/com0000150>
- ROY, T., BHAT, A., 2016. Learning and Memory in Juvenile Zebrafish: What makes the Difference - Population or Rearing Environment? *Ethology* 122, 308–318. <https://doi.org/10.1111/ETH.12470>
- ROY, T., SHUKLA, R., BHAT, A., 2017. Risk-Taking During Feeding: Between- and Within-Population Variation and Repeatability Across Contexts Among Wild Zebrafish. *Zebrafish* 14, 393–403. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1442>
- SANTARELLI, S., LESUIS, S.L., WANG, X.D., WAGNER, K. V., HARTMANN, J., LABERMAIER, C., SCHARF, S.H., MÜLLER, M.B., HOLSBOER, F., SCHMIDT, M. V., 2014. Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.02.002>
- SANTOS, D., LUZIO, A., COIMBRA, A.M., 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquat. Toxicol.* 191, 141–163. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2017.08.005>
- SCHROEDER, P., JONES, S., YOUNG, I.S., SNEDDON, L.U., 2014. What do zebrafish want? Impact of social grouping dominance and gender on preference for enrichment. *Lab. Anim.* 48, 328–337. <https://doi.org/10.1177/0023677214538239>
- SERT, N.P. DU, HURST, V., AHLUWALIA, A., ALAM, S., AVEY, M.T., BAKER, M., BROWNE, W.J., CLARK, A., CUTHILL, I.C., DIRNAGL, U., EMERSON, M., GARNER, P., HOLGATE, S.T., HOWELLS, D.W., KARP, N.A., LAZIC, S.E., LIDSTER, K., MACCALLUM, C.J., MACLEOD, M., PEARL, E.J., PETERSEN, O.H., RAWLE, F., REYNOLDS, P., ROONEY, K., SENA, E.S., SILBERBERG, S.D., STECKLER, T., WÜRBEL, H., 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biol.* 18, e3000410. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000410>

- SHAMS, S., AMLANI, S., BUSKE, C., CHATTERJEE, D., GERLAI, R., 2018. Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. *Dev. Psychobiol.* 60, 43–56. <https://doi.org/10.1002/dev.21581>
- SHAMS, S., CHATTERJEE, D., GERLAI, R., 2015. Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. *Behav. Brain Res.* 292, 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.061>
- SHAMS, S., SEGUIN, D., FACCIOL, A., CHATTERJEE, D., GERLAI, R., 2017. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. *Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.1037/bne0000220>
- SMAIL, M.A., SMITH, B.L., NAWREEN, N., HERMAN, J.P., 2020. Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits. *Pharmacol. Biochem. Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172993>
- SMITH, A.J., CLUTTON, R.E., LILLEY, E., HANSEN, K.E.A., BRATTELID, T., 2018. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab. Anim.* 52, 135–141. <https://doi.org/10.1177/0023677217724823>
- SOARES, S.M., KIRSTEN, K., POMPERMAIER, A., MAFFI, V.C., KOAKOSKI, G., WOLOSZYN, M., BARRETO, R.E., BARCELLOS, L.J.G., 2020. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according to controlled housing conditions. *Physiol. Behav.* 222, 112944. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2020.112944>
- SONG, C., LIU, B.-P.P., ZHANG, Y.-P.P., PENG, Z., WANG, J.J., COLLIER, A.D., ECHEVARRIA, D.J., SAVELIEVA, K. V., LAWRENCE, R.F., REX, C.S., MESHALKINA, D.A., KALUEFF, A. V., 2018. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 81, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.021>
- SONG, C., YANG, L., WANG, J., CHEN, P., LI, S., LIU, Y., NGUYEN, M., KALUYEVA, A., KYZAR, E.J., GAIKWAD, S., KALUEFF, A. V., 2016. Building neurophenomics in zebrafish: Effects of prior testing stress and test batteries. *Behav. Brain Res.* 311, 24–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.005>

- SPENCE, R., MAGURRAN, A.E., SMITH, C., 2011. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. *Anim. Cogn.* 14, 607–612. <https://doi.org/10.1007/s10071-011-0391-8>
- STEVENS, C.H., REED, B.T., HAWKINS, P., 2021. Enrichment for Laboratory Zebrafish—A Review of the Evidence and the Challenges. *Animals* 11, 698. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>
- STEWART, A., GAIKWAD, S., KYZAR, E., GREEN, J., ROTH, A., KALUEFF, A. V., 2012. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review, in: *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.037>
- STEWART, A.M., BRAUBACH, O., SPITSBERGEN, J., GERLAI, R., KALUEFF, A. V., 2014. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.* 37, 264–278. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2014.02.011>
- STEWART, A.M., CACHAT, J., GREEN, J., GAIKWAD, S., KYZAR, E., ROTH, A., DAVIS, A., COLLINS, C., EL-OUNSI, M., PHAM, M., KALUEFF, A. V., 2013. Constructing the habitume for phenotype-driven zebrafish research. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.026>
- STEWART, A.M., KALUYEVA, A.A., POUDEL, M.K., NGUYEN, M., SONG, C., KALUEFF, A. V., 2015. Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity. *Zebrafish* 12, 339–348. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1106>
- SULLIVAN, M., LAWRENCE, C., BLACHE, D., 2016. Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment for captive fish. *Applied Animal Behaviour Science*, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 174, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.10.011>
- SURIYAMPOLA, PIYUMIKA S., SHELTON, D.S., SHUKLA, R., ROY, T., BHAT, A., MARTINS, E.P., 2016. Zebrafish Social Behavior in the Wild. *Zebrafish*. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1159>
- SURIYAMPOLA, PIYUMIKA S, SYKES, D.J., KHEMKA, A., SHELTON, D.S., BHAT, A., MARTINS, E.P., 2016. Water flow impacts group behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Ecol.* 28, arw138. <https://doi.org/10.1093/beheco/arw138>

- TELES, M.C., OLIVEIRA, R.F., 2016. Androgen response to social competition in a shoaling fish. *Horm. Behav.* 78, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.10.009>
- THÖRNQVIST, P.-O., MCCARRICK, S., ERICSSON, M., ROMAN, E., WINBERG, S., 2019. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. *Behav. Brain Res.* 359, 927–934. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.017>
- THÖRNQVIST, P.O., MCCARRICK, S., ERICSSON, M., ROMAN, E., WINBERG, S., 2019. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. *Behav. Brain Res.* 359, 927–934. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2018.06.017>
- TOMS, C.N., ECHEVARRIA, D.J., 2014. Back to basics: Searching for a comprehensive framework for exploring individual differences in zebrafish (*Danio Rerio*) behavior. *Zebrafish* 11, 325–340. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0952>
- TONI, M., ANGIULLI, E., MICCOLI, G., CIONI, C., ALLEVA, E., FRABETTI, F., PIZZETTI, F., GRASSI SCALVINI, F., NONNIS, S., NEGRI, A., TEDESCHI, G., MAFFIOLI, E., 2019a. Environmental temperature variation affects brain protein expression and cognitive abilities in adult zebrafish (*Danio rerio*): A proteomic and behavioural study. *J. Proteomics* 204. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103396>
- TONI, M., MANCIOCCO, A., ANGIULLI, E., ALLEVA, E., CIONI, C., MALAVASI, S., 2019b. Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. *Anim. M., Manciocco, A., Angiulli, E., Allev. E., Cioni, C., Malavasi, S. (2019). Rev. Assess. fish Welf. Res. Aquac. with a Focus Eur. Dir. Anim.* 13(1), 161–170. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000940> 13, 161–170. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000940>
- TRAN, S., CHATTERJEE, D., GERLAI, R., 2014. Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish. *Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.1037/bne0000005>
- TRAN, S., GERLAI, R., 2013. Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.040>
- TRAN, S., NOWICKI, M., MURALEETHARAN, A., CHATTERJEE, D., GERLAI, R., 2016. Neurochemical factors underlying individual differences in locomotor activity and anxiety-like

behavioral responses in zebrafish. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 65, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.08.009>

TUDORACHE, C., SCHAAF, M.J.M.M., SLABBEKOORN, H., 2013. Covariation between behaviour and physiology indicators of coping style in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Endocrinol.* 219, 251–258. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0225>

TUDORACHE, C., SLABBEKOORN, H., ROBBERS, Y., HIN, E., MEIJER, J.H., SPAINK, H.P., SCHAAF, M.J.M., 2018. Biological clock function is linked to proactive and reactive personality types. *BMC Biol.* 16, 148. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0618-0>

VARGAS, R., BALASCH, J.C., BRANDTS, I., REYES-LÓPEZ, F., TORT, L., TELES, M., 2018. Variations in the immune and metabolic response of proactive and reactive *Sparus aurata* under stimulation with *Vibrio anguillarum* vaccine. *Sci. Rep.* 8, 17352. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35863-w>

VIGNET, C., BÉGOUT, M.L., PÉAN, S., LYPHOUT, L., LEGUAY, D., COUSIN, X., 2013. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish.* <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0871>

VITAL, C., MARTINS, E.P., 2013. Socially-Central Zebrafish Influence Group Behavior More than Those on the Social Periphery. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055503>

VOLGIN, A.D., YAKOVLEV, O.A., DEMIN, K.A., DE ABREU, M.S., ALEKSEEVA, P.A., FRIEND, A.J., LAKSTYGAL, A.M., AMSTISLAVSKAYA, T.G., BAO, W., SONG, C., KALUEFF, A. V., 2019. Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions. *J. Neurosci. Res.* <https://doi.org/10.1002/jnr.24337>

VOLGIN, A.D., YAKOVLEV, O. V., DEMIN, K.A., DE ABREU, M.S., ROSEMBERG, D.B., MESHALKINA, D.A., ALEKSEEVA, P.A., FRIEND, A.J., AMSTISLAVSKAYA, T.G., KALUEFF, A. V., 2018a. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. *Zebrafish* 15, 425–432. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1592>

VOLGIN, A.D., YAKOVLEV, O. V., DEMIN, K.A., DE ABREU, M.S., ROSEMBERG, D.B., MESHALKINA, D.A., ALEKSEEVA, P.A., FRIEND, A.J., AMSTISLAVSKAYA, T.G., KALUEFF, A. V., 2018b. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. *Zebrafish* 15, 425–432. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2018.1592>

VON KROGH, K., SØRENSEN, C., NILSSON, G.E., ØVERLI, Ø., 2010. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol. Behav.* 101, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.003>

WAFER, L.N., JENSEN, V.B., WHITNEY, J.C., GOMEZ, T.H., FLORES, R., GOODWIN, B.S., 2016. Effects of Environmental Enrichment on the Fertility and Fecundity of Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*

WEBER, D.N., GHORAI, J.K., 2013. Experimental Design Affects Social Behavior Outcomes in Adult Zebrafish Developmentally Exposed to Lead. *Zebrafish* 10, 294–302. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0780>

WHITE, L.J., THOMSON, J.S., POUNDER, K.C., COLEMAN, R.C., SNEDDON, L.U., 2017. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 132, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.08.017>

WILKES, L., OWEN, S.F., READMAN, G.D., SLOMAN, K.A., WILSON, R.W., 2012. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 139, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.03.011>

WOLFER, D.P., LITVIN, O., MORF, S., NITSCH, R.M., LIPP, H.-P., WÜRBEL, H., 2004. Cage enrichment and mouse behaviour. *Nat.* 2004 4327019 432, 821–822. <https://doi.org/10.1038/432821a>

WONG, K., ELEGANTE, M., BARTELS, B., ELKHAYAT, S., TIEN, D., ROY, S., GOODSPEED, J., SUCIU, C., TAN, J., GRIMES, C., CHUNG, A., ROSENBERG, M., GAIKWAD, S., DENMARK, A., JACKSON, A., KADRI, F., CHUNG, K.M., STEWART, A., GILDER, T., BEESON, E., ZAPOLSKY, I., WU, N., CACHAT, J., KALUEFF, A. V., 2010. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>

WONG, R.Y., FRENCH, J., RUSS, J.B., 2019. Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles. *R. Soc. Open Sci.* <https://doi.org/10.1098/rsos.181797>

WONG, R.Y., PERRIN, F., OXENDINE, S.E., KEZIOS, Z.D., SAWYER, S., ZHOU, L., DEREJE, S., GODWIN, J., 2012. Comparing behavioral responses across multiple assays of

stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behaviour*. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003018>

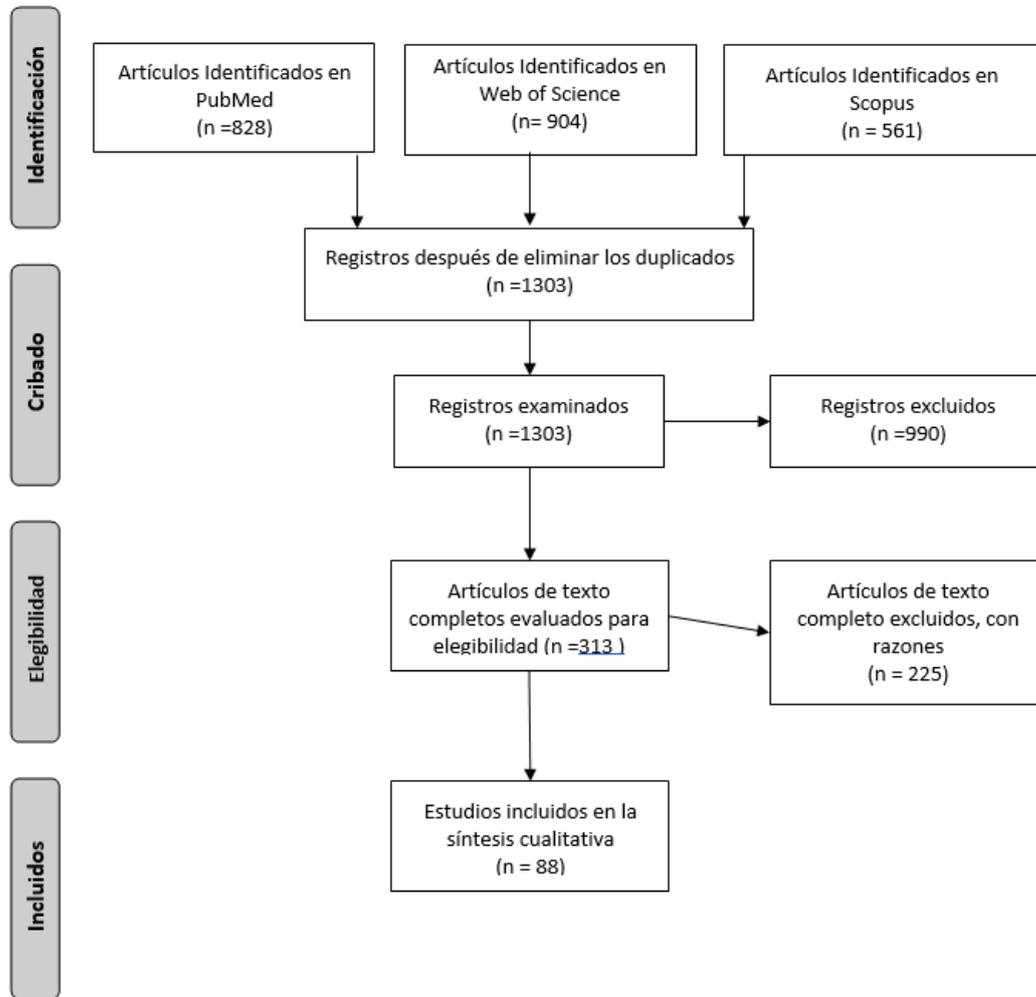
WOODWARD, M.A., WINDER, L.A., WATT, P.J., 2019. Enrichment increases aggression in zebrafish. *Fishes*. <https://doi.org/10.3390/fishes4010022>

YUAN, M., CHEN, Y., HUANG, Y., LU, W., 2018. Behavioral and Metabolic Phenotype Indicate Personality in Zebrafish (*Danio rerio*). *Front. Physiol.* 0, 653. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00653>

ZABEGALOV, K.N., KOLESNIKOVA, T.O., KHATSKO, S.L., VOLGIN, A.D., YAKOVLEV, O.A., AMSTISLAVSKAYA, T.G., FRIEND, A.J., BAO, W., ALEKSEEVA, P.A., LAKSTYGAL, A.M., MESHALKINA, D.A., DEMIN, K.A., DE ABREU, M.S., ROSEMBERG, D.B., KALUEFF, A. V., 2018. Understanding zebrafish aggressive behavior. *Behav. Processes* 158, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.11.010>

ZHANG, ZONGHANG, FU, Y., ZHANG, ZHEN, ZHANG, X., CHEN, S., 2021. A Comparative Study on Two Territorial Fishes: The Influence of Physical Enrichment on Aggressive Behavior. *Anim.* 2021, Vol. 11, Page 1868 11, 1868. <https://doi.org/10.3390/ANI11071868>

Figura 1 - Diagrama de flujo PRISMA



Fuente: PRISMA, 2022.

Tabla 1- Características del estudio y resultados de las manipulaciones para modelar la ansiedad

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Aponte et al. (2019).	Persecución con red 30 s	Adultos sexo mixto. No reporta radio.	Tipo salvaje	5-6/1 lt	30 s	Sin diferencia TN y claro/oscurio				Sin diferencias		
Gaikwad et al. (2011).	Exposición, Fermona de alarma; Pez hoja de la india	Adultos sexo mixto	TS, aleta corta	15/40 lts	6 mins cada estresor				Deterioro			
Piato et al. (2011).	Sujeción aguda etrés	Adultos machos	TS, aleta corta	20/15 lts	90 min	Incremento en TN			Deterioro		Incrementa expresion de señales prurinergicas	
Tran et al. (2014).	Persecución con red y exposición al aire 30 s	Adultos no reporta sexo	TS, aleta corta	1/2,7 lts	Una semana					Incrementa	Sin diferencias	
Wong et al. (2010).	Fermona de alarma; Substancias farmacológicas	Adultos sexo mixto	TS, aleta corta	20-30/40 lts	6-30 min, y 6 min por 7 días	Incremento en TN						
Chakravart y et al. (2013).	Protocolo de estrés crónico impredecible	Adultos sexo mixto	No reporta	No reporta	15 días	Incremento en TN y claro/oscurio		Incrementa			Disminuye Neurogenesis, Incrementa expresión en la señañlización del HPI, marcadores moleculares de ansiedad, BDNF y desregula 18 proteínas	
Manuel et al. (2014).	Protocolo de estrés crónico impredecible	Adultos sexo mixto	Tuebingen aleta larga	4/21 lts	7 y 14 días				Deterioro	Incrementa	Incrementa expresión en la señañlización del HPI y BDNF	
Piato et al. (2011).	Protocolo de estrés crónico impredecible	Adulto macho	TS, aleta corta	20/15 lts	7 o 14 días	Incremento en TN		Incrementa	Deterioro	Incrementa	Incrementa CRF y Disminuye GR	
Rambo et al. (2017).	Protocolo de estrés crónico impredecible	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	64/30 lts	7 días		Incrementa			Incrementa in males		
Song et al. (2018).	Protocolo de estrés crónico impredecible	Adultos sexo mixto	TS, aleta corta	60-70/60 lts	Cinco semanas	Incremento en TN				Incrementa	Incrementa densidad de espinas dendriticas y BDNF	Elevación de citoquinas proinflamatorias

Nota: TS= Tipo salvaje, TN= Tanque novedoso, HPI=Eje hipotalámico-pituitario interrenal, CRF=Factor liberador de las corticotropinas, GR=Receptor de glucocorticoides, BDNF= Factor neurotrófico derivado del cerebro

Tabla 2 – Características del estudio y resultados de las manipulaciones para incrementar la resiliencia al estrés en edad adulta

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Abreu et al. (2018)	Predador (e.g., <i>Tiger oscar</i> , <i>Astronotus ocellatus</i> ) y no predador (e.g., <i>Goldfish</i> , <i>Carassius auratus</i> )	Adultos sexo mixto	WT aleta corta	30/250 lts	Comienza a 3 días eclosión y testeado a 100 días				Disminuye		
DePasquale et al. (2016).	Objetos del enriquecimiento movidos semanalmente y persecución diaria con red	Juveniles no reporta sexo y machos adultos	Tipo salvaje	12/17,5 lts	Comienza a 25 eclosión y testeado a 53 días para ansiedad ,60 días para aprendizaje y 78 días MRI.	Disminuye in NT		Mejora		Incrementa tamaño de cerebro y telencefalo con enriquecimiento	
Fulcher et al. (2017).	Estrés crónico impredecible medio en aislados y socializados durante el desarrollo	Adultos sexo mixto	AB	Aislamiento 1/1,8 lts, grupo 5/2,8 lts	Comienza post-fertilization y testeado a 5 meses	Sin diferencias in NT	Disminuye			Incrementa dopamina en crianza social y 5-HIAA en crianza social y estresados	Incrementa peso en aislamiento
Lindsey and Tropepe, (2014).	Grupo, Aislamiento o Novedad-Social durante el desarrollo y la adultez	Adultos sexo mixto	AB	No reporta	Comienza a 5-6 días post-eclosión y testeado a 6 meses				Sin diferencias	Disminuye el número de células proliferativas mientras aumenta el número de neuronas nacidas en Aislamiento o Novedad Social	Disminuye tamaño y peso corporal en novedad después de aislamiento
R. Spence et al. (2011).	Genotipo y enriquecimiento	Machos adultos y una hembra por grupo	WIK y segunda generación WT-capturado	12/20 lts	Comienza a 5 días post-eclosión y testeado a 6 meses			Mejora			
Shams et al. (2018).	Aislamiento ( 0 a 180), aislamiento ( 0 a 7) y sin aislamiento	Adultos sexo mixto	AB	Aislamiento 1/1,4, grupo 5/2,8 lts	Comienza post-fertilization y testeado repetido a 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días	Disminuye en CA para aislamiento largo plazo	Disminuye para aislamiento largo plazo			Aislamiento social corto o largo reduced DOPAC	

Nota: TN=Tanque Novedoso, CA =Campo abierto, 5-HIAA= Metabolito serotonina, DOPAC=Metabolito dopamina

Tabla 3 - Estudiar características y resultados de las manipulaciones que evaluaron enriquecimiento ambiental vs empobrecimiento

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Preferencias	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales
Barcellos et al. (2018).	Musica (65–75 dB)	Adultos sexo mixto	WT aleta corta	1/1 lt	15 días		Disminuye in TN Sin diferencias en claro/oscurio			Sin diferencias	Elevada expresion de BDNF pero no c-fos y genes HPI	Disminuye expresion de Cytokinas pro-inflamatorias
Bhat et al. (2015).	Plantas plásticas sumergidas y corriente de agua	Adultos sexo mixto	WT capturado y de laboratorio	1/1 lt	20-25 minutos			Incrementa	Sin diferencias			Sin diferencias en reproduccion
C. Kistler et al. (2011).	Plantas ( <i>Ceratopteris thalictroides</i> ) y tarros de cerámica	Adultos sexo mixto	WT, Tü, AB, WIK, y albino	8/325 lts, 6,8 o 9/250 lts y 9/328 lts	26 días	Preferencia por enriquecimiento sobre estéril			Sin diferencias			
Collymore et al. (2015).	Planta artificial y alojamiento grupal vs aislamiento	Adultos sexo mixto	AB	10/2,5 lts	3- semanas	Preferencia poe conspecificos seguido por enriquecimiento sobre estéril	Disminuye in TN y claro/oscurio					
DePasquale and Leri, (2018).	Corriente de agua: 0.5 m/s en tunel durante una hora diaria y cinco días a la semana	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	5/18 lts	6 semanas		Disminuye en TN					
DePasquale et al. (2019).	Substrato arenoso, plantas plasticas y corriente de agua	Adultos sexo mixto	Comercial	8/18 lts	6 semanas	Preferencia por enriquecimiento y ejercicio sobre estéril						
Franks et al. (2018).	Sustrato de grava inclinada, rocas y plantas artificiales	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	10/110 lts	10 días				Cardumen elevado			
Giacomini et al. (2015).	Alojamiento grupal vs Aislamiento	Adultos sexo mixto	TS aleta corta	Aislamiento 1/12 lts, group 10/12 lts	Experimento 1 :15 y 30 días. Experimento 2: 15 días. Experimento 3 and 4 30 minutos.					Disminuye en Aislamiento		

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Preferencias	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Giacomini et al. (2016).	Alojamiento grupal o Aislamiento con o sin enriquecimiento (Arena, gravilla, tapas y plantas naturales).	Adultos sexo mixto	TS aleta corta	No reporta	15 Días						Disminuye para enriquecimiento y Aislamiento		
Graham et al. (2018).	Sustrato de grava en pendiente, rocas, cinco plantas artificiales y espacio adicional	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	10/110 lts	9 meses		Disminuye in TN	Disminuye	Incrementa				
Holley et al. (2014).	Previsibilidad del suministro de alimentos	No reporta	Tipo salvaje	50/75 lts	3 semanas y 48 horas								
Jones et al. (2019).	Sombra sobre el tanque y plantas artificiales	Adultos sexo mixto	AB aleta corta	36/54 lts	1 mes	Sin diferencias							
Keck et al. (2015).	Vivienda par o Aislamiento con o sin plantas plásticas	Alojamiento o individual de adultos machos, parejas de machos, parejas de machos y hembras	Tipo salvaje AB/India híbridos	1/1 lt and 2/2 lts	1, 5, o 10 días						Incremento en día 5 y Disminuye en día 10 para enriquecimiento		Incrementa sobrevivencia
Lee et al (2018).	Sexo, Sustrato de grava y plantas.	Machos y hembras separadas	WIK	11/3,5 lts	Tanque larvas (25 días), tanque cría (66 días), tanque novedosos (4 días), tanque de elección(33 días)	Sin diferencias	Disminuye in TN						Incrementa crecimiento hembras y sobrevivencia crías
Lee et al. (2018).	Entorno estable vs cambiante	Adultos sexo mixto	WYK	16/12 lts	3 semanas			Sin diferencias					Sin diferencias en crecimiento o reproducción
Manuel et al. (2015).	Dos semanas de exposición a recompensas	Adultos sexo mixto	Tupfel Longfin	4/2 lts	2 semanas					Reduce EI		Reduce cnr1 y crf	

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Preferencias	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales
Manuel et al. (2015).	Arena, plantas plásticas y una formación rocosa artificial.	Adultos sexo mixto	Tupfel cola larga	Experimento 1, 20-22/75 lts, experimento 2, 9-22-35/75 lts, experimento 3, 16-17/75 lts	Experiment 1, 6 meses, experiment 2, 12 meses, experiment 3, 24 meses		Disminuye en claro/oscuro		Reduce EI		Disminuye proliferación celular, neurod, cart4 and cnr1 and Incrementa mr y gra, grβ	
Marcon et al. (2018).	Piedras marinas inglesas de grava, un objeto de plástico en forma de ruina y tres plantas de plástico sumergidas	Adultos sexo mixto	TS cola corta	48/19 lts	21 días or 28 días		Disminuye in TN después de estrés crónico impredecible			Disminuye		
Parker et al. (2012).	GHC, GHN, PHC, PHV, PHO and IH.	No reporta	TS cola corta	(GHC) 4-5/ 5 lts, (GHN) 10/100lts, (PHC) , (PHV) (PHO) 2/1 lt and (IH) 1/1 lt	2 semanas		Disminuye in TN para aislamiento			Disminuye para aislamiento		
Reolon et al. (2018).	Segregado vs sexo mixto	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	1.6/1 lt	1 semana		Disminuye en CA para machos segregados		Reduce EI	Incrementa en sexo mixto		Incrementa crecimiento para segregado
Rosemberg et al. (2011).	Confinamiento en ambientes oscuros y brillantes	Adultos sexo mixto	TS cola corta	1/0,5 lts	10 mins		Disminuye in TN para brillante					
Schroeder et al. (2014).	Arena, grava, planta sumergida y flotante, piedra de aire e imágenes de arena y grava	Adultos sexo mixto	AB	10/10 lts	5 días	Preferencia por enriquecimiento sobre estéril						
Shams et al. (2015).	Alojamiento grupal vs Aislamiento	Adultos sexo mixto	AB	Aislamiento:1/1 ,41 lts. Group 5/9,51 lts	90 días		Disminuye en CA para aislamiento			Disminuye para aislamiento	Serotonina disminuye en Aislamiento	
Shams et al. (2017).	Alojamiento grupal vs Aislamiento	No reporta	AB strain	5/2,8 lts, Aislamiento 1/1,4 lts	24 hrs and 180 días.		Sin diferencias	Sin diferencias			Serotonin Incrementa en grupos después de aislamiento, 5HIAA y DOPAC Disminuye en aislamiento	

Tabla 3 - (continúa)

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Preferencias	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Suriyampola et al. (2016).	Arena vacía, obstrucciones, agua que fluye y agua que fluye y obstrucciones	Adultos sexo mixto	WT capturado	6/ 37.8 lts	20 hours			Incrementa	Disminuye				
von Krogh K. et al. (2010).	Piedras de mar inglesas y 11 imitaciones de plantas.	Adulto macho	Comercial	8/15 lts	7 días						Incrementa	Incrementa proliferación celular	Sin diferencias en crecimiento
Weber and Ghorai, (2013).	Refugio	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	12/3 lts	2 horas y 24 horas			Disminuye					
White et al. (2017).	Alojamiento grupal o parejas o Aislamiento con y sin plantas plásticas	Adulto macho	AB	1/5 lts and 6/5 lts	2 semanas		Disminuye en Alojamiento grupal				Incrementa in parejas		
Wilkes et al. (2012).	Estructuras de varillas verticales	No reporta	WIK	6/12 lts	1,2,4 o 7 días		Incrementa in TN	Incrementa	Sin diferencias		Sin diferencias		
Woodward, M. A., Winder, L. A., & Watt, P. J. (2019).	Plantas y macetas con papel (un diseño de paisaje marino azul)	Adultos sexo mixto	Nacre	10/10 lts	1, 3, 6 y 9 semanas		Incrementa en CA	Incrementa					Incrementa crecimiento y reproducción

Nota: WT= Tipo salvaje, TN= Tanque novedoso, =Prueba de campo abierto, TS=Tipo salvaje, WIK=Cariotipo indio salvaje, Tü= Tübingen, GHC=Grupo alojado con contacto, GHN=Grupo alojado con sin contacto ,PHC= Pareja alojada con contacto, PHV= Pareja alojada con contacto visual, PHO= Pareja alojada con contacto olfativo, IH= Peces alojados individualmente, EI= Evitación inhibitoria, HPI= Eje hipotalámico-pituitario-interrenal, ECI= Estrés crónico impredecible, neurod = diferenciación neurogénica, cart4 = transcripción 4 regulado por cocaína y anfetamina, cnr1 = receptor de cannabinoides 1, mr = receptor de mineralocorticoide ,gr $\alpha$ =receptor de glucocorticoides a, gr $\beta$ =receptor de glucocorticoides b, crf=factor de liberación de coticotropina

Tabla 4 - Características del estudio y resultados de las manipulaciones que evaluaron condiciones estresantes de bajo nivel de vivienda y crianza

Artículo	Elementos	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Duración	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Formación Cardumen	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Angiulli et al. (2020).	Temperatura	Adultos sexo mixto	AB	1/1 lts	21 días	Disminuye en TN y CO para 34 °C	Reduce para 34 °C	Reduce para 34 °C				
Castranova et al. (2011).	Densidad	Adultos sexo mixto	Wild-type EK,AB,Tu AB y AB*TL1f1	3, 6, or 12 pez/lts	3 meses							Sin diferencias
Gronquist and Berges, (2013).	Diferentes niveles de hacinamiento, iluminación, períodos de privación de alimentos y vibraciones.	Adultos sexo mixto	Comercial	0.13 to 1.2 pez/lt	10 días		Sin diferencia			Disminuye para privación de alimento		
Pavlidis et al. (2013).	Hacinamiento, entorno social, calidad del agua, manejo y color de fondo	Adultos machos	Tipo salvaje	0,2/1 lt; 2,5,10,20/0,5 lts or 10/2,10/1,10/0,5, 20/0,5 lts. ;2,3,4,5,10/1 lt y 12/5 lts	2 h (exposición corta) y 5 días (exposición larga) exposición)		Incrementa para grupos pequeños y tamaño pequeño de tanques			Incrementa para grupos pequeños y tamaño pequeño de tanques		
Pavlidis et al. (2015).	Factores estresantes ambientales y de cría agudos, de bajo o alto grado a largo plazo	Adultos machos	Tipo salvaje	No Informa	Agudo 6 minutos, a largo plazo 12 días	Incrementa en TN		Sin diferencia		Incrementa	Incrementa expresión de señalización HPI, pomc, prl, hcrt y c-fos	
Rabbane et al. (2017).	Densidad	No reporta	Glo fish	5, 15, 25, 35 y 45/2 lts	60 días							Disminuye ganancia de peso, crecimiento y longitud para densidades altas Disminuye supervivencia para altas densidades
Ribas et al. (2017).	Densidad	No reporta	AB	9, 19, 37 y 74/ 1 lts	3 meses					Incrementa para altas densidades		
Stewart et al. (2015).	Hora del día, manejo, diferentes días, lote y orden de prueba	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje cola corta	60–70/60 lts	20 minutos	Diferencias en TN para días de prueba y dos lotes diferentes						
Toni et al. (2019).	Temperatura	Adultos sexo mixto	Tipo salvaje	33/33 lts	21 días.				Detrimiento para 18 °C y 34 °C		Las proteínas asociadas a las sinapsis y la liberación de neurotransmisores se regulan a la baja a 18 °C y 34 °C.	

Nota: TN=Tanque Novedoso, CO=Prueba de claro/oscuridad, HPI=Eje hipotalámico-pituitario-interrenal, pomc=Proopiomelanocortina, prl=prolactina, hcrt=hipocretina/orexina, BDNF=factor neurotrófico derivado del cerebro.

Tabla 5 - Influencias de la personalidad en el estrés y la calidad de vida

Artículo	Genotipo	Sexo y etapa	Densidad poblacional	Determinación Personalidad	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Ariyomo and Watt, (2012).	Nacre	Adultos machos y hembras separados	20-30/10 lts	Osadía en CA						Mayor reproducción para Osadía
Baker and Wong, (2019).	WT capturado	Adultos sexo mixto diferentes proporciones	1/3 lts	Selection para HSB y LSB en CA	Más alto para LSB		Mejor aprendizaje y memoria para reactivos.			
Baker et al. (2018).	WT capturado	Adultos sexo mixto diferentes proporciones	1/3 lts	HSB y LSB en CA	Más alto para LSB					
Dahlbom et al. (2011).	WT capturado	Adultos machos y hembras separados	1/2,8 lts	Campo abierto, búsqueda de refugio y objeto novedoso.	Más alto para reactivo					
Fontana et al. (2019).	AB	Adultos sexo mixto	20/2,8 lts	Respuestas sesgadas a la izquierda y a la derecha del laberinto en Y					Los animales sesgados aprenden mejor	
Kareklas et al. (2018).	Tipo salvaje	Adultos machos	10/25 lts	Latencia para acercarse al juguete novedoso y al alimento novedoso.					Sin diferencias	
Kern et al. (2016).	Tipo salvaje	Adultos sexo mixto	No reporta	HSB y LSB en CA						No diferencias en crecimiento
Oswald et al. (2012).	Scientific Hatcheries	Adultos sexo mixto	1 to 5/3Lts	Geotaxis, latencia para iniciar la alimentación y niveles de exploración				Sin diferencias	Crh inferior y 11b-hsd, GR y BDNF para Osado	No diferencias en crecimiento
Rey et al. (2015).	TS cola corta	No reporta	Proactive 6/180 lts, Reactive y control 10/180 lts	Prueba de emerger	Más alto para reactivo					
Stewart et al. (2013).	TS cola corta	Adultos sexo mixto	20-30/20 lts	Osadía en CA					Sin diferencias	
Thörnqvist et al (2019).	AB	Adultos machos	24-37/9,4 lts	Osadía en CA					Superior D2, drd2a, drd2b y oprd1b para Osada	
Toms and Echevarria, (2014).	Comercial	Adultos machos	1/0,2 lts	CA, prueba de espejo, prueba de emerger, objeto novedoso y prueba de exposición a depredadores	Más alto para reactivo					
Tran and Gerlai, (2013).	TS cola corta	Adultos sexo mixto	37/15 lts	HSB y LSB en CA	Más alto para LSB					
Tran et al. (2016).	TS cola corta	Adultos sexo mixto	20/37 lts	HSB y LSB en TN					Serotonina más alta para reactivos	

Tabla 5 - (Continúa).

Artículo	Genotipo	Sexo y etapa	Densidad poblacional	Determinación Personalidad	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Agresión	Aprendizaje	Cortisol	Resultados Neuronales	Eficacia Biológica
Tudorache et al. (2013).	ABTL	Adultos sexo mixto	12/7,5 lts	Prueba emerger				Alto para reactivo	Sin diferencias para GR $\alpha$ , GR $\beta$ y MR	
Tudorache et al. (2018).	Cruce de AB y Tüpfel cola corta	Adultos sexo mixto	40/7,5 lts	Prueba emerger	Alto para reactivo	Alto para proactivo		Menor fluctuación para reactivo		
Vargas et al. (2018).	Tipo salvaje, línea UAB de color homogéneo y color indefinido de tipo salvaje (TS-I)	Adulto machos y hembras separados	Par/1.4 lts and Machos adultos 8/40 lts	Prueba emerger						Sin diferencias en crecimiento, Mayor reproducción para osado
Vital and Martins, (2013).	Línea SH y cepa PN	Adultos sexo mixto	4/18,9 lts	Peces clave en la cohesión del cardumén			Sin diferencias			
Wong et al. (2012).	Capturado salvaje y AB criados selectivamente por la cantidad de comportamiento estacionario (líneas alta y baja)	Adultos sexo mixto diferentes proporciones	No reporta	HSB y LSB en CA	Alto para LSB					
Wong et al. (2019).	WT capturado	Adultos sexo mixto	200/10 galones	HSB y LSB en CA	Alto para LSB			Alto para reactivo		
Yuan et al. (2018).	AB	Hembras adultas	No reporta	HSB y LSB en test de salinidad		Alto para proactivo				Mayor tasa metabólica para osado
Zajitschek et al. (2017).	AB	Machos adultos	No reporta	TN, CA, objeto novedoso y refugio						Sin diferencias en reproduction

TS=tipo salvaje, HSB=comportamiento estacionario alto, LSB=comportamiento estacionario bajo, TN=Tanque Novedoso, CA=prueba de campo abierto, D2=receptor de dopamina, (drd2a , drd2b y oprd1b)=receptores opioides delta, mr=receptor de mineralocorticoides, gr $\alpha$ =receptor de glucocorticoides a, gr $\beta$ =receptor de glucocorticoides b

Tabla 6 - Influencias del genotipo sobre el estrés y la calidad de vida

Artículo	Sexo y etapa	Genotipo	Densidad poblacional	Comportamientos relacionados a la ansiedad	Formación Cardumen	Agresión	Aprendizaje	Cortisol	Resultados neuronales	Eficacia Biológica
Gorissen et al. (2015).	TL y AB	Adultos sexo mixto diferente proporción	36 y 44/75 lts				TL mayor que AB	AB más alto que TL	AB Cerebro mayor expresión de crf, gr-b, BDNF, pcna, neurod1, cart4, igf1, soc3a, mpeg 1.1 y 1.2 que TL	
Quadros et al. (2016).	TS y Leo	Adultos sexo mixto	4/ 1 lt	En cilindro Más alto en Leo que TS; En TN y CO el TS sin estrés menos ansioso y TS estresado más ansioso						
Sackerman et al. (2010).	AB y WIK ,GloFish® y PETCO	Adultos sexo mixto	No reporta	Más alto en AB que WIK; Más alto en AB que PETCO o GloFish®.						
Kenney et al. (2017).	AB, Tu, y TL	Adultos sexo mixto	7-11/2 lts				Tu mayor extinción que AB y TL			
Meyer et al. (2013).	AB, Tu, TL, SJA, WIK, y PET	Adultos sexo mixto	6/ 1 lt							Mayor glucosa en AB, PET, TL, y TU que SJA y WIK
Vignet et al. (2013).	AB y TU	Machos adultos	No reporta	Más alto en Tu que AB			AB mayor que TU			
Maximino et al. (2013).	TS cola larga y leo	No reporta	20/40 lts	Más alto en Leo que TS					Leo menor serotonina y mayor recambio de serotonina	
Roy et al. (2019).	WT capturado	Adultos sexo mixto	15/8,5 lts				WT capturado mayor que doméstico			
Mustafa et al. (2019).	WT capturado, AB y <i>fgfr1a</i>	Adultos sexo mixto	18/9.5 Lts	Más alto en WT capturado que AB y <i>fgfr1a</i>		Sin diferencias				
Barba-Escobedo y Gould, (2012).	AB,WIK, golden y TS cola corta	Adultos sexo mixto	<b>6-8/3 lts</b>		Más alto en AB que WIK, golden y TS cola corta.					

Tu= Tuebingen, TL= Tupfel Cola larga, WIK= Cariotipo indio salvaje, *fgfr1a*=spiegeldanio, TS=Tipo salvaje, Leo=leopardo, PET=tienda de mascotas. TN= Tanque nuevo, CO= claro/oscurito, crf=factor liberador de corticotropina, gr-b=receptor b de glucocorticoides, BDNF=factor neurotrófico derivado del cerebro, pcna=antígeno nuclear de células en proliferación, neurod1=diferenciación neuronal 1, cart4=cocaína- y transcripción regulada por anfetamina 4, igf1 = factor de crecimiento similar a la insulina 1, soc3a = supresor de la señalización de citoquinas 3a, mpeg = expresión de macrófagos.

Table 7 - Evaluación del riesgo de sesgo.

Artículo	Secuencia generada adecuadamente	Características de línea base	Ocultamiento de asignación	Vivienda aleatoria	Experimento ciego	Evaluación aleatoria de resultados	Evaluación de resultados cegada	Datos de resultados incompletos	Informe selectivo de resultados	Otras fuentes de sesgo
Abreu et al. (2018)	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Angiulli et al. (2020).	?	sí	no	?	?	?	?	?	sí	?
Aponte et al. (2019).	?	sí	?	sí	sí	sí	?	?	sí	sí
Ariyomo y Watt, (2012).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Baker y Wong, (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Baker et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Barba-Escobedo y Gould, (2012).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Barcellos et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Bhat et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
C. Kistler et al. (2011).	?	no	?	?	?	?	?	sí	?	?
Castranova et al. (2011).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Chakravarty et al. (2013).	?	No	?	?	?	?	?	?	?	?
Collimore et al. (2015).	?	sí	?	?	?	sí	sí	?	?	?
Dahlbom et al. (2011).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
DePasquale y Leri, (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
DePasquale et al. (2016).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
DePasquale et al. (2019).	?	sí	?	?	sí	sí	sí	?	?	?
Fontana et al. (2019).	?	sí	sí	sí	sí	sí	sí	?	?	?
Franks et al. (2018).	?	sí	?	?	sí	sí	sí	?	sí	?
Fulcher et al. (2017).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Gaikwad et al. (2011).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Giacomini et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Giacomini et al. (2016).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Gorissen et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Graham et al. (2018).	?	sí	?	?	no	sí	sí	?	?	?
Gronquist y Berges, (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Holley et al. (2014).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Jones et al. (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Kareklas et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Keck et al. (2015).	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Kenney et al. (2017).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Kern et al. (2016).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Lee et al (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Lee et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Lindsey y Tropepe, (2014).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Manuel et al. (2014).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Manuel et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Manuel et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Marcon et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Maximino et al. (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Meyer et al. (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Mustafa et al. (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Oswald et al. (2012).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Parker et al. (2012).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Pavlidis et al. (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Pavlidis et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Piato et al. (2011).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Piato et al. (2011).	?	sí	?	?	sí	sí	?	?	?	?

Table 7- (Continued).

Artículo	Secuencia generada adecuadamente	Características de línea base	Ocultamiento de asignación	Vivienda aleatoria	Experimento ciego	Evaluación aleatoria de resultados	Evaluación de resultados cegada	Datos de resultados incompletos	Informe selectivo de resultados	Otras fuentes de sesgo
Quadros et al. (2016).	?	no	?	?	?	sí	sí	?	?	?
R. Spence et al. (2011).	?	sí	no	?	?	?	?	?	?	?
Rabbane et al. (2017).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Rambo et al. (2017).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Reolon et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Rey et al. (2015).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Ribas et al. (2017).	?	?	?	?	?	?	?	?	sí	?
Rosemberg et al. (2011).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Roy et al. (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Sackerman et al. (2010).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Schroeder et al. (2014).	?	sí	sí	sí	?	sí	sí	?	?	?
Shams et al. (2015).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Shams et al. (2017).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Shams et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Song et al. (2018).	?	sí	?	?	no	sí	sí	?	sí	?
Stewart et al. (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Stewart et al. (2015).	?	sí	?	?	no	?	?	?	sí	?
Suriyampola et al. (2016).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Thörnqvist et al (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Toms y Echevarria, (2014).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Toni et al.(2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Tran y Gerlai, (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Tran et al. (2014).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Tran et al. (2016).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Tudorache et al. (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Tudorache et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Vargas et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Vignet et al. (2013).	?	no	?	?	?	sí	?	?	?	?
Vital y Martins, (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
von Krogh K.et al. (2010).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Weber y Ghorai, (2013).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
White et al. (2017).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Wilkes et al. (2012).	?	no	?	?	?	?	?	?	?	?
Wong et al. (2010).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Wong et al. (2012).	?	sí	?	?	sí	?	?	?	?	?
Wong et al. (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Woodward y Watt, (2019).	?	sí	?	?	?	?	?	?	sí	?
Yuan et al. (2018).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?
Zajitschek et al. (2017).	?	sí	?	?	?	?	?	?	?	?

Nota. Informe de preguntas: una puntuación de 'sí' indica 'reportado', y una puntuación de 'no' indica 'no informado'. Preguntas sobre riesgo de sesgo: "sí" indica bajo riesgo de sesgo; una puntuación de "no" indica un alto riesgo de sesgo; y una puntuación "?" indica un riesgo desconocido de sesgo

### 3.2 Artículo II

Jhon Buenhombre, Amauri Gouveia Jr, Erika Alexandra Daza-Cardona, Pessi Sousa, María Nelly Cajiao-Pachón. (2022). Environmental enrichment and different levels of it influence zebrafish affective states and cognition. *Animal Cognition*-Publicado.

#### **El enriquecimiento ambiental y sus diferentes niveles influyen en los estados afectivos y la cognición del pez cebra.**

##### **RESUMEN**

El enriquecimiento ambiental (EA) puede modular los estados afectivos e inducir o reducir las respuestas de estrés y la cognición que acompañan a estas respuestas. Por ejemplo, el EA suele reducir los comportamientos relacionados con la ansiedad, mejorar la cognición y aumentar la salud y la eficacia biológica. Sin embargo, ciertos tipos de EA o en algunas condiciones, generan efectos contrarios. Además, el EE es una gran herramienta para tener varias variables bajo control en un momento dado. Entonces, es esencial estudiar qué aspectos del EA modulan el comportamiento y los estados afectivos. Para empezar a entender esto, utilizamos dos pruebas (claro/oscuro y actividad) para analizar los efectos del EA en las conductas de ansiedad. A continuación, transpusimos el paradigma del sesgo de juicio cognitivo, utilizado anteriormente en otros animales, para evaluar objetivamente el impacto del EA en los estados afectivos del pez cebra. Los peces que experimentaron un EA constante mostraron menos comportamientos de ansiedad. Los peces que experimentaron un cambio en las condiciones de alojamiento (aumento repentino o disminución gradual del EA) mostraron más comportamientos relacionados a la ansiedad. Y en el caso de un aumento repentino del EA, también mostraron un sesgo más pesimista relacionado con un estado afectivo negativo. Entonces, el EE por sí mismo y las características del EE como su aumento o disminución pueden alterar el comportamiento, la cognición y los estados emocionales relacionados del pez cebra.

**Palabras clave:** Enriquecimiento ambiental, Sesgo de juicio cognitivo, Claro/oscuro, Estado afectivo, Cognición, Pez cebra.

## ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) can modulate the affective states and induce or reduce stress responses and cognition accompanying these answers. For instance, EE generally reduces anxiety-related behaviours, improves cognition, and increase health and biological fitness. However, certain types of EE or, under some conditions, generate the opposite effects. Moreover, EE is a great tool to have several variables under control at a given one time. Then it is essential to study what aspects of EE modulate behaviour and affective states. To begin understanding this, we used two battery tests (Light/dark and Salinity tests) to analyse the effects of EE on anxiety-like behaviours. We then transposed the cognitive judgment bias paradigm, formerly used in other animals, to objectively assess the impact of EE on affective states in zebrafish. Fishes that experienced constant EE showed less anxiety-like behaviour. Fishes that experienced a switch in housing conditions (sudden increase or gradual decrease in EE) showed more anxiety-like behaviours. And in the case of a sudden increase in EE, they showed a more pessimistic bias related to a negative affective state. Then EE by itself and EE's characteristics such as their increase or decrease can alter zebrafish's behaviour, cognition and related emotional states.

**Key Words:** Environmental enrichment, Judgement bias, Light/dark, Affective state, Cognition, Zebrafish.

## INTRODUCCIÓN

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en uno de los organismos modelo más utilizados en muchos campos de investigación (por ejemplo, (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; VOLGIN et al., 2019). Entonces, es esencial estudiar sus estados afectivos ya que esta especie puede proporcionar una visión fundamental sobre el origen evolutivo de estos procesos (CERQUEIRA et al., 2017) ya que ofrecería muchas convergencias y diferencias subyacentes entre diferentes taxones (GERLAI, 2020). Por lo tanto, el estudio de los estados afectivos del pez cebra es muy relevante para las disciplinas que se basan en modelos animales para analizar las emociones y evaluar el bienestar del pez cebra (COLLIER; KALUEFF; ECHEVARRIA, 2017; UTNE-PALM; SMITH, 2020).

Hay muchas definiciones ("estado emocional", "estado de ánimo", "afecto") sobre lo que es un estado afectivo (PAUL; MENDEL, 2018). Aquí utilizaremos el término estado afectivo como un término paraguas para la emoción y el estado de ánimo. Un estado afectivo es el resultado de experiencias positivas o negativas y produce una respuesta multicomponente a esas experiencias que puede medirse objetivamente mediante marcadores fisiológicos, neurológicos, conductuales y cognitivos (LAUBU; LOUÂPRE; DECHAUME-MONCHARMONT, 2019). Además, los estados afectivos están estrechamente asociados a los procesos cognitivos y, a la inversa, los procesos cognitivos influyen en los estados afectivos (MENDEL; BURMAN; PAUL, 2010; MENDEL; PAUL, 2020; PAUL; HARDING; MENDEL, 2005). Podemos utilizar esta relación bidireccional para evaluar los estados afectivos de forma objetiva.

El término "sesgo cognitivo" se ha utilizado generalmente para etiquetar las influencias de los estados afectivos en los procesos de decisión (CARRERAS UBACH, 2016). Por ejemplo, se ha observado que los estados afectivos sesgan la atención, la memoria y la toma de decisiones en varias especies (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; BETHELL, 2015; GYGAX, 2014; KOŠŤÁL; SKALNÁ; PICHOVÁ, 2020; ROELOFS et al., 2016). Este sesgo se evidencia cuando los animales en condiciones inadecuadas prestan más atención a los incidentes negativos que a los positivos (sesgo de atención) (CRUMP; ARNOTT; BETHELL, 2018) y pueden recordar más fácilmente los eventos adversos que los positivos (sesgo de memoria) (BURMAN; MENDEL, 2018). Los resultados opuestos se generan en animales mantenidos en condiciones óptimas. Además, cuando los animales reciben estimulación positiva (definida aquí como algo por lo que un animal está dispuesto a trabajar y que aparentemente genera un estado afectivo positivo, como la búsqueda de comida), sobrestiman

la probabilidad de ganancia (sesgo de juicio positivo). Por el contrario, cuando reciben una estimulación negativa (definida aquí como algo que un animal tratará de evitar y que probablemente genera un estado afectivo negativo, como la presencia de un depredador), sobreestiman la probabilidad de pérdida (sesgo de juicio negativo) (LAUBU; LOUÂPRE; DECHAUME-MONCHARMONT, 2019; MENDEL; PAUL, 2020). Entonces, los sesgos de juicio cognitivo en respuesta a estímulos ambiguos pueden permitirnos evaluar la variación de la valencia emocional.

En consecuencia, una métrica alternativa y prometedora para evaluar el estado afectivo del pez cebra podría ser el uso de una tarea de sesgo de juicio. Esta prueba se ha propuesto como un procedimiento estándar para medir los estados afectivos de los animales durante períodos prolongados (BATESON; NETTLE, 2015; MARCHANT-FORDE, 2015). Por ejemplo, los animales que viven en condiciones de alojamiento estériles (ANDERSON et al., 2021; DOUGLAS et al., 2012; KREMER et al., 2021) o imprevisibles (*e.g.*, (HARDING; PAUL; MENDEL, 2004; ZIDAR et al., 2018) y que experimentan procedimientos ambientales (ENKEL et al., 2009; MENDEL; PAUL, 2020; NOWORYTA et al., 2021) y farmacológicos (NEVILLE et al., 2020) deletéreos pueden mostrar juicios negativos al evaluar estímulos ambiguos. Por el contrario, el EA en varias especies (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; BETHELL, 2015; GYGAX, 2014; KOŠŤÁL; SKALNÁ; PICOVÁ, 2020; ROELOFS et al., 2016) y las interacciones sociales positivas en los peces, como el emparejamiento con una pareja compatible (LAUBU; LOUÂPRE; DECHAUME-MONCHARMONT, 2019), pueden inducir un sesgo de juicio positivo al evaluar estímulos ambiguos.

La medición de los marcadores conductuales y fisiológicos de los estados afectivos muestra que los peces cebra mantenidos en acuarios estériles estándar presentan signos de respuesta desadaptativa hacia el estrés, que podrían ir acompañados de estados afectivos negativos (BUENHOMBRE et al., 2021; NÄSLUND; JOHNSON, 2016a; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021) Por el contrario, los peces cebra alojados con EA suelen estar protegidos del impacto fisiológico o psicológico perjudicial que generan los retos/estresores, en comparación con los controles alojados de forma estándar (BUENHOMBRE et al., 2021; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021; VOLGIN et al., 2018a). Sin embargo, al añadir EA, algunos estudios no encontraron diferencias (SHAMS et al., 2017) o evidenciaron un aumento de los comportamientos relacionados a la ansiedad (WILKES et al., 2012; WOODWARD; WINDER; WATT, 2019) y las conductas agonísticas (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015; WILKES et al., 2012; WOODWARD; WINDER; WATT, 2019). Algunos estudios también

han encontrado una reducción de la memoria (evitación inhibitoria) (GORISSEN et al., 2015; MANUEL et al., 2015c) y las pruebas son contradictorias en cuanto a los efectos del EA en las medidas de cortisol, la morfología cerebral, la plasticidad y la expresión génica (STEVENS; REED; HAWKINS, 2021). Los estudios sobre el EA en el pez cebra acaban de empezar, y los mecanismos que subyacen a los efectos positivos y negativos están aún por evaluarse y descubrirse.

En el presente estudio, investigamos los impactos de tres niveles de EA (Ninguno, Medio, Alto) y los efectos de diferentes cambios en estos niveles o condiciones de alojamiento (aumento gradual, disminución gradual, aumento repentino, disminución repentina y permanecer constante) sobre el estado afectivo de los peces cebra utilizando una prueba de sesgo de juicio, una prueba de claro/oscuro y una prueba de actividad. Predecimos que los peces en condiciones de EA y constantes y predecibles reducirían los comportamientos de ansiedad y mostrarían un sesgo de juicio positivo frente a los estímulos ambiguos. Esperamos los resultados opuestos para los peces alojados en condiciones estériles y variables.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Todos los procedimientos de los experimentos se hicieron de acuerdo con el Consejo Nacional de Control de la Experimentación Animal (CONCEA) de Brasil. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Federal de Pará, Brasil (CEUA / UFPA protocolo 9868261118/2019).

### **Sujetos y mantenimiento.**

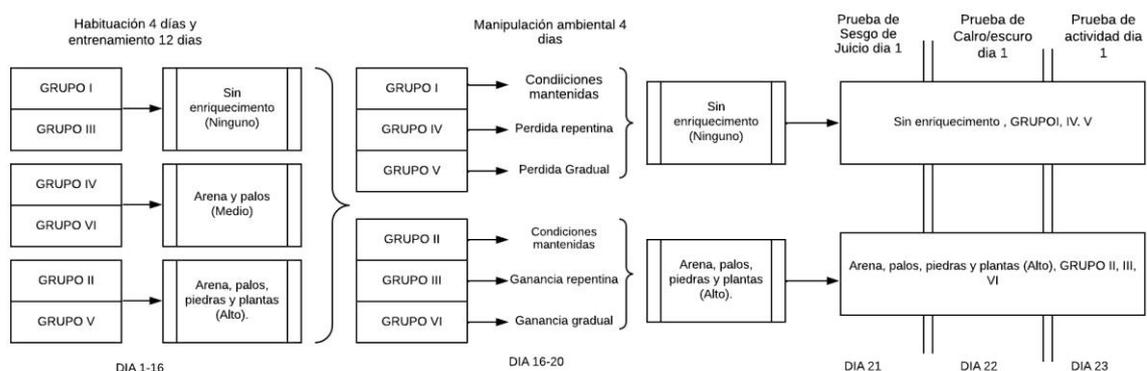
Para este estudio se adquirió un total de 99 peces cebra adultos de un año de edad de aleta corta tipo salvaje. Los peces fueron comprados a un proveedor comercial local y puestos en cuarentena durante tres meses en las instalaciones del laboratorio de la Universidad del Pará (NTPC). Durante la cuarentena, los peces fueron agrupados en tanques Tecniplast® Stand-Alone Tank (16,65 x 21,07 x 5,54 cm) con aireación constante y en un circuito de agua abierto, bajo las siguientes condiciones: temperatura=  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; pH= 6,5; oxígeno disuelto >90%; fotoperíodo de 14 L: 10 D, con luces encendidas a las 06:00 h; densidad de 6 peces por litro; y los peces fueron alimentados dos veces al día a las 8:00 y a las 14:00 con una dieta comercial Tetra Flocculated Feed®.

Durante la fase experimental, los peces fueron transferidos a acuarios de tanque de vidrio (21 L; 35 de largo x 25 de ancho x 25 cm de alto) equipados con aireación continua

proporcionada por una bomba de aire. El agua se cambió parcialmente (30%) cada dos días durante todo el experimento y los peces se mantuvieron bajo características similares a las descritas anteriormente para la cuarentena.

En este estudio, realizamos dos experimentos. En el primer experimento, se utilizaron 27 de los 99 peces para comprobar si los peces podían recordar una tarea de discriminación cuatro días después del entrenamiento. Estos 27 peces se dividieron aleatoriamente en tres grupos de tratamiento: 9 bajo nivel de enriquecimiento alto, 9 bajo nivel de enriquecimiento medio y 9 sin enriquecimiento. En el segundo experimento, se utilizaron los 72 peces restantes para las pruebas de sesgo de juicio, claro/oscurito y actividad. Estos 72 peces se dividieron aleatoriamente en seis grupos experimentales de 12 individuos por grupo ( $n=12/\text{tratamiento}$ ). Grupo I, control (tiempo completo sin enriquecimiento), II (enriquecimiento completo), III (aumento gradual del enriquecimiento), IV (disminución gradual del enriquecimiento), V (aumento repentino del enriquecimiento) y VI (disminución repentina del enriquecimiento). Como dos peces del grupo V y dos del grupo VI no respondieron en las sesiones de habituación y entrenamiento inicial del experimento, los números finales de estos grupos fueron V,  $n=10$ ; VI,  $n=10$ .

Figura 2 - Cronograma del estudio que describe la secuencia de procedimientos utilizados durante el experimento 2 y su duración



**Fuente:** Elaboración propia. Creado: Lucidchart **Leyenda:** Cronograma del estudio que describe la secuencia de procedimientos utilizados durante el experimento 2 y su duración: Entrenamiento de habituación y discriminación (días 1-16); manipulación ambiental (días 16-20); prueba de sesgo de juicio (día 21); prueba de claro/oscurito (día 22); prueba de actividad (día 23).  $n=68$ .

### Procedimiento experimental.

Realizamos todas las pruebas de comportamiento y las manipulaciones entre las 6:00 y las 11:30 de la mañana, y probamos cada pez individualmente. Para reducir el estrés

provocado por la exposición al aire y el aislamiento, transportamos cada grupo de peces cerca del aparato de pruebas mediante un recipiente lleno de agua del tanque doméstico. Cada pez fue transferido individualmente del contenedor al aparato con un vaso de precipitados. Cambiamos el agua del aparato después de probar cada pez para evitar la señalización de sustancias (BRITO, 2011; MAXIMINO et al., 2010b).

### **Experimento 1: prueba de memoria de discriminación visual.**

Hicimos este experimento para abordar dos cuestiones prácticas. En primer lugar, es necesaria una ambigüedad de estímulo para ejecutar un sesgo de juicio. Por lo tanto, necesitábamos comprobar si los peces interpretaban los colores ambiguos (amarillentos) como diferentes de los colores puros (verde o rojo). Seleccionamos estos dos colores puros porque son igualmente preferidos por los peces cebras (AVDESH et al., 2012) y pueden distinguir los colores (BLOCH et al., 2019a; PARKER et al., 2012b). En segundo lugar, deberíamos comprobar si los peces podían recordar las señales cuatro días después del entrenamiento. Este tiempo sería necesario para manipular el estado afectivo (cuatro días de cambio en las condiciones de alojamiento) para la posterior prueba de sesgo de juicio.

### **Entrenamiento de habituación y discriminación visual**

El aparato de prueba para esta tarea era un acuario rectangular de cristal construido a medida (45 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto). Las paredes y el fondo del acuario estaban cubiertos por un papel autoadhesivo opaco y no reflectante. El aparato se dividió en tres zonas: Una mitad roja y otra mitad verde con las mismas dimensiones para cada uno de los brazos (15 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto) y un área central blanca entre estas dos (área de retención) (10 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto). La zona de espera tenía dos puertas corredizas blancas que definían una caja para esta zona Figura 2.

Para minimizar el estrés por novedad de procedimiento, los peces se sometieron a una serie de 4 ensayos de habituación: Dos ensayos reforzados (con comida) en la zona verde y dos no reforzados en el brazo rojo. Colocamos cada pez en la zona de espera durante unos 2 minutos en cada ensayo. A continuación, levantamos una puerta corredera para que el pez pudiera investigar libremente el brazo correspondiente, mientras que la otra puerta corredera permanecía cerrada para evitar que el pez fuera al lado opuesto. La prueba reforzada terminaba 30 segundos después de que el pez hubiera consumido su comida o un minuto y medio después de la exploración. La prueba no reforzada terminaba un minuto y medio después de la exploración.

Para el entrenamiento, realizamos 12 ensayos de aproximadamente 4 minutos cada uno. En primer lugar, colocamos un pez en la zona de espera durante unos 2 minutos. A continuación, levantamos las puertas corredizas para que los peces salieran de la zona de espera y exploraran los brazos verdes y rojos. Los peces eran recompensados con comida sólo cuando permanecían en el brazo verde (área objetivo) durante estas sesiones. Proporcionamos tres recompensas de comida de la siguiente manera: El pez recibía la primera recompensa inmediatamente después de entrar en la zona verde; 30 segundos después, ofrecíamos una segunda recompensa si el pez había comido todo su alimento y permanecía en la zona. En caso contrario, el pez no recibía más comida hasta que volvía a entrar en la zona verde. Si los peces cumplían las condiciones mencionadas anteriormente, recibían una tercera recompensa 30 segundos después o no recibían comida hasta que el ensayo terminaba 30 segundos después. Determinamos de forma pseudoaleatoria qué zona ocupaba la posición adecuada siguiendo una secuencia de GRRGRGGRRGRG (G=verde, R=rojo). Medimos la latencia y la duración de los peces en cada brazo para evaluar el proceso de aprendizaje de la discriminación visual. El criterio para el aprendizaje de la tarea de discriminación fue una latencia media más corta para acercarse a la zona verde que la latencia media para acercarse a la zona roja y una mayor duración en la zona verde que la duración media en la zona roja durante las tres últimas sesiones de entrenamiento.

Durante los días de habituación y entrenamiento no alimentamos a los peces en su pecera, sino en el aparato de pruebas. Las recompensas alimenticias para el experimento consistieron en aproximadamente cuatro hojuelas de Tetra Flocculated Feed®.

### **Prueba para comprobar la ambigüedad y la memoria**

Cuatro días después de la última sesión de entrenamiento, comprobamos la memoria de los peces. Realizamos el mismo procedimiento realizado durante el entrenamiento, pero sin recompensar los peces. Igualmente, medimos la duración y la latencia para comparar estos parámetros con los obtenidos en la última sesión de entrenamiento. Después, comparamos estos resultados con la respuesta hacia los estímulos ambiguos obtenida en el segundo experimento.

### **Experimento 2: Sesgo de juicio cognitivo, pruebas de claro/oscurito y actividad**

El sesgo de juicio generalmente procede en tres etapas (BETHELL, 2015; LAGISZ et al., 2020; NEVILLE et al., 2020), entonces seguimos estos pasos para llevarlo a cabo en el segundo experimento. En la primera etapa, entrenamos a los peces para que discriminaran entre

dos señales de referencia (dos zonas de color en el tanque), prediciendo un resultado positivo (lugar verde recompensado) y otro negativo (zona roja no recompensada). En la segunda etapa, cambiamos las condiciones de alojamiento de los peces para manipular su estado afectivo. En la tercera etapa, se presentaron a los peces señales intermedias y, por tanto, ambiguas (zonas verde-amarillentas y rojo-amarillentas). El fundamento de la prueba de sesgo de juicio es que la respuesta conductual a una señal ambigua (intermedia entre un signo positivo y uno negativo) es un indicador directo de los estados afectivos positivos/negativos del individuo. Entonces, la latencia y el tiempo de permanencia en cada zona reflejan si el pez juzgó la señal intermedia como más positiva o negativa. Cuanto más corta sea la latencia de respuesta para llegar a la zona verde-amarillenta, más positivo será el estado afectivo. Cuanto mayor era el tiempo de permanencia en la zona verde-amarillenta, más positivo era el estado afectivo.

Una vez terminado el sesgo de juicio, al día siguiente, valoramos los peces en la prueba de claro/oscurito y finalmente, un día después, los evaluamos en la prueba de actividad (A continuación, describimos más específicamente cada una de estas pruebas y procedimientos) Figura 1 y 2.

### **Entrenamiento de habituación y discriminación visual.**

En este segundo experimento se utilizaron los mismos aparatos y procedimientos mencionados anteriormente en el experimento 1 para el entrenamiento de habituación y discriminación visual.

### **Manipulación ambiental (cambio en las condiciones de alojamiento).**

Durante el entrenamiento de habituación y discriminación visual, mantuvimos a los peces bajo tres niveles de enriquecimiento (Ninguno, Medio, Alto) según su grupo experimental: Grupo I y III Ninguno; Grupo IV y VI Medio; Grupo II y V Alto. Estos niveles se basaron en una jerarquía de preferencias por las características bióticas del hábitat del pez cebra (SCHROEDER et al., 2014). El enriquecimiento estructural consistió en los siguientes elementos: Arena (<1 mm), grava (>5 mm), cuatro palos de bambú de plástico y cinco plantas de plástico. En el nivel medio, el acuario estaba provisto de cañas de bambú y arena. Para el nivel alto, suministramos en el acuario todos los elementos de enriquecimiento estructural mencionados anteriormente. Para el nivel bajo, no había ningún enriquecimiento en el acuario.

Una vez finalizado el entrenamiento de discriminación visual, cambiamos las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces, excepto para los

grupos I y II, cuyas condiciones permanecieron inalteradas hasta el final del experimento. Para el grupo III, aumentamos un elemento al día durante cuatro días consecutivos hasta alcanzar un nivel alto de condiciones enriquecidas. Para el grupo IV, eliminamos un elemento al día hasta alcanzar las condiciones sin enriquecimiento. Para el grupo V, retiramos todos los elementos del acuario al día siguiente del entrenamiento. Para el grupo VI, añadimos plantas y grava para alcanzar niveles de enriquecimiento elevados al día siguiente del entrenamiento. Este procedimiento duró cuatro días, y no hicimos ningún cambio adicional en el experimento.

### **Prueba de sesgo de juicio cognitivo.**

Se utilizó un aparato con las dimensiones y características exactas para la tarea de discriminación visual mencionada anteriormente, pero con diferentes colores que cubrían sus paredes y su fondo Figura 2. Dividimos el aparato en tres zonas: Una mitad de amarillo-rojizo y otra mitad de amarillo-verdoso (estímulos ambiguos) con las mismas dimensiones para cada una de ellas (15 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto). La zona central (zona de espera) entre estos dos seguía siendo la misma (zona blanca con dos puertas corredizas) (10 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto).

Para las pruebas, colocamos a cada pez individualmente en el área de retención durante dos minutos, luego se levantaron las puertas corredizas y el sujeto pudo explorar libremente el aparato durante un minuto y medio. Se midió la latencia del pez para llegar a cada zona y la duración en cada brazo para evaluar si el pez juzgaba la señal intermedia como más positiva o negativa.

### **Prueba de claro/oscuro**

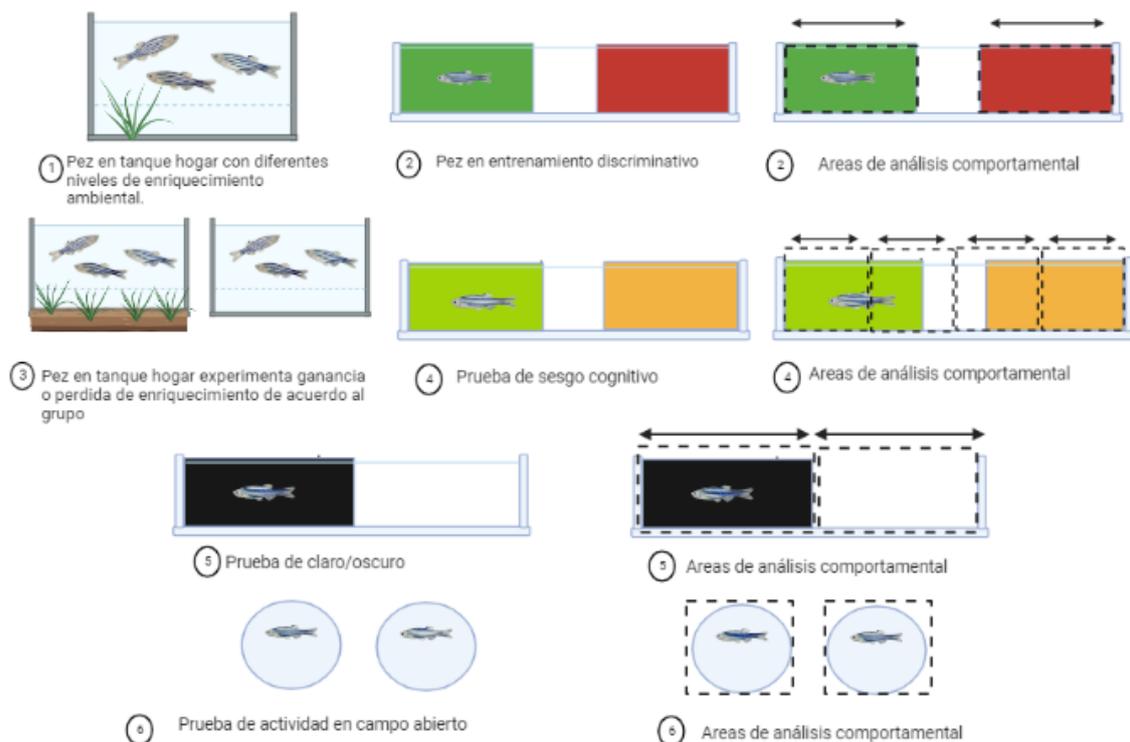
Basamos este procedimiento en el protocolo descrito por Maximino et al., (2010b). Brevemente, el aparato era un tanque acrílico rectangular (45 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto), con una zona central separada por dos puertas corredizas. Llenamos el aparato con agua de diez centímetros de profundidad, y los peces fueron introducidos individualmente en la cámara central durante 5 minutos para su habituación. A continuación, retiramos las puertas corredizas, permitiendo a los peces nadar libremente en el aparato. Registramos la actividad locomotora de los peces durante los siguientes 15 minutos y medimos el tiempo que pasaban en la zona blanca. Evaluamos la proporción de tiempo que pasaban en el espacio blanco para valorar el comportamiento de ansiedad. Cuanto más tiempo pasaban en la zona blanca, menor era el comportamiento de ansiedad.

## Prueba de actividad

Para realizar esta prueba, utilizamos un protocolo modificado descrito por (YUAN et al. 2018). El aparato era un tanque acrílico circular de 23 cm de diámetro y 10 cm de altura. Llenamos el tanque con 8 cm de agua y colocamos los peces en el centro del tanque dentro de un cilindro de plástico de 9 cm de diámetro. Tras 15 minutos de aclimatación, retiramos el cilindro y registramos los parámetros de natación de los peces durante 15 minutos. A continuación, grabamos a los peces durante otros 15 min. Para cada periodo, medimos la locomoción acumulada (LA) y el tiempo de congelación (TC) según el Catálogo de Neuro comportamiento del Pez Cebra (KALUEFF et al., 2013). Calculamos la diferencia entre el tiempo de locomoción y el tiempo de congelación para medir el comportamiento de ansiedad. Cuanto mayor era el tiempo de congelación, mayor era el comportamiento similar a la ansiedad

Figura 2.

Figura 3 - Diagrama del diseño experimental que muestra la secuencia de procedimientos y pruebas utilizadas durante el experimento



**Fuente:** Elaboración propia. Creado en Biorender. **Leyenda:** 1) Peces en niveles iniciales de EE según su grupo, 2) Peces sometidos a entrenamiento de habituación y discriminación visual, 3) Peces que reciben un cambio en los niveles de EE, 4) Peces que realizan la prueba de sesgo de juicio, 5) Peces que realizan la prueba de claro/oscuro, 6) Peces que realizan la prueba de actividad. n=68

### **Observaciones del comportamiento.**

Todas las observaciones del comportamiento se grabaron con cámaras de vídeo digitales (GZ-EX210, JVC y DCR-PJ5, SONY) colocadas encima de cada aparato, lo que permitió una visión completa del sujeto y de todas las zonas del acuario. Los vídeos se analizaron posteriormente con los programas informáticos Zebtrack® (duraciones) y BORIS® (latencias). Todos los vídeos fueron codificados por un único observador entrenado y ciego al estudio.

Para el análisis del comportamiento del sesgo de juicio, dividimos el acuario en cuatro áreas iguales: La esquina del verde amarillento, el centro del verde amarillento, la esquina del rojo amarillento y el centro del rojo amarillento.

### **Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron mediante IBM SPSS Statistics®. Se confirmaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los datos que no se ajustaban a una distribución normal o tenían desviaciones estándar considerablemente diferentes se transformaron para cumplir los supuestos. Los datos que no cumplían los supuestos tras la transformación (latencia de aprendizaje y prueba de actividad) se analizaron con la prueba no paramétrica correspondiente.

Para el experimento 1, se utilizaron pruebas t de muestras independientes para comparar la respuesta de memoria de los peces (% de duración en la zona cuatro días después de la última sesión de entrenamiento) entre las señales ambiguas y las originales. Se realizó una prueba t de muestras dependientes para comparar las diferencias entre los dos estímulos ambiguos. Asimismo, utilizamos una prueba t de muestras dependientes para comparar los resultados de los colores puros entre la última sesión de entrenamiento y la prueba de memoria realizada cuatro días después.

Para el experimento 2, empleamos un ANOVA factorial de una vía con medidas repetidas, seguido de un análisis post-hoc de Bonferonni para explorar el efecto de los tres niveles de enriquecimiento (Ninguno, Medio, Alto) sobre el aprendizaje de la discriminación (% de duración en el área). Los datos correspondientes a la latencia para alcanzar el área verde no cumplieron los supuestos tras la transformación; por lo tanto, se utilizó una prueba de Friedman para explorar el efecto de 12 ensayos consecutivos sobre el aprendizaje (latencia para alcanzar el área verde). Se realizó un Kruskal Wallis para cada ensayo para examinar el

impacto del nivel de enriquecimiento (Ninguno, Medio, Alto) en el aprendizaje de la discriminación (Latencia). El sesgo de juicio y la prueba de claro/oscurito se evaluaron mediante un ANOVA de una vía seguido de pruebas post-hoc de Tukey HSD. Por último, se realizaron pruebas post hoc de Kruskal Wallis y Dunn-Bonferroni para los resultados de la prueba de actividad, ya que los datos de esta prueba no cumplían los supuestos tras la transformación.

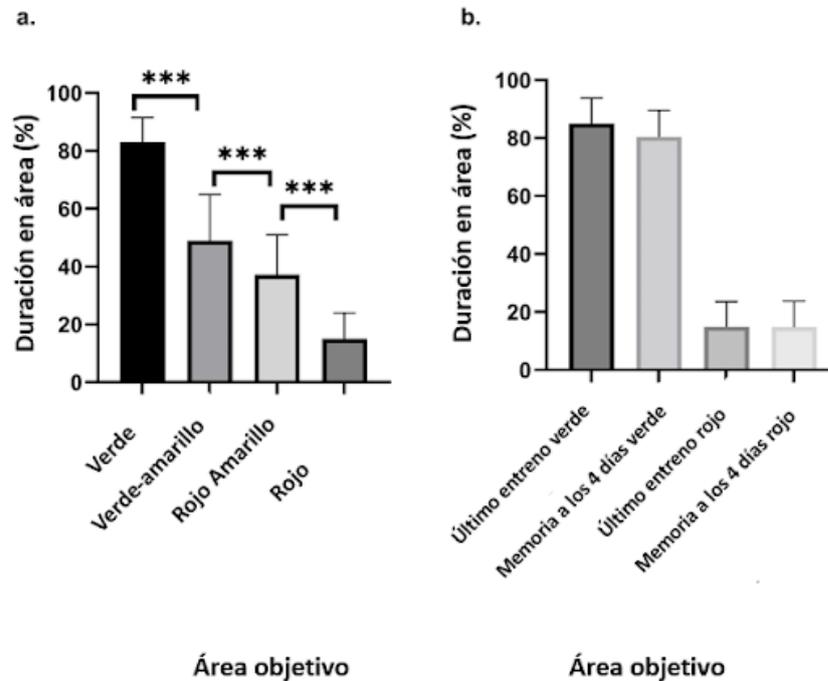
## RESULTADOS

### Experimento 1: prueba de memoria de discriminación visual.

Las respuestas conductuales sugerían que los peces interpretaban los colores ambiguos (amarillentos) como diferentes de los colores puros (verde o rojo). La prueba de memoria realizada cuatro días después de la última sesión de entrenamiento mostró que los peces tenían un porcentaje de duración significativamente mayor ( $t(93) = 10,456$ ,  $p < 0,001$ ,  $d$  de Cohen = 2,378) en el color verde puro ( $M = 82,96$ ,  $SD = 8,56$ ) que en el ambiguo amarillo-verdoso ( $M = 48,97$ ,  $SD = 15,97$ ). Asimismo, hubo un porcentaje de duración significativamente menor ( $t(93) = -7,68$ ,  $p < 0,001$ ,  $d$  de Cohen = -1,749) para el rojo puro ( $M = 15,09$ ,  $SD = 8,88$ ) que para el rojo amarillento ( $M = 37,19$ ,  $SD = 13,82$ ). Además, hubo un porcentaje de duración significativamente mayor para la señal verde-amarillenta que para la roja-amarillenta ( $t(67) = 3,4$ ,  $p < 0,001$ ,  $d$  de Cohen = 0,412) Figura 4a. Las medias, desviaciones e intervalos de confianza se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios.

Además, los resultados sugieren que los peces pueden recordar las señales cuatro días después de la fase de entrenamiento. La comparación de los porcentajes de duración en el área verde entre la última sesión de entrenamiento ( $M = 85,75$   $SD = 9,15$ ) y la prueba de memoria cuatro días después de esta sesión ( $M = 80,41$   $SD = 8,32$ ) mostró que los peces no diferían en estas respuestas ( $t(7) = -1,257$ ,  $p > 0,249$ ,  $d$  de Cohen = -0,444). Del mismo modo, los porcentajes de duración en la zona roja entre la última sesión de entrenamiento ( $M = 14,25$   $SD = 8,32$ ) y la prueba de memoria ( $M = 14,79$   $SD = 8,97$ ) mostraron que los peces no diferían en estas respuestas ( $t(7) = 0,128$   $p > 0,902$ , Cohen's  $d = 0,045$ ) Figura 4b.

Figura 4 - Respuestas de memoria de los peces a señales ambiguas y originales no reforzadas cuatro días después de la última sesión de entrenamiento (experimento 1).



**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** a) Las respuestas de memoria de los peces fueron más altas para las señales originales (verde puro y rojo) que para las ambiguas (verde amarillento y rojo amarillento). Las respuestas de memoria de los peces para verde amarillento fueron más altas que para rojo amarillento. b) No se encontraron diferencias entre las respuestas de la última sesión de entrenamiento y las respuestas de memoria correspondientes a cada color. Gráficos de barras que muestran las medias ( $\pm$  SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos: \*\*\* $p < 0,001$ .  $n=68$  y  $n=27$  para claves ambiguas y originales, respectivamente.

## Experimento 2: Sesgo de juicio cognitivo, pruebas de claro/oscuras y actividad.

### Entrenamiento de discriminación visual

En cuanto al porcentaje de duración en el área, estos datos se reflejaron y se transformaron en raíz cuadrada para cumplir los supuestos. La prueba de Mauchly indicó que se había violado el supuesto de esfericidad,  $X^2(65) = 142,86$ , por lo que se corrigieron los grados de libertad utilizando las estimaciones de esfericidad de Greenhouse-Geisser ( $\epsilon=0,69$ ).

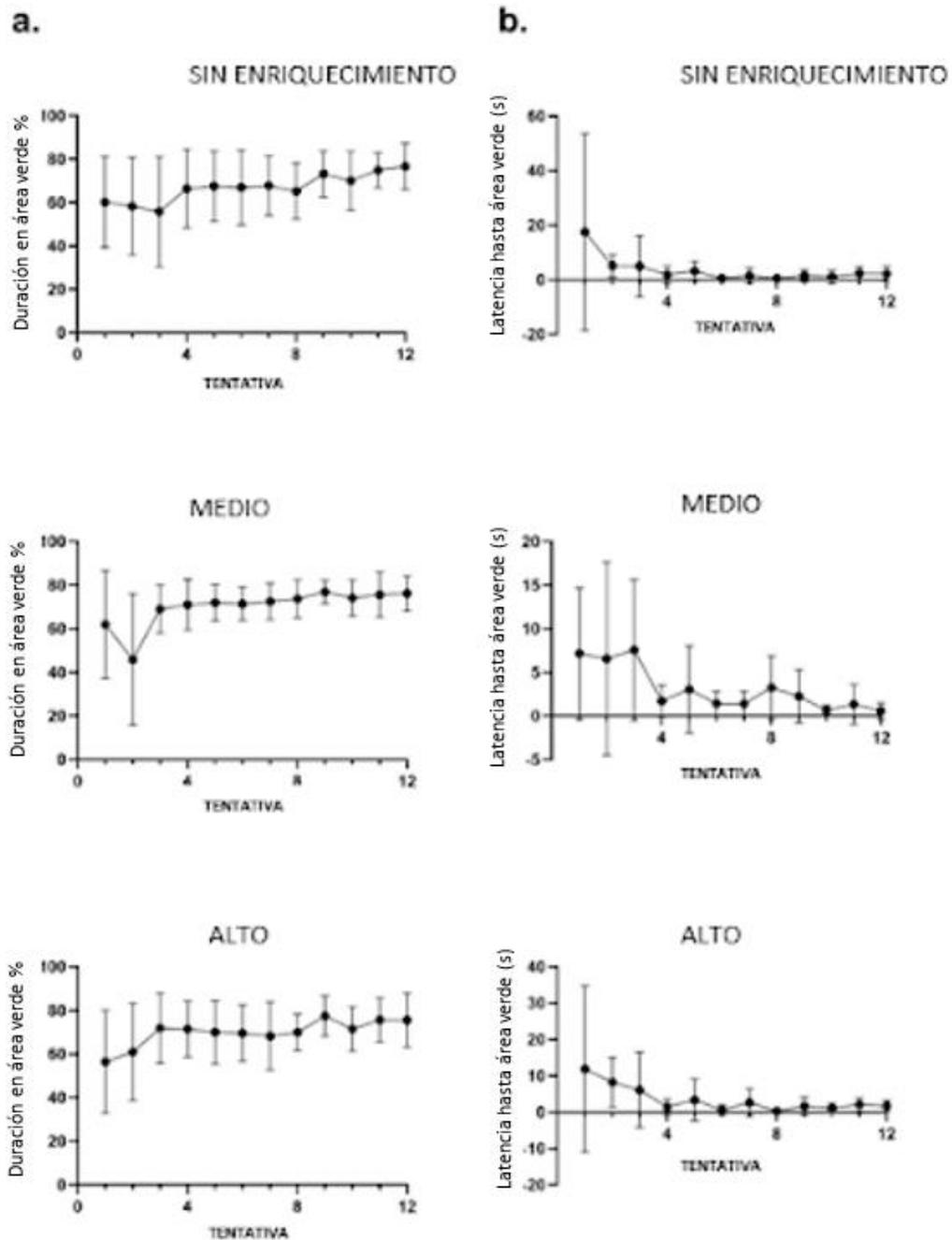
No hubo una interacción significativa entre el nivel de enriquecimiento y el ensayo  $F(15,22;494,74) = 1,09$ ,  $p > 0,05$  (0,364). Asimismo, el ANOVA no mostró ninguna diferencia significativa entre los diferentes niveles de enriquecimiento  $F(2;65) = 1,91$ ,  $p > 0,05$  (0,156) sobre la duración en la zona verde. El ANOVA de medidas repetidas reveló una diferencia

significativa de la duración en el área verde entre los ensayos  $F(7,61;494,74) = 10,13$   $p < 0,001$ . El análisis post-hoc de Bonferonni ( $p < 0,05$ ) reveló un aumento del tiempo de permanencia en la zona verde en los tres últimos ensayos en comparación con los tres primeros, lo que demuestra que los peces aprendieron a permanecer en la zona verde recompensada después de 12 ensayos Figura 5a. Las medias, desviaciones e intervalos de confianza se presentan en el Tabla S1, Datos suplementarios (transformados y no transformados).

Con respecto a la latencia para alcanzar el área verde, la prueba de Friedman mostró que había una diferencia significativa en esta latencia a través de los ensayos para todos los grupos  $\chi^2(11) = 171,388$ ,  $p = < 0,001$ . Se realizaron pruebas post hoc de Dunn-Bonferroni ( $p < 0,001$ ) y revelaron una disminución de la latencia después de los tres primeros ensayos; no se encontraron otras diferencias Figura 4b. Las medianas y los intercuartiles se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios.

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis mostraron que había una diferencia estadísticamente significativa en la latencia para alcanzar el área verde entre los diferentes niveles de enriquecimiento (Barren, Medium, Enriched) en el ensayo 2  $\chi^2(2) = 7,637$ ,  $p = 0,022$ ; Ensayo 6  $\chi^2(2) = 11,425$ ,  $p = 0,003$ ; Ensayo 8  $\chi^2(2) = 17,781$   $p < 0,001$  y Ensayo 12  $\chi^2(2) = 7,356$   $p = 0,025$ . Sin embargo, se ejecutaron pruebas post hoc de Dunn-Bonferroni y no mostraron una tendencia clara que demostrara que el nivel de enriquecimiento influyera en la latencia de los peces Figura 5b. Las medianas y los intercuartiles se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios.

Figura 5 - Efecto de la EA en el aprendizaje.



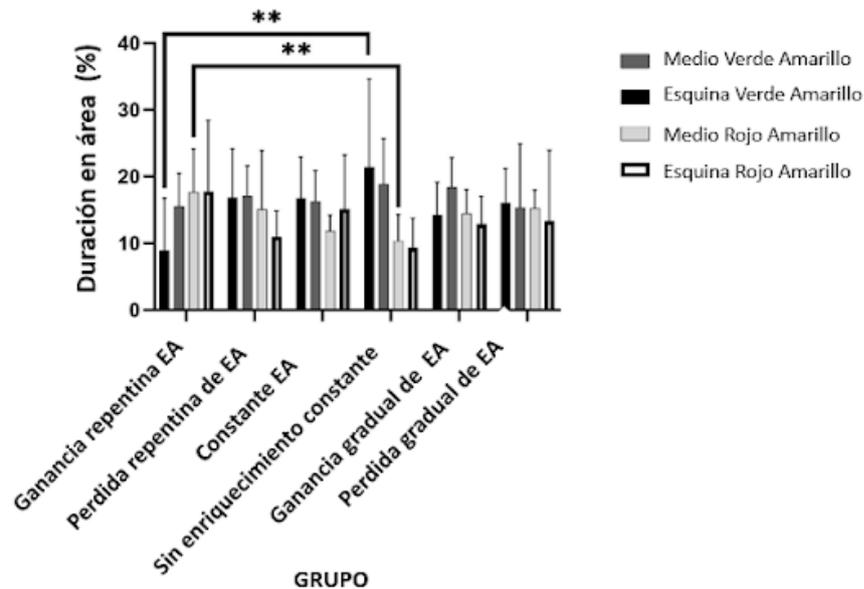
**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Gráficos de líneas que muestran las curvas de aprendizaje para la respuesta de los peces a una zona de color verde frente a una de color rojo para los tres niveles de EE. No hubo diferencias entre los niveles de EE para la latencia y la duración. a) Respuestas para la duración en el área. El tiempo de permanencia en el área verde en los últimos tres ensayos fue significativamente mayor que en los primeros ensayos para todos los niveles de EE ( $p < 0,001$ ). b) Respuestas para la latencia para alcanzar el área. Después de los tres primeros ensayos, hubo una disminución significativa de la latencia para todos los niveles de EE ( $p < 0,001$ ). Media  $\pm$  DE para la duración transformada hacia atrás. Media  $\pm$  DE para la latencia.  $n=68$ .

**Sesgo de juicio.**

Los datos del porcentaje de duración en las zonas verde-amarillentas y rojo-amarillentas se transformaron en raíz cuadrada para cumplir los supuestos. Los resultados sugieren que hubo un efecto negativo de un aumento súbito en el sesgo de juicio, pero sólo en comparación con una condición de tiempo completo sin enriquecimiento. El ANOVA de una vía mostró un efecto significativo de la manipulación ambiental sobre el tiempo de permanencia en la esquina del área verde-amarillenta  $F(5; 62) = 3,03$ ,  $p = 0,016$ ,  $d=0,99$ . Las comparaciones post-hoc mediante la prueba HSD de Tukey indicaron que la puntuación media del grupo de tiempo completo sin enriquecimiento ( $M = 21,45$ ,  $SD = 13,2$ ) fue significativamente mayor que la del grupo de aumento repentino ( $M = 8,95$ ,  $SD = 7,8$ ), y no hubo diferencias entre los tratamientos de los demás grupos. Las medias, las desviaciones y los intervalos de confianza se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios (transformados y no transformados).

El ANOVA de una vía también indicó una diferencia significativa entre la manipulación ambiental sobre el tiempo pasado en el centro del área rojo-amarillenta  $F(5; 62) = 3,05$ ,  $p = 0,016$ ,  $d=0,99$ . Las comparaciones post hoc mediante la prueba HSD de Tukey indicaron que la puntuación media del grupo de tiempo completo estéril ( $M = 3,28$ ,  $SD = 0,78$ ) fue significativamente menor que la del grupo de aumento repentino ( $M = 4,16$ ,  $SD = 3,11$ ), y no hubo diferencias entre las combinaciones de los otros grupos Figura 6. Las medias, desviaciones e intervalos de confianza se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios.

Figura 6 - Efecto de la manipulación ambiental (cambio de las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces) en la prueba de sesgo de juicio.

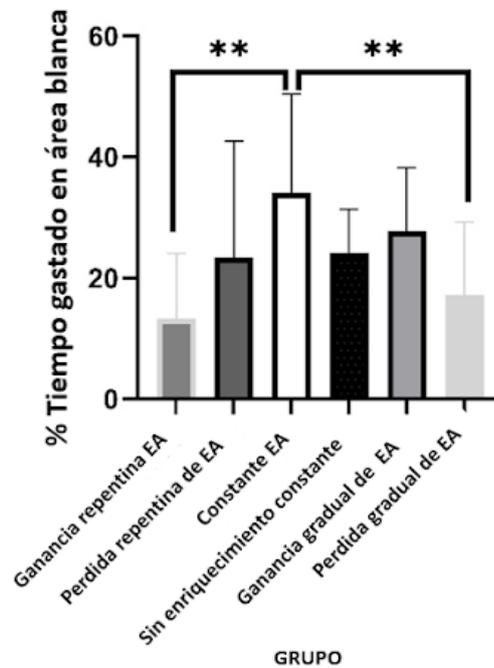


**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Los peces con un aumento repentino de EE mostraron una respuesta sesgada negativa hacia los estímulos ambiguos. Tuvieron una menor duración en la esquina verde-amarillenta y una mayor duración en la esquina roja-amarillenta que el grupo de estériles a tiempo completo. No hubo diferencias para las latencias ni entre los demás grupos. Gráfico de barras que muestra las medias ( $\pm$  SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos:  $**p < 0,01$ .  $n=68$ .

### Prueba de claro/oscuro

Los resultados sugieren que el enriquecimiento a tiempo completo tuvo un efecto ansiolítico en comparación con un aumento repentino o una disminución gradual del enriquecimiento. El ANOVA de una vía mostró que había un efecto significativo de la manipulación ambiental sobre el tiempo de permanencia en el área blanca  $F(5; 62) = 3,53$ ,  $p=0,007$ ,  $d=1,06$ . Las comparaciones post hoc mediante la prueba HSD de Tukey indicaron que la puntuación media del grupo de tiempo completo enriquecido ( $M=34,1$ ,  $SD=0,47$ ) era significativamente mayor que la del grupo de aumento repentino ( $M=13,3$ ,  $SD=0,31$ ) y la del grupo de disminución gradual ( $M=17,1$ ,  $SD=0,38$ ) y no hubo diferencias entre las combinaciones de los otros grupos Figura 7. Las medias, desviaciones e intervalos de confianza se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios.

Figura 7 - Efecto de la manipulación ambiental (cambio de las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces) en la prueba de claro/oscuro.

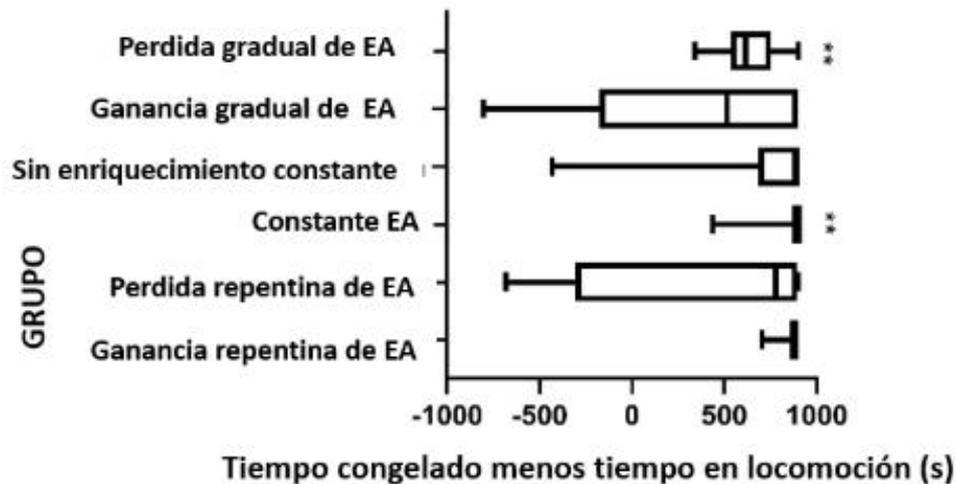


**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Los peces con un aumento repentino o una disminución gradual de los niveles de EE mostraron un mayor comportamiento ansiolítico (pasaron menos tiempo en la zona blanca) que los peces con EE a tiempo completo. No hubo diferencias entre los demás grupos. Gráfico de barras que muestra las medias ( $\pm$  SEM). Las diferencias significativas entre tratamientos se indican con asteriscos: \*\* $p < 0,01$ .  $n=68$ .

### Prueba de actividad.

La evaluación en agua normal sugiere que una disminución gradual del enriquecimiento genera más ataques de congelación (tiempo de congelación frente a locomoción en agua normal) que el enriquecimiento a tiempo completo. Kruskal Wallis mostró una diferencia significativa entre la manipulación ambiental sobre los comportamientos de ansiedad  $\chi^2(5) = 16,3$   $p = 0,006$ ,  $d = 0,98$ . Las comparaciones post-hoc de Dunn-Bonferroni mostraron que la mediana del enriquecimiento a tiempo completo (900) era significativamente mayor ( $p = 0,028$ ) que la mediana de la disminución gradual (616,21). No hubo diferencias entre las combinaciones de los demás grupos Figura 8. Las medianas y los intercuartiles se presentan en la Tabla S1, Datos complementarios.

Figura 8 - Efecto de la manipulación ambiental (cambio de las condiciones de alojamiento para manipular el estado afectivo de los peces) en la prueba de actividad durante la etapa en agua dulce.



**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Los peces sometidos a un enriquecimiento a tiempo completo mostraron un mayor comportamiento de tipo ansiolítico (menor tiempo de congelación) que los peces con una disminución gradual del enriquecimiento. No hubo diferencias entre los demás grupos. Las líneas verticales de las cajas representan el primer, segundo y tercer cuartil. Los valores del gráfico representan el tiempo resultante de restar el tiempo de congelación al tiempo de locomoción. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos: \*\* $p < 0,01$ .  $n = 68$ .

## DISCUSIÓN.

Evaluamos diferentes niveles de EA utilizando el sesgo de juicio cognitivo, las pruebas de claro/oscuro y de actividad. Esta evaluación mostró que los peces bajo un aumento repentino de EA tenían una menor duración en un área ambigua de color verde amarillento que se asemejaba a un lugar verde recompensado, caracterizando un sesgo de juicio negativo (BETHELL, 2015; MENDL; PAUL, 2020). Además, utilizando la prueba de claro/oscuro, evidenciamos que los peces sometidos tanto a una disminución gradual como a un aumento repentino de EA pasaban menos tiempo en la zona clara, lo que caracteriza un comportamiento más ansioso (KYSIL et al., 2017; MAXIMINO et al., 2010a, 2010b). Además, los peces sometidos a una disminución gradual de EA en la condición de agua normal de la prueba de actividad pasan más tiempo congelados, lo que corresponde a un punto final relacionado con la ansiedad (COLLIER; KALUEFF; ECHEVARRIA, 2017). Sin embargo, estos resultados se observaron solo en comparación con una condición sin enriquecimiento constante para el sesgo de juicio y en comparación con un nivel de enriquecimiento continuo para la prueba de claro/oscuro y actividad. Estos resultados proporcionan pruebas de que el EA puede influir en

los estados afectivos y la cognición asociada. Sin embargo, estas influencias pueden depender de las características particulares del EA, como una ganancia o una pérdida del mismo y si estos cambios se producen de forma gradual o repentina.

En cuanto al sesgo de juicio, los resultados encontrados aquí son de alguna manera como los encontrados para medir el afecto animal en varias especies, por ejemplo (LAGISZ et al., 2020; NEVILLE et al., 2020; NGUYEN; GUO; HOMBERG, 2020), incluyendo peces cíclidos (LAUBU; LOUÂPRE; DECHAUME-MONCHARMONT, 2019). En estos estudios, los animales en buenas condiciones, que se supone generan un afecto más positivo, sobreestiman la probabilidad de ganancia (muestran juicios más "optimistas" de la ambigüedad), al contrario que aquellos en condiciones relativamente peores. Sin embargo, nuestro resultado para el aumento repentino de EA fue inverso a nuestras predicciones. Esperábamos que un aumento de EA indujera un cambio positivo en el sesgo del juicio, y no esperábamos una respuesta con sesgo negativo. Sin embargo, esperábamos que las características temporales de la presentación del enriquecimiento (gradual frente a súbito) influyeran en los resultados del sesgo de juicio. Algunos autores han informado de que la valoración cognitiva del estímulo (imprevisibilidad en este caso) regula la aparición de estados similares a la emoción en varias especies, (por ejemplo (BOISSY, 2019) y en pez cebra (CERQUEIRA et al., 2020; FAUSTINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Además, una de las manipulaciones más comunes para inducir un estado similar al estrés/depresión en el pez cebra es el alojamiento imprevisible (por ejemplo, (FAUSTINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; GALHARDO; VITAL; OLIVEIRA, 2011; PIATO et al., 2011b), asumimos que la imprevisibilidad del aumento repentino de EA generaba un estado afectivo negativo y, por tanto, un sesgo de juicio negativo.

Hasta donde sabemos, hay otro estudio que ha utilizado el sesgo de juicio para evaluar la emoción en los peces (KRZYSZTOF; PRZEMYSŁAW; ROMAN, 2015). Aun así, la metodología y los resultados publicados (en las actas del congreso) no nos permiten hacer comparaciones reflexivas. En ese estudio, los peces en condiciones estériles mostraron un sesgo positivo, mientras que los peces en condiciones enriquecidas mostraron lo contrario. Estos hallazgos y los nuestros desafían la predicción general de que los animales alojados sin enriquecimiento tienden a generalizar los estímulos ambiguos como una pista negativa y en condiciones enriquecidas como positiva (por ejemplo, (BETHELL; KOYAMA, 2015; BRYDGES et al., 2011; DOUGLAS et al., 2012; MATHESON; ASHER; BATESON, 2008; RICHTER et al., 2012) pero véanse (BURMAN et al., 2011; COLOM et al., 2013; KEEN et

al., 2014; NOVAK et al., 2015; WICHMAN; KEELING; FORKMAN, 2012), al menos para el pez cebra.

He aquí algunas posibles explicaciones de por qué nuestros resultados desafían la predicción general de una prueba de sesgo de juicio. Podría ser que esta prueba sea más directa para detectar un cambio negativo que uno positivo en el afecto en el pez cebra. Por ejemplo, varios estudios han encontrado diferencias en el sesgo de juicio cuando se aplican manipulaciones para producir un estado afectivo negativo. Por el contrario, solo unos pocos estudios han encontrado sensibilidad a las manipulaciones que inducen emociones positivas (ver revisiones de (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; KOŠŤÁL; SKALNÁ; PICHOVÁ, 2020; NGUYEN; GUO; HOMBERG, 2020; ROELOFS et al., 2016). Del mismo modo, una reciente revisión sistemática de la validez predictiva realizada por (Neville et al. 2020) encontró que los fármacos depresivos y ansiógenos tenían un efecto más significativo en el sesgo de juicio medido que los antidepresivos y ansiolíticos. Otra explicación es que los estudios que han utilizado un diseño simple para comparar dos niveles invariables de enriquecimiento no han encontrado diferencias en el sesgo de juicio, mientras que las investigaciones que han aplicado un diseño cruzado han detectado cambios en los estados afectivos (ABBEY-LEE et al., 2018; BETHELL; KOYAMA, 2015; BURMAN et al., 2008; KOŠŤÁL; SKALNÁ; PICHOVÁ, 2020; LAMPE et al., 2017; RICHTER et al., 2012; ROSS et al., 2019; WICHMAN; KEELING; FORKMAN, 2012; ZIDAR et al., 2018). En consecuencia, no encontramos diferencias entre las condiciones de enriquecimiento constante y las condiciones estériles, pero observamos diferencias para el aumento repentino. Además, no evidenciamos diferencias en el rendimiento del entrenamiento entre tratamientos que sugieran cambios en el nivel de motivación por la comida, la capacidad de aprendizaje o la actividad general debido a las condiciones de alojamiento que podrían afectar a la tarea de sesgo de juicio (BETHELL, 2015; BETHELL; KOYAMA, 2015).

Además, los resultados obtenidos en la prueba de claro/oscuro muestran que los peces que permanecieron en determinadas condiciones (aumento repentino y disminución gradual de la EA) presentaron más comportamientos de tipo ansiógeno que los peces que viven con un EA constante. Estos resultados se acercaron más a nuestras predicciones de inducción del estado de ánimo que los resultados encontrados en las otras dos pruebas evaluadas. En estudios anteriores que utilizaron un fundamento similar, los autores encontraron resultados similares para los peces a nivel conductual, fisiológico y neuromolecular (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015a; GIACOMINI et al., 2016; MANUEL et al., 2015a;

MARCON et al., 2018b; RAMBO et al., 2017; REOLON et al., 2018). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la prueba de claro/oscuro fue mucho más sensible que el sesgo de juicio o la prueba de actividad para detectar los efectos del alojamiento en los estados afectivos. Además, esta prueba fue mejor para hacer predicciones de cómo deberían cambiar las medidas de comportamiento según el estado emocional del pez cebra.

Por último, no encontramos diferencias para un aumento gradual ni para una disminución repentina en todas las pruebas evaluadas. La falta de respuesta al aumento gradual podría ser el resultado de la habituación (PIATO et al., 2011a) debido al aumento repetido y señalado de los elementos de enriquecimiento, que a su vez suprimió los cambios en los afectos y las respuestas al estrés (CERQUEIRA et al., 2020). Nos parece más difícil explicar lo que ocurrió en el caso de la disminución repentina. Creemos que puede ocurrir una habituación similar, ya que los peces habían experimentado condiciones sin enriquecimiento durante la cuarentena, y en consecuencia, no encontramos cambios negativos para los animales en condiciones de sin enriquecimiento constantes. Además, podría ser posible que la complejidad ambiental previa amortiguara los efectos adversos de la disminución repentina del enriquecimiento (Zidar et al., 2018).

## **CONCLUSIÓN**

En resumen, hemos demostrado que el sesgo de juicio puede ayudar a evaluar los estados afectivos negativos en el pez cebra. En comparación con estudios anteriores, nuestro protocolo tiene una duración de entrenamiento más corta que, junto con el uso de la preferencia de lugar como medida, puede eludir algunos de los factores de confusión de la prueba. Sin embargo, la prueba de claro/oscuro parece ser un mejor indicador de los estados emocionales en el pez cebra. Fue más sensible que el sesgo de juicio a la hora de detectar cambios en los estados afectivos debidos a manipulaciones ambientales, no requiere entrenamiento y es más rápida de evaluar. Además, nuestros resultados muestran que no sólo las características intrínsecas del EA por sí solas, sino también las manipulaciones de las características temporales del EA son esenciales para provocar cambios en los estados afectivos y las respuestas conductuales asociadas. Por último, los métodos aquí estudiados para manipular el afecto del pez cebra deben optimizarse y validarse más, en particular la inducción de estados emocionales positivos y un mayor tiempo para manipular el estado afectivo. Además, deben evaluarse otras características del sesgo de juicio, como los efectos del tipo de tarea, el nivel de ambigüedad de las pistas y el esquema de refuerzo. Asimismo, las influencias de la línea

genética, el sexo y la personalidad individual deben ser evaluados y correlacionados en futuros experimentos.

## REFERENCIAS

ABBEY-LEE, R. N. N. et al. The Influence of Rearing on Behavior, Brain Monoamines, and Gene Expression in Three-Spined Sticklebacks. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 91, n. 4, p. 201–213, 1 ago. 2018.

ABOZAID, H.; WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Elevated Temperature Applied during Gonadal Transformation Leads to Male Bias in Zebrafish (*Danio rerio*). **Sexual Development**, v. 6, n. 4, p. 201–209, jun. 2012.

ABREU, M. S. et al. Modulation of Cortisol Responses to an Acute Stressor in Zebrafish Visually Exposed to Heterospecific Fish During Development. **Zebrafish**, v. 15, n. 3, p. 228–233, jun. 2018.

ALESTRÖM, P. et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 3, p. 213, 1 jun. 2020.

AMPATZIS, K.; DERMON, C. R. Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 385–393, 1 out. 2016.

ANDERSON, M. G. et al. Environmental complexity positively impacts affective states of broiler chickens. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 20 ago. 2021.

ANDRÉ, V. et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. **PLoS Biology**, v. 16, n. 4, 16 abr. 2018.

ANGIULLI, E. et al. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*. **Scientific Reports**, 2020.

APONTE, A.; PETRUNICH-RUTHERFORD, M. L. Acute net stress of young adult zebrafish (*Danio rerio*) is not sufficient to increase anxiety-like behavior and whole-body cortisol. **PeerJ**, 2019.

ARIYOMO, T. O.; WATT, P. J. Effect of hunger level and time of day on boldness and aggression in the zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 86, n. 6, p. 1852–1859, 1 jun. 2015.

ARNOLD, K. E. et al. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. **Biology Letters**, v. 9, n. 4, 23 ago. 2013.

ASHER, L. et al. Mood and personality interact to determine cognitive biases in pigs. **Biology letters**, v. 12, n. 11, p. 20160402, 16 nov. 2016.

ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189–196, 1 jul. 2016.

- AUDIRA, G. et al. Which zebrafish strains are more suitable to perform behavioral studies? A comprehensive comparison by phenomic approach. **Biology**, 2020.
- AVDESH, A. et al. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2012.
- BACIADONNA, L.; MCELLIGOTT, A. G. The use of judgement bias to assess welfare in farm livestock. **Animal Welfare**, 2015.
- BAKER, M. R. et al. Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12114, 14 ago. 2018.
- BAKER, M. R.; WONG, R. Y. Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9935, 9 dez. 2019.
- BALDOCK, N. M.; SIBLY, R. M. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. **Applied animal behaviour science**, v. 28, n. 1–2, p. 15–39, 1990.
- BARCELLOS, H. H. A. et al. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. **PeerJ**, v. 6, p. e5162, 23 jul. 2018.
- BARNARD, S. et al. Personality traits affecting judgement bias task performance in dogs (*Canis familiaris*). **Scientific Reports**, 2018.
- BASQUILL, S. P.; GRANT, J. W. A. An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebra fish (*Danio rerio*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, n. 4, p. 770–772, 1998.
- BATESON, M.; NETTLE, D. Development of a cognitive bias methodology for measuring low mood in chimpanzees. **PeerJ**, 2015.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. **Parsing reward. Trends in Neurosciences**, 2003.
- BETHELL, E. J. A “How-To” Guide for Designing Judgment Bias Studies to Assess Captive Animal Welfare. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 2015.
- BETHELL, E. J.; KOYAMA, N. F. Happy hamsters? Enrichment induces positive judgement bias for mildly (but not truly) ambiguous cues to reward and punishment in *Mesocricetus auratus*. **Royal Society Open Science**, 2015.
- BHAT, A.; GREULICH, M. M.; MARTINS, E. P. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (*Danio rerio*) populations. **PLoS ONE**, 2015.
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36931, 17 maio 2012.
- BLOCH, S. et al. Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2019a.
- BLOCH, S. et al. Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 370, p. 111924, 16 set. 2019b.

BOISSY, A. How to access animal sentience? The close relationship between emotions and cognition. **Animal Welfare: from Science to Law**, n. 978-2-9512167-4-7, 2019.

BOISSY, A.; ERHARD, H. W. How Studying Interactions Between Animal Emotions, Cognition, and Personality Can Contribute to Improve Farm Animal Welfare. Em: **Genetics and the Behavior of Domestic Animals**. [s.l.: s.n.].

BOISSY, A.; LEE, C. How assessing relationships between emotions and cognition can improve farm animal welfare. **OIE Revue Scientifique et Technique**, 2014.

BOWER, G. H. Mood and memory. **American Psychologist**, 1981.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J.; SEQUEIRA-CORDERO, A. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, 2020.

BRITO, T. M. DE. **Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no *Carassius auratus* (peixe dourado)**. Universidade de São Paulo, , 2011.

BROWN, A. R. et al. Are Toxicological Responses in Laboratory (Inbred) Zebrafish Representative of Those in Outbred (Wild) Populations? – A Case Study with an Endocrine Disrupting Chemical. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 9, p. 4166–4172, 1 maio 2011.

BROWN, A. R. et al. Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. E1237–E1246, 17 mar. 2015.

BRUCKNER, J. J. et al. The microbiota promotes social behavior by neuro-immune modulation of neurite complexity. **bioRxiv**, p. 2020.05.01.071373, 3 maio 2020.

BRYDGES, N. M. et al. Environmental enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. **Animal Behaviour**, 2011.

BUČKOVÁ, K.; ŠPINKA, M.; HINTZE, S. Pair housing makes calves more optimistic. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 27 dez. 2019.

BUDAEV, S. V. “Personality” in the Guppy (*Poecilia reticulata*): A Correlational Study of Exploratory Behavior and Social Tendency. **Journal of Comparative Psychology**, v. 111, n. 4, p. 399–411, 1997.

BUDAEV, S. V.; ZHUIKOV, A. Y. Avoidance learning and “personality” in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 112, n. 1, p. 92–94, 1998.

BUENHOMBRE, J. et al. 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**, v. 131, p. 765–791, 1 dez. 2021.

BURGDORF, J. et al. Current Neuropharmacology Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Positive Emotional Learning Induces Resilience to Depression: A Role for NMDA Receptor-mediated Synaptic Plasticity. **Current Neuropharmacology**, 2017.

- BURMAN, O. et al. Using judgement bias to measure positive affective state in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, 2011.
- BURMAN, O. H. P. et al. A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, 2008.
- BURMAN, O. H. P.; MENDL, M. T. A novel task to assess mood congruent memory bias in non-human animals. **Journal of neuroscience methods**, v. 308, p. 269–275, 1 out. 2018.
- CARRERAS UBACH, R. The cognitive bias test as a measure of emotional state in pigs. 2016.
- CASTRANOVA, D. et al. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 8, n. 3, p. 141–146, set. 2011.
- CERQUEIRA, M. et al. Cognitive appraisal of environmental stimuli induces emotion-like states in fish. **Scientific Reports**, 2017.
- CERQUEIRA, M. et al. Cognitive appraisal in fish: Stressor predictability modulates the physiological and neurobehavioural stress response in sea bass. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2020.
- CHAKRAVARTY, S. et al. Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 14 maio 2013.
- CLEGG, I. L. K. **Cognitive bias in zoo animals: An optimistic outlook for welfare assessment**. **Animals**, 2018.
- COLDITZ, I. G.; HINE, B. C. **Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare**. **Animal Production Science**, 2016.
- COLLIER, A. D.; KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J. Zebrafish models of anxiety-like behaviors. Em: **The Rights and Wrongs of Zebrafish: Behavioral Phenotyping of Zebrafish**. [s.l: s.n.].
- COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 3, p. 280–5, maio 2015a.
- COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 3, p. 280, 1 maio 2015b.
- COLOM, G. et al. of Positive Humour As a Variable That Reduces Stress. Relationship of Humour With Personality and Performance Variables. **Animal Biology**, 2013.
- COLWILL, R. M. et al. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, v. 70, n. 1, p. 19–31, 31 ago. 2005.
- CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1670–1672, 1999.

- CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. **Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2015.
- CRUMP, A.; ARNOTT, G.; BETHELL, E. J. **Affect-driven attention biases as animal welfare indicators: Review and methods.** *Animals*, 2018.
- CZÉH, B.; WIBORG, O.; FUCHS, E. Experimental Animal Models for Depressive Disorders. **Understanding Depression: Volume 1. Biomedical and Neurobiological Background**, p. 221, 2018.
- DAHLBOM, S. J. et al. Boldness Predicts Social Status in Zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23565, 17 ago. 2011.
- DAHLBOM, S. J. et al. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 333–338, 17 mar. 2012.
- DAHLBOM, S. J. **Bully or Bullied?: The Zebrafish as a Model for Social Stress and Depression.** [s.l: s.n.].
- DALGLEISH, T.; WERNER-SEIDLER, A. **Disruptions in autobiographical memory processing in depression and the emergence of memory therapeutics.** *Trends in Cognitive Sciences*, 2014.
- DE HAAS, E. N. et al. Individual differences in personality in laying hens are related to learning a colour cue association. **Behavioural Processes**, v. 134, p. 37–42, jan. 2017.
- DEMIN, K. A. et al. **The role of intraspecies variation in fish neurobehavioral and neuropharmacological phenotypes in aquatic models.** *Aquatic Toxicology*, 2019.
- DEMIN, K. A. et al. **Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish.** *Stress*, 2020a.
- DEMIN, K. A. et al. **Cross-species Analyses of Intra-species Behavioral Differences in Mammals and Fish.** *Neuroscience*, 2020b.
- DEPASQUALE, C. et al. The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behaviour. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1823, p. 20152564, 27 jan. 2016.
- DEPASQUALE, C. et al. The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, 2019.
- DEPASQUALE, C.; LERI, J. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, 2018.
- DEPASQUALE, C.; STURGILL, J.; BRAITHWAITE, V. A. A standardized protocol for preference testing to assess fish welfare. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 156, 1 fev. 2020.
- DÉSIRÉ, L. et al. On the way to assess emotions in animals: do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? **Journal of Comparative Psychology**, v. 118, n. 4, p. 363, 2004.

- DOUGLAS, C. et al. Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, 2012.
- DUNCAN, I. J. **Measuring preferences and the strength of preferences. Poultry science**, 1992.
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2009.
- ENKEL, T. et al. Ambiguous-Cue Interpretation is Biased Under Stress- and Depression-Like States in Rats. **Neuropsychopharmacology** 2010 **35:4**, v. 35, n. 4, p. 1008–1015, 30 dez. 2009.
- EXNEROVÁ, A. et al. Personality matters: individual variation in reactions of naive bird predators to aposematic prey. **Proceedings. Biological sciences**, v. 277, n. 1682, p. 723–728, 7 mar. 2010.
- EYSENCK, M. W. et al. Bias in Interpretation of Ambiguous Sentences Related to Threat in Anxiety. **Journal of Abnormal Psychology**, 1991.
- FARES, R. P. et al. Standardized Environmental Enrichment Supports Enhanced Brain Plasticity in Healthy Rats and Prevents Cognitive Impairment in Epileptic Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 14 jan. 2013.
- FAUSTINO, A. I.; OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, R. F. Linking appraisal to behavioral flexibility in animals: Implications for stress research. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2015.
- FIFE-COOK, I.; FRANKS, B. Positive Welfare for Fishes: Rationale and Areas for Future Study. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 31, 23 maio 2019.
- FILBY, A. L. et al. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 5, p. 576–587, 2 dez. 2010.
- FILE, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 3–12, 1996.
- FONTANA, B. D. et al. Moderate early life stress improves adult zebrafish (*Danio rerio*) working memory but does not affect social and anxiety-like responses. **Developmental Psychobiology**, 2020.
- FORKMAN, B. et al. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiology and Behavior**, 2007.
- FRANKS, B. What do animals want? **Animal Welfare**, 2019.
- FRANKS, B.; GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. Is Heightened-Shoaling a Good Candidate for Positive Emotional Behavior in Zebrafish? **Animals**, v. 8, n. 9, p. 152, 24 ago. 2018.
- FULCHER, N. et al. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. **Zebrafish**, v. 14, n. 1, p. 23–34, fev. 2017.

- GAIKWAD, S. et al. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. **Behavioural Processes**, 2011.
- GALHARDO, L.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, R. F. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 130, n. 1–2, p. 60–70, fev. 2011.
- GALHARDO, L.; VITAL, J.; OLIVEIRA, R. F. The role of predictability in the stress response of a cichlid fish. **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 3–4, p. 367–372, 1 mar. 2011.
- GATTO, E. et al. The devil is in the detail: Zebrafish learn to discriminate visual stimuli only if salient. **Behavioural Processes**, v. 179, 1 out. 2020.
- GENARIO, R. et al. **The evolutionarily conserved role of melatonin in CNS disorders and behavioral regulation: Translational lessons from zebrafish.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2019.
- GERLAI, R. Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 178, p. 30–38, 1 mar. 2019.
- GERLAI, R. **Evolutionary conservation, translational relevance and cognitive function: The future of zebrafish in behavioral neuroscience.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.
- GIACOMINI, A. C. V. V. et al. My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. **Physiology and Behavior**, v. 139, p. 182–187, fev. 2015.
- GIACOMINI, A. C. V. V. V. et al. Environmental and pharmacological manipulations blunt the stress response of zebrafish in a similar manner. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28986, 28 set. 2016.
- GORISSEN, M. et al. Differences in inhibitory avoidance, cortisol and brain gene expression in TL and AB zebrafish. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 5, p. 428–438, jun. 2015.
- GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. Free-choice exploration increases affiliative behaviour in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, 2018a.
- GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. **Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour.** **Applied Animal Behaviour Science**, 2018b.
- GREEN, T. C.; MELLOR, D. J. Extending ideas about animal welfare assessment to include ‘quality of life’ and related concepts. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2011.610283>, v. 59, n. 6, p. 263–271, nov. 2011.
- GREENAWAY, K. H.; KALOKERINOS, E. K.; WILLIAMS, L. A. Context is Everything (in Emotion Research). **Social and Personality Psychology Compass**, 2018.
- GREIVELDINGER, L.; VEISSIER, I.; BOISSY, A. The ability of lambs to form expectations and the emotional consequences of a discrepancy from their expectations. **Psychoneuroendocrinology**, 2011.

- GRONQUIST, D.; BERGES, J. A. Effects of Aquarium-Related Stressors on the Zebrafish: A Comparison of Behavioral, Physiological, and Biochemical Indicators. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 25, n. 1, p. 53–65, mar. 2013.
- GYGAX, L. The A to Z of statistics for testing cognitive judgement bias. **Animal Behaviour**, v. 95, p. 59–69, 2014.
- HARDING, E. J.; PAUL, E. S.; MENDEL, M. Cognitive bias and affective state. **Nature**, 2004.
- HEDLUND, L.; LØVLIE, H. Personality and production: Nervous cows produce less milk. **Journal of Dairy Science**, 2015.
- HEIJTZ, R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 15 fev. 2011.
- HENDRIE, C. A.; WEISS, S. M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 13–20, 1996.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.
- HOLLEY, E. D. et al. Predictability of food supply, but not ration, increases exploratory behaviour in zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, 2014.
- IYASERE, O. S. et al. Elevated levels of the stress hormone, corticosterone, cause “pessimistic” judgment bias in broiler chickens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- JOHANSSON, J. I.; CARLSSON, M.; SUNDSTROM, L. F. Habitat preference increases territorial defence in brown trout (*Salmo trutta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 48, n. 5, p. 373–377, 2000.
- JONES, N. A. R. et al. Shade as enrichment: testing preferences for shelter in two model fish species. **Journal of fish biology**, v. 95, n. 4, p. 1161–1165, 1 out. 2019.
- JONES, N. A. R.; WEBSTER, M. M.; SALVANES, A. G. V. Physical enrichment research for captive fish: Time to focus on the DETAILS. **Journal of Fish Biology**, 2021.
- KALUEFF, A. V. et al. **Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. Zebrafish**, 2013.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. **Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. Trends in Pharmacological Sciences** Elsevier Current Trends, , 1 fev. 2014.
- KAREKLAS, K.; ELWOOD, R. W.; HOLLAND, R. A. Grouping promotes risk-taking in unfamiliar settings. **Behavioural Processes**, 2018.
- KECK, V. A. et al. Effects of Habitat Complexity on Pair-Housed Zebrafish. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 4, p. 378–83, jul. 2015.
- KEEHN, J. D. **Animal models for psychiatry**. [s.l.: s.n.].

- KEEN, H. A. et al. Validation of a novel cognitive bias task based on difference in quantity of reinforcement for assessing environmental enrichment. **Animal cognition**, v. 17, n. 3, p. 529–541, 2014.
- KENNEY, J. W. et al. Contextual fear conditioning in zebrafish. **Learning and Memory**, 2017.
- KERN, E. M. A. et al. Correlated evolution of personality, morphology and performance. **Animal Behaviour**, v. 117, p. 79–86, jul. 2016.
- KIRSTEN, K. et al. First description of behavior and immune system relationship in fish. **Scientific Reports**, 2018.
- KIRSTEN, K. et al. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 107–112, 2021.
- KISTLER, C. et al. Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 4, p. 318–327, dez. 2011.
- KOOLHAAS, J. M.; REENEN, C. G. VAN. Interaction between coping style / personality , stress , and welfare : Relevance for domestic farm animals 1. **Journal of Animal Science**, 2016.
- KORTZFLEISCH, V. T. VON et al. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments’. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 6 out. 2020.
- KOŠŤÁL, L.; SKALNÁ, Z.; PICOVÁ, K. Use of cognitive bias as a welfare tool in poultry. **Journal of Animal Science**, 2020.
- KREMER, L. et al. Housing and personality effects on judgement and attention biases in dairy cows. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 26 nov. 2021.
- KRZYSZTOF, W.; PRZEMYSŁAW, P. C.; ROMAN, K. Cognitive bias test as a tool for accessing fish welfare. **Frontiers in Marine Science**, 2015.
- KYSIL, E. V. et al. **Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests**. **Zebrafish**, 2017.
- LAGISZ, M. et al. Optimism, pessimism and judgement bias in animals: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 118, p. 3–17, 1 nov. 2020.
- LALOT, M. et al. You know what? I’m happy. Cognitive bias is not related to personality but is induced by pair-housing in canaries (*Serinus canaria*). **Behavioural Processes**, v. 134, p. 70–77, jan. 2017a.
- LALOT, M. et al. You know what? I’m happy. Cognitive bias is not related to personality but is induced by pair-housing in canaries (*Serinus canaria*). **Behavioural Processes**, v. 134, p. 70–77, 1 jan. 2017b.
- LAMBERT, H.; CARDER, G. Positive and negative emotions in dairy cows: Can ear postures be used as a measure? **Behavioural Processes**, 2019.

- LAMPE, J. F. et al. Context-dependent individual differences in playfulness in male rats. **Developmental Psychobiology**, v. 59, n. 4, p. 460–472, maio 2017.
- LAUBU, C.; LOUÂPRE, P.; DECHAUME-MONCHARMONT, F. X. Pair-bonding influences affective state in a monogamous fish species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1904, 12 jun. 2019.
- LAWRENCE, C.; EBERSOLE, J. P.; KESSELL, R. V. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Biology of Fishes** **2007 81:2**, v. 81, n. 2, p. 239–246, 24 jan. 2007.
- LAWRENCE, C.; EISEN, J. S.; VARGA, Z. M. Husbandry and Health Program Survey Synopsis. <https://home.liebertpub.com/zeb>, v. 13, p. S5–S7, 28 jun. 2016.
- LECORPS, B.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. G. Pessimism and fearfulness in dairy calves. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1421, 23 dez. 2018.
- LEE, C. J.; PAULL, G. C.; TYLER, C. R. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 94, n. 1, p. jfb.13865, 10 dez. 2018.
- LIDSTER, K. et al. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. **Journal of Fish Biology**, v. 90, n. 5, p. 1891–1905, 1 maio 2017.
- LIEGGI, C. et al. The Influence of Behavioral, Social, and Environmental Factors on Reproducibility and Replicability in Aquatic Animal Models. **ILAR Journal**, v. 60, n. 2, p. 270, 2019.
- LIEW, W. C. et al. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34397, 10 abr. 2012.
- LINDSEY, B. W.; TROPEPE, V. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. **Developmental Neurobiology**, v. 74, n. 11, p. 1053–1077, 1 nov. 2014.
- LIU, H. et al. Biological and Psychological Perspectives of Resilience: Is It Possible to Improve Stress Resistance? **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 0, p. 326, 21 ago. 2018.
- LUCON-XICCATO, T.; BISAZZA, A. Individual differences in cognition among teleost fishes. **Behavioural Processes**, v. 141, p. 184–195, 1 ago. 2017.
- LUZIO, A. et al. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 22–35, 1 maio 2016.
- MACLEOD, A. K.; BYRNE, A. Anxiety, depression, and the anticipation of future positive and negative experiences. **Journal of Abnormal Psychology**, 1996.
- MAGALHÃES, R. et al. Biomarkers of resilience and susceptibility in rodent models of stress. Em: **Stress Resilience: Molecular and Behavioral Aspects**. [s.l.: s.n.].
- MAKOWSKA, I. J.; WEARY, D. M. Assessing the emotions of laboratory rats. **Applied Animal Behaviour Science**, 2013.

- MANUEL, R. et al. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: Stronger effects in the resting phase than in the active phase. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 21, p. 3919–3928, 1 nov. 2014.
- MANUEL, R. et al. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio hamilton*). **Zebrafish**, 2015a.
- MANUEL, R. et al. The Effects of Environmental Enrichment and Age-Related Differences on Inhibitory Avoidance in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 152–165, abr. 2015b.
- MANUEL, R. et al. Providing a food reward reduces inhibitory avoidance learning in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 120, p. 69–72, nov. 2015c.
- MARCHANT, J. N. et al. The effect of agonistic interactions on the heart rate of group-housed sows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 46, n. 1–2, p. 49–56, 1995.
- MARCHANT-FORDE, J. N. The science of animal behavior and welfare: Challenges, opportunities, and global perspective. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, p. 16, 2015.
- MARCON, M. et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb176735, 15 fev. 2018a.
- MARCON, M. et al. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. **PeerJ**, v. 6, p. e5136, 5 jul. 2018b.
- MATHESON, S. M.; ASHER, L.; BATESON, M. Larger, enriched cages are associated with “optimistic” response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). **Applied Animal Behaviour Science**, 2008.
- MATHEWS, A. Autobiographical memory and clinical anxiety. **Cognition and Emotion**, 1992.
- MATHEWS, A. Cognitive Approaches to Emotion and Emotional Disorders. **Annual Review of Psychology**, 1994.
- MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.
- MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, 2010b.
- MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, n. 10–12, p. 1099–1123, 1 jan. 2012.
- MAXIMINO, C. et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain and Behavior**, 2013.
- MELLOR, D. J. Positive animal welfare states and reference standards for welfare assessment. **New Zealand Veterinary Journal**, 2015.
- MENDL, M. et al. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. **Applied Animal Behaviour Science**, 2009.

- MENDL, M.; BURMAN, O. H. P.; PAUL, E. S. An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1696, p. 2895–2904, 2010.
- MENDL, M.; PAUL, E. S. Animal affect and decision-making. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 112, p. 144–163, 1 maio 2020.
- MESQUITA, F. O.; BORCATO, F. L.; HUNTINGFORD, F. A. Cue-based and algorithmic learning in common carp: A possible link to stress coping style. **Behavioural processes**, v. 115, p. 25–29, 1 jun. 2015.
- MEYER, B. M. et al. Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 2013.
- MILLER, T. H. et al. Social status–dependent shift in neural circuit activation affects decision making. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 2137–2148, 22 fev. 2017.
- MILLOT, S. et al. Behavioural Stress Responses Predict Environmental Perception in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108800, 29 set. 2014.
- MINEKA, S.; OEHLBERG, K. The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. **Acta Psychologica**, 2008.
- MOGG, K. et al. Effects of threat cues on attentional shifting, disengagement and response slowing in anxious individuals. **Behaviour Research and Therapy**, 2008.
- MOHER, D. et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, jul. 2009.
- MUSTAFA, A.; ROMAN, E.; WINBERG, S. Boldness in Male and Female Zebrafish (*Danio rerio*) Is Dependent on Strain and Test. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2019.
- NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. Näslund, J., & Johnson, J. I. (2016). Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 1, p. 1–30, mar. 2016a.
- NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 1, p. 1–30, mar. 2016b.
- NEVILLE, V. et al. **Pharmacological manipulations of judgement bias: A systematic review and meta-analysis**. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.
- NGUYEN, H. A. T.; GUO, C.; HOMBERG, J. R. **Cognitive Bias Under Adverse and Rewarding Conditions: A Systematic Review of Rodent Studies**. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2020.
- NOVAK, J. et al. An exploration based cognitive bias test for mice: Effects of handling method and stereotypic behaviour. **PLoS ONE**, 2015.

NOWORYTA, K. et al. Neuromolecular Underpinnings of Negative Cognitive Bias in Depression. **Cells** **2021**, Vol. **10**, Page **3157**, v. 10, n. 11, p. 3157, 13 nov. 2021.

NYGREN, T. E. et al. The influence of positive affect on the decision rule in risk situations: Focus on outcome (and especially avoidance of loss) rather than probability. **Organizational Behavior and Human Decision Processes**, 1996.

OHL, F.; PUTMAN, R. J. Animal Welfare Considerations: Should Context Matter? **undefined**, 2014.

OSWALD, M. E. et al. Is Behavioral Variation along the Bold-Shy Continuum Associated with Variation in the Stress Axis in Zebrafish? **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, n. 6, p. 718–728, nov. 2012.

PAGNUSSAT, N. et al. One for all and all for one: The importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. **Zebrafish**, 2013.

PARKER, M. O. et al. Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34992, 11 abr. 2012a.

PARKER, M. O. et al. Discrimination reversal and attentional sets in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 264–268, 15 jun. 2012b.

PAUL, E. S. et al. **Towards a comparative science of emotion: Affect and consciousness in humans and animals.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.

PAUL, E. S.; HARDING, E. J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 3, p. 469–491, 2005.

PAUL, E. S.; MENDEL, M. T. Animal emotion: Descriptive and prescriptive definitions and their implications for a comparative perspective. **Applied animal behaviour science**, v. 205, p. 202–209, 1 ago. 2018.

PAVLIDIS, M. et al. Husbandry of Zebrafish, *Danio Rerio*, and the Cortisol Stress Response. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 524–531, dez. 2013.

PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 60, p. 121–131, jul. 2015.

PIATO, A. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, 2011a.

PIATO, A. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2011b.

PROCTOR, H.; CARDER, G. Can changes in nasal temperature be used as an indicator of emotional state in cows? **Applied Animal Behaviour Science**, 2016.

PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Can ear postures reliably measure the positive emotional state of cows? **Applied Animal Behaviour Science**, 2014.

- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Measuring positive emotions in cows: Do visible eye whites tell us anything? **Physiology and Behavior**, 2015a.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Nasal temperatures in dairy cows are influenced by positive emotional state. **Physiology and Behavior**, 2015b.
- RABBANE, M. G. et al. Effects of stocking density on growth of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). **Bangladesh Journal of Zoology**, 2017.
- RAMBO, C. L. et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH**, v. 171, p. 50–54, 15 mar. 2017.
- RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57, 1997.
- RAMSAY, J. M. et al. Husbandry stress exacerbates mycobacterial infections in adult zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 931–941, nov. 2009.
- RAOULT, C. M. C.; MOSER, J.; GYGAX, L. Mood as cumulative expectation mismatch: A test of theory based on data from non-verbal cognitive bias tests. **Frontiers in Psychology**, 2017.
- RAOULT, V. et al. Stress profile influences learning approach in a marine fish. **PeerJ**, v. 5, p. e3445, 8 jun. 2017.
- REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 85–92, jan. 2018.
- RIBAS, L. et al. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. E941–E950, 7 fev. 2017a.
- RIBAS, L. et al. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 6, p. 1056–1064, 15 mar. 2017b.
- RICE, A. S. C. et al. Sensory profiling in animal models of neuropathic pain: a call for back-translation. **Pain**, v. 159, n. 5, p. 819–824, 2018.
- RICHTER, S. H. et al. A glass full of optimism: Enrichment effects on cognitive bias in a rat model of depression. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, 2012.
- ROBERTSON, C. E. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1786, 21 maio 2014.
- ROBINSON, O. J. et al. The effect of induced anxiety on cognition: Threat of shock enhances aversive processing in healthy individuals. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 217–227, 12 jun. 2011.

ROCHE, D. G.; CAREAU, V.; BINNING, S. A. **Demystifying animal “personality” (or not): Why individual variation matters to experimental biologists.** *Journal of Experimental Biology* Company of Biologists Ltd, , 15 dez. 2016.

ROELOFS, S. et al. **Making decisions under ambiguity: Judgment bias tasks for assessing emotional state in animals.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2016.

ROMÁN, A.-C. et al. Histone H4 acetylation regulates behavioral inter-individual variability in zebrafish. *Genome Biology* **2018 19:1**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 25 abr. 2018.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS ONE*, 2011.

ROSS, M. et al. Welfare-improving enrichments greatly reduce hens’ startle responses, despite little change in judgment bias. *Scientific Reports*, 2019.

ROY, T.; BHAT, A. Learning and Memory in Juvenile Zebrafish: What makes the Difference - Population or Rearing Environment? *Ethology*, v. 122, n. 4, p. 308–318, 1 abr. 2016.

ROY, T.; BHAT, A. Population, sex and body size: Determinants of behavioural variations and behavioural correlations among wild zebrafish *Danio rerio*. *Royal Society Open Science*, 2018a.

ROY, T.; BHAT, A. Repeatability in boldness and aggression among wild zebrafish (*Danio rerio*) from two differing predation and flow regimes. *Journal of Comparative Psychology*, 2018b.

ROY, T.; SHUKLA, R.; BHAT, A. Risk-Taking During Feeding: Between- and Within-Population Variation and Repeatability Across Contexts Among Wild Zebrafish. *Zebrafish*, v. 14, n. 5, p. 393–403, out. 2017.

RUSHEN, J. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 1991.

RUSSELL, J. A. Core affect and the psychological construction of emotion. *Psychological review*, v. 110, n. 1, p. 145, 2003.

SANCHES, E. **Avaliação das Dimensões de Personalidade em *Danio rerio***. Master Thesis—[s.l.] Universidade Federal do Pará, 2018.

SANTACÀ, M. et al. Stimulus characteristics, learning bias and visual discrimination in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, v. 192, 2021.

SANTARELLI, S. et al. Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *European Neuropsychopharmacology*, 2014.

SANTOS, D.; LUZIO, A.; COIMBRA, A. M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquatic Toxicology*, v. 191, p. 141–163, 1 out. 2017.

SCHROEDER, P. et al. What do zebrafish want? Impact of social grouping dominance and gender on preference for enrichment. *Laboratory Animals*, v. 48, n. 4, p. 328–337, 17 out. 2014.

- SCHWARZ, N. **Emotion, cognition, and decision making.** *Cognition and Emotion*, 2000.
- SERT, N. P. DU et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, v. 18, n. 7, p. e3000410, 1 jul. 2020.
- SHAMS, S. et al. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. *Behavioral Neuroscience*, 2017.
- SHAMS, S. et al. Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. *Developmental Psychobiology*, v. 60, n. 1, p. 43–56, jan. 2018.
- SHAMS, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 292, p. 283–287, out. 2015.
- SIMPSON, J.; KELLY, J. P. **The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects.** *Behavioural Brain Research*, 2011.
- SINGHAL, G. et al. **Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014.
- SMAIL, M. A. et al. **Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* Elsevier Inc., , 1 out. 2020. . Acesso em: 7 abr. 2021
- SMITH, A. J. et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Laboratory Animals*, v. 52, n. 2, p. 135–141, 1 abr. 2018.
- SOARES, S. M. et al. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according to controlled housing conditions. *Physiology & Behavior*, v. 222, p. 112944, 1 ago. 2020.
- SONG, C. et al. Building neurophenomics in zebrafish: Effects of prior testing stress and test batteries. *Behavioural Brain Research*, v. 311, p. 24–30, set. 2016.
- SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 81, p. 384–394, 2 fev. 2018.
- SPENCE, R.; MAGURRAN, A. E.; SMITH, C. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. *Animal Cognition*, v. 14, n. 4, p. 607–612, 1 jul. 2011.
- STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 4, n. 3, p. 231, 2002.
- STEPHENSON, E.; HASKELL, M. J. The Use of a “Go/Go” Cognitive Bias Task and Response to a Novel Object to Assess the Effect of Housing Enrichment in Sheep (*Ovis aries*). *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 25, n. 1, p. 62–74, 2022.
- STEVENS, C. H.; REED, B. T.; HAWKINS, P. Enrichment for Laboratory Zebrafish—A Review of the Evidence and the Challenges. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 698, 5 mar. 2021.

STEWART, A. et al. **Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review.** *Neuropharmacology. Anais...*2012.

STEWART, A. M. et al. Constructing the habituome for phenotype-driven zebrafish research. **Behavioural Brain Research**, 2013.

STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 1 maio 2014.

STEWART, A. M. et al. Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity. **Zebrafish**, v. 12, n. 5, p. 339–348, out. 2015.

SULLIVAN, M.; LAWRENCE, C.; BLACHE, D. Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment Sullivan, M., Lawrence, C., & Blache, D. (2016). Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment for captive fish. *Applied Animal Behaviour Science.*, **Applied Animal Behaviour Science**, v. 174, p. 181–188, jan. 2016.

SURIYAMPOLA, P. S. et al. Water flow impacts group behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioral Ecology**, v. 28, n. 1, p. arw138, 2016a.

SURIYAMPOLA, P. S. et al. Zebrafish Social Behavior in the Wild. **Zebrafish**, 2016b.

SZPUNAR, K. K.; SCHACTER, D. L. Get real: Effects of repeated simulation and emotion on the perceived plausibility of future experiences. **Journal of Experimental Psychology: General**, 2013.

TELES, M. C.; OLIVEIRA, R. F. Androgen response to social competition in a shoaling fish. **Hormones and behavior**, v. 78, p. 8–12, fev. 2016.

THÖRNQVIST, P. O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 927–934, 1 fev. 2019a.

THÖRNQVIST, P.-O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural brain research**, v. 359, p. 927–934, 1 fev. 2019b.

TOMS, C. N.; ECHEVARRIA, D. J. Back to basics: Searching for a comprehensive framework for exploring individual differences in zebrafish (*Danio Rerio*) behavior. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 325–340, 28 jul. 2014.

TONI, M. et al. Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. **animal** Toni, M., Manciooco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C., & Malavasi, S. (2019). **Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. Animal**, 13(1), 161–170.

<https://doi.org/10.1017/S1751731118000940>, v. 13, n. 1, p. 161–170, 2 jan. 2019a.

TONI, M. et al. Environmental temperature variation affects brain protein expression and cognitive abilities in adult zebrafish (*Danio rerio*): A proteomic and behavioural study. **Journal of Proteomics**, v. 204, 30 jul. 2019b.

- TRAN, S. et al. Neurochemical factors underlying individual differences in locomotor activity and anxiety-like behavioral responses in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 65, p. 25–33, 4 fev. 2016.
- TRAN, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, 2014.
- TRAN, S.; GERLAI, R. Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2013.
- TUDORACHE, C. et al. Biological clock function is linked to proactive and reactive personality types. **BMC Biology**, v. 16, n. 1, p. 148, 21 dez. 2018.
- TUDORACHE, C.; SCHAAF, M. J. M. M.; SLABBEKOORN, H. Covariation between behaviour and physiology indicators of coping style in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 3, p. 251–258, dez. 2013.
- UTNE-PALM, A. C.; SMITH, A. Fish as Laboratory Animals. Em: [s.l: s.n.]. p. 375–400.
- VIGNET, C. et al. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, 2013.
- VITAL, C.; MARTINS, E. P. Socially-Central Zebrafish Influence Group Behavior More than Those on the Social Periphery. **PLoS ONE**, 2013.
- VOLGIN, A. D. et al. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 425–432, out. 2018a.
- VOLGIN, A. D. et al. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 425–432, 1 out. 2018b.
- VOLGIN, A. D. et al. **Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions.** **Journal of Neuroscience Research**, 2019.
- VON KROGH, K. et al. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 1, p. 32–39, ago. 2010.
- WAFER, L. N. et al. Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 291–294, 2016.
- WEARY, D. M.; ROBBINS, J. A. Understanding the multiple conceptions of animal welfare. **Animal Welfare**, v. 28, n. 1, p. 33–40, 1 fev. 2019.
- WEBER, D. N.; GHORAI, J. K. Experimental Design Affects Social Behavior Outcomes in Adult Zebrafish Developmentally Exposed to Lead. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 294–302, set. 2013.
- WHITE, L. J. et al. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, v. 132, p. 189–199, out. 2017.

WICHMAN, A.; KEELING, L. J.; FORKMAN, B. Cognitive bias and anticipatory behaviour of laying hens housed in basic and enriched pens. **Applied Animal Behaviour Science**, 2012.

WILKES, L. et al. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 139, n. 1–2, p. 143–150, jun. 2012.

WOLFER, D. P. et al. Cage enrichment and mouse behaviour. **Nature** 2004 **432:7019**, v. 432, n. 7019, p. 821–822, 15 dez. 2004.

WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2010.

WONG, R. Y. et al. Comparing behavioral responses across multiple assays of stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behaviour**, 2012.

WONG, R. Y.; FRENCH, J.; RUSS, J. B. Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles. **Royal Society Open Science**, 2019.

WOODWARD, M. A.; WINDER, L. A.; WATT, P. J. Enrichment increases aggression in zebrafish. **Fishes**, 2019.

YUAN, M. et al. Behavioral and Metabolic Phenotype Indicate Personality in Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Physiology**, v. 0, n. MAY, p. 653, 30 maio 2018.

ZABEGALOV, K. N. et al. Understanding zebrafish aggressive behavior. **Behavioural processes**, v. 158, p. 200–210, 1 jan. 2018.

ZÁVORKA, L. et al. Effects of Familiarity and Population Density on Competitive Interactions and Growth: An Experimental Study on a Territorial Salmonid Fish. **Ethology**, v. 121, n. 12, p. 1202–1211, 1 dez. 2015.

ZHANG, Z. et al. A Comparative Study on Two Territorial Fishes: The Influence of Physical Enrichment on Aggressive Behavior. **Animals** 2021, **Vol. 11, Page 1868**, v. 11, n. 7, p. 1868, 23 jun. 2021.

ZIDAR, J. et al. Environmental complexity buffers against stress-induced negative judgement bias in female chickens. **Scientific Reports**, 2018.

### 3.3 Artículo III

Jhon Buenhombre, Erika Alexandra Daza-Cardona and Amauri Gouveia Jr, (2022). Structural environmental enrichment and personality influence cognitive bias and anxiety like behaviours in adult zebrafish.

#### **Influencias del enriquecimiento ambiental estructural y la personalidad sobre el sesgo de juicio cognitivo y los comportamientos tipo ansiedad del pez cebra adulto.**

#### **RESUMEN**

El enriquecimiento ambiental puede afectar el sesgo de juicio cognitivo y los comportamientos relacionados a la ansiedad en pez cebra. No obstante, se ha evidenciado que la cognición y la ansiedad también pueden ser influenciadas por diferencias individuales. Por ende, este estudio tuvo como objetivo mirar los efectos de la personalidad y el enriquecimiento ambiental sobre el sesgo de juicio cognitivo y los comportamientos relacionados a la ansiedad en pez cebra. Para determinar la personalidad los peces fueron evaluados mediante 4 pruebas (Prueba de campo abierto, prueba de inspección de depredador, prueba de cardumen y prueba de espejo) y posteriormente asignados a una de dos categorías de personalidad (tímido-reactivo y osado-proactivo). Una vez determinada la personalidad, los peces fueron asignados a seis manipulaciones de vivienda: estéril constante, enriquecimiento constante, ganancia gradual de enriquecimiento, pérdida gradual de enriquecimiento, ganancia repentina de enriquecimiento y pérdida repentina de enriquecimiento. Posteriormente usamos la prueba de sesgo de juicio cognitivo. Esta prueba evalúa el enlace entre la cognición y la emoción a través de la respuesta de un animal frente a un estímulo ambiguo entre dos estímulos previamente entrenados para ser discriminados. También utilizamos la prueba de claro oscuro para medir los comportamientos relacionados a la ansiedad y mirar si los resultados covariaban con aquellos del sesgo de juicio cognitivo. Encontramos que los peces tímidos-reactivos presentaban más comportamientos de ansiedad y tenían una menor tasa de aprendizaje discriminativo que los peces osados-proactivos. También encontramos que una ganancia repentina de enriquecimiento ambiental generaba más comportamientos tipo ansiedad que un enriquecimiento constante independientemente del tipo de personalidad evaluado. Finalmente, no pudimos comparar los efectos de la personalidad sobre el sesgo de juicio cognitivo para los peces tímidos-reactivos por la ausencia de aprendizaje discriminativo previo como prerrequisito para la subsecuente prueba de sesgo de juicio cognitivo. Los datos evaluados proporcionan cierta evidencia de que la personalidad y el enriquecimiento ambiental estructural afectan las conductas relacionadas a

la ansiedad en pez cebra adulto. Trabajos adicionales deben realizarse para confirmar estas premisas y para determinar los efectos de la personalidad sobre el sesgo cognitivo en pez cebra adulto.

## INTRODUCCIÓN

El pez cebra se ha convertido en uno de los modelos animales más usados a nivel mundial (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b). No obstante, existen pocos acuerdos sobre los estándares para su manejo y cuidado, con prácticas que varían bastante entre laboratorios (LAWRENCE; EISEN; VARGA, 2016; LIDSTER et al., 2017; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021). Adicionalmente este pez es normalmente alojado en condiciones que difieren bastante de su ambiente natural (GRAHAM; VON KEYSERLINGK; FRANKS, 2018b). Esto junto con una creciente preocupación sobre la sintiencia y el bienestar de los peces ha incrementado la atención sobre como el pez cebra debería ser alojado y mantenido (BUENHOMBRE et al., 2021; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021).

Hoy en día el bienestar animal considera la noción de estados afectivos, incluyendo las emociones y el humor, que reflejan la experiencia subjetiva de un evento por el animal (WEARY; ROBBINS, 2019). Estos estados poseen la propiedad de valencia, lo que significa que pueden ser positivos o negativos, gratificantes o punitivos, agradables o desagradables, etc. (PAUL et al., 2020). En consecuencia, actualmente se considera que un animal tiene un bienestar adecuado cuando el balance entre los estados afectivos positivos y negativos es en general positivo (GREEN; MELLOR, 2011). En el caso del pez cebra los indicadores y pruebas existentes solo evalúan estados emocionales negativos como aquellos relacionados a la ansiedad (BUENHOMBRE et al., 2021). Por ende, para generar una evaluación adecuada del bienestar en el pez cebra se requieren nuevas metodologías que no solo evalúen estados emocionales negativos sino también positivos. Para ello se podrían extrapolar metodologías usadas en la psicología cognitiva humana.

El enlace entre la cognición y los estados afectivos es ampliamente aceptado en humanos (MENDL; PAUL, 2020). En general personas que reportan un estado afectivo negativo (*e.g.*, ansiedad) muestran una mayor atención a estímulos amenazantes (*e.g.*, imágenes de rostros enfadados), son más propensos a recuperar recuerdos negativos y emiten juicios negativos sobre eventos futuros o estímulos ambiguos ("pesimismo"), en comparación con personas en un estado más positivo (BARNARD et al., 2018). Por analogía este tipo de sesgos cognitivos han sido utilizados en animales no humanos, observándose que los estados afectivos

animales también pueden influenciar la atención, la memoria y la toma de decisiones en varias especies (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; BETHELL, 2015; RAOULT; MOSER; GYGAX, 2017; ROELOFS et al., 2016).

Uno de los paradigmas más utilizados entre estos sesgos, es el sesgo de juicio cognitivo (SJC) o de la toma de decisiones. La lógica detrás del SJC se basa en la idea de que los animales en estados afectivos positivos juzgan las situaciones ambiguas de forma más positiva (es decir, con más optimismo) y los animales en un estado emocional negativo serían más propensos a interpretar las señales ambiguas como la predicción de un evento negativo ("pesimismo") (ROELOFS et al., 2016). Desde el experimento pionero realizado en roedores (HARDING; PAUL; MENDEL, 2004), esta prueba se ha propuesto como procedimiento estándar para medir los estados emocionales y el bienestar de los animales (BATESON; NETTLE, 2015; MARCHANT-FORDE, 2015).

El proceso de la toma de decisiones es influenciado por los estados afectivos actuales y el entorno donde se encuentra el animal puede ser manipulado para influenciar esos estados y producir cambios en el sesgo de juicio cognitivo (BETHELL; KOYAMA, 2015). Por lo tanto, se podrían usar modificaciones como la adición o exclusión de enriquecimiento ambiental para modificar el entorno y evaluar indirectamente mediante la cognición como cambian los estados afectivos en respuesta a la modificación ambiental en pez cebra. Por ejemplo, cerdos (DOUGLAS et al., 2012) y ovejas (STEPHENSON; HASKELL, 2022) alojados en condiciones de enriquecimiento muestran respuestas más optimistas que los alojados en condiciones estériles. De manera similar canarios (LALOT et al., 2017a) y terneros (BUČKOVÁ; ŠPINKA; HINTZE, 2019) alojados en parejas son más optimistas que los animales alojados de forma individual.

Además de las modificaciones ambientales, la personalidad (consistencia del comportamiento y la fisiología a través del tiempo y el contexto) (TOMS; ECHEVARRIA, 2014) también puede influenciar el SJC en animales. Por ejemplo, para terneros mantenidos bajo las mismas condiciones, aquellos que fueron caracterizados como temerosos, mostraron mayor pesimismo que los catalogados como no temerosos (LECORPS; WEARY; VON KEYSERLINGK, 2018). De manera similar, perros catalogados con alta sociabilidad, excitabilidad y miedo no social presentaron conductas más optimistas, mientras que aquellos con rasgos de separación y de miedo/agresión presentaron conductas más pesimistas (BARNARD et al., 2018).

Adicionalmente, parece que el alojamiento y la personalidad interactúan para modificar el SCJ de acuerdo con la especie. En cerdos, individuos con una personalidad más proactiva respondieron de forma más optimista a estímulos ambiguos independientemente de sus condiciones de alojamiento (o enriquecimiento). Sin embargo, el optimismo/pesimismo de los cerdos reactivos se vio afectado por su entorno (ASHER et al., 2016). De manera similar en gallinas, aquellas catalogadas como exploradoras mostraron más "optimismo" en respuesta al enriquecimiento, respuesta no observada en aquellas catalogadas como no exploratorias (ROSS et al., 2019). En vacas solamente la personalidad influyo en la respuesta frente a estímulos ambiguos mientras que las condiciones de alojamiento no influyeron en el SJC (KREMER et al., 2021). En canarios por el contrario fue el contexto social y no la personalidad lo que influyo en el SCJ (LALOT et al., 2017a). Por ende, ya que ciertas subpoblaciones de animales pueden ser más sensibles que otras a los cambios en las condiciones de alojamiento, parece necesario tener en cuenta las variaciones individuales, particularmente la personalidad, para validar los resultados del SCJ y el uso de modificaciones ambientales como modelo de estados afectivos en el pez cebra.

Por lo tanto, en nuestro estudio, nos propusimos a investigar el efecto de los rasgos de personalidad (Osadía-Timidez/Proactivo-Reactivo) sobre el SCJ en peces cebra mantenidos bajo seis condiciones de alojamiento diferentes: sin enriquecimiento constante, con enriquecimiento constante, ganancia súbita de enriquecimiento, ganancia gradual de enriquecimiento, pérdida súbita de enriquecimiento y pérdida gradual de enriquecimiento. Nosotros esperábamos que los peces clasificados como osados tuvieran un sesgo cognitivo diferente que los grupos catalogados como tímidos. Igualmente, de acuerdo con un estudio anterior (BUENHOMBRE et al., 2022) esperábamos que los peces tímidos también presentaran un sesgo cognitivo negativo frente a una ganancia súbita de enriquecimiento ambiental.

Nuestro objetivo secundario fue evaluar el efecto de la personalidad y el enriquecimiento sobre los comportamientos de ansiedad mediante la prueba de claro oscuro, un ensayo comúnmente utilizado para medir la 'ansiedad' en el pez cebra adulto (MAXIMINO et al., 2012). Un tercer objetivo fue verificar si esta prueba covariaba con los resultados del sesgo cognitivo. Después de todo, muchas condiciones humanas caracterizadas por ansiedad también implican un sesgo de juicio negativo (ROBINSON et al., 2011; ROSS et al., 2019). Nosotros esperábamos que los peces con una personalidad tímida presentaran mayor conducta de ansiedad y un mayor sesgo cognitivo negativo que los peces osados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Aspectos éticos**

Todos los procedimientos experimentales realizados están de acuerdo con las pautas establecidas por el Consejo Nacional para el Control de la Experimentación Animal (CONCEA / 2008) y aprobadas por el Comité de Ética del Uso Animal de la Universidad Federal de Pará (CEUA / UFPA) protocolo No. 9868261118.

### **Sujetos y mantenimiento.**

Para este estudio se utilizaron los datos de 68 peces obtenidos en un experimento anterior y se compararon con los resultados arrojados en este nuevo estudio que es una réplica de ese experimento preliminar. Los procedimientos experimentales difieren en el tipo de colores utilizados para el SCJ y la personalidad obtenida para los peces evaluados en el primer estudio que en su mayoría se catalogaron como osados-proactivos mientras que en este la mayoría fueron clasificados como tímidos-reactivos.

Para este estudio se adquirió un total de 72 peces cebra adultos de un año de edad, tipo salvaje de aleta corta. Los peces fueron comprados a un proveedor comercial local y puestos en cuarentena durante tres meses en las instalaciones del laboratorio de la Universidad de Pará (NTPC). Durante la cuarentena, los peces fueron agrupados en tanques Tecniplast® Stand-Alone Tank (16,65 x 21,07 x 5,54 cm) con aireación constante y en un circuito de agua abierto, bajo las siguientes condiciones: temperatura=  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; pH= 6,5; oxígeno disuelto >90%; fotoperíodo de 14 L: 10 D, con luces encendidas a las 06:00 h; densidad de 6 peces por litro; y los peces fueron alimentados dos veces al día a las 8:00 y a las 14:00 con una dieta comercial Tetra Flocculated Feed®.

Durante la fase experimental, primero se realizó una prueba de personalidad, para la cual los peces se mantuvieron en los mismos tanques y condiciones de la cuarentena, pero fueron alojados individualmente.

Una vez terminadas las pruebas de personalidad, comenzó una segunda fase experimental para la cual los peces fueron transferidos a acuarios de tanque de vidrio (21 L; 35 de largo x 25 de ancho x 25 cm de alto) equipados con aireación continúa proporcionada por una bomba de aire para la siguiente fase experimental. El agua se cambió parcialmente (30%) cada dos días durante esta fase del experimento y los peces se mantuvieron bajo características similares a las descritas anteriormente para la cuarentena.

## **Procedimiento experimental**

En este estudio, realizamos dos experimentos. El primer experimento fue el ensayo de personalidad basado en el trabajo de Sanches, (2018). En este cada pez fue sometido a una batería de cuatro pruebas (Prueba de campo abierto, prueba de inspección de depredador, prueba de cardumen y prueba de espejo) con un período de 3 días entre cada prueba.

El segundo experimento determinó los efectos de las manipulaciones de la vivienda sobre las pruebas de sesgo de juicio cognitivo y claro/oscuras. Este experimento siguió cinco pasos: 1. Según el grupo, los peces se asignaron a condiciones enriquecidas o estériles; 2. Habitación al aparato y entrenamiento de discriminación visual (permanecer en el área roja y evitar el área verde); 3. Manipulación del alojamiento; 4. Prueba de sesgo de juicio (tiempo de permanencia en las áreas rojo amarillento y verde amarillento); 5. Prueba de claro/oscura (tiempo de permanencia en el área blanca).

Realizamos todas las pruebas de comportamiento y manipulaciones entre las 6:00 y las 11:30, y probamos cada pez individualmente. Los aparatos de prueba se iluminaron con luz ambiental (bombilla de 75 W, ubicada a 1,80 m sobre la parte superior del acuario), que mantuvo la iluminación uniforme y constante. A esta distancia, la luz ambiental tiende a producir un promedio de 975 lux justo encima del tanque.

Los peces se aclimataron a la sala de pruebas de comportamiento durante 1 h. Para reducir el estrés por la exposición al aire y el aislamiento, transportamos cada grupo de peces cerca del aparato de prueba a través de un recipiente lleno con agua de su tanque de origen. Cada pez se transfirió individualmente del recipiente al dispositivo con un vaso de precipitado. Cambiamos el agua en el aparato después de testear cada pez para evitar la señalización de sustancias.

### **Experimento 1. Prueba de personalidad.**

Para cada una de las cuatro pruebas evaluadas (Prueba de campo abierto, prueba de inspección de depredador, prueba de cardumen y prueba de espejo) la denominación de los comportamientos y sus descripciones (Tabla 8) se basaron en los trabajos de Budaev, (1997) y Kalueff et al., (2013). Para las pruebas de inspección de depredador, cardumen y espejo se registraron las conductas de los primeros 5 minutos de ingreso al aparato como “pretest” y las conductas de los 5 minutos posteriores como “test”. Para campo abierto no se evaluó “pretest” solamente “test”.

Durante los 5 minutos posteriores o “test” se evaluaron las siguientes conductas: Tiempo y frecuencia de movimiento e inmovilidad en todas las pruebas excepto para campo abierto donde solo se evaluó el tiempo y no la frecuencia. El tiempo y las entradas en el centro y la periferia se analizaron solo en la prueba de campo abierto. El tiempo de permanencia y el número de pasajes entre los puntos 1, 2, 3 y 4 y el tiempo y frecuencia de escape, natación errática y congelación se registraron en las pruebas de inspección de predador, cardumen y prueba de espejo. Los comportamientos de inspección al depredador, buscar cardumen, golpes al espejo y mirada fija al espejo solo se analizaron para la prueba respectiva que indica su nombre, por ejemplo, inspección al predador en prueba de inspección de predador y así sucesivamente. Durante los primeros 5 minutos de ingreso al aparato o “pretest” se evaluaron las mismas conductas del “test” exceptuando inspección al depredador, buscar cardumen, golpes al espejo y mirada fija al espejo y la permanencia y número de pasajes en los puntos 3 y 4.

De los datos obtenidos en las pruebas obtuvimos las categorías de personalidad de acuerdo con el modelo propuesto por Budaev, (1997) y modificado por Sanches, (2018). Realizando primero un análisis de confiabilidad y agregación de datos. Después los datos de las variables obtenidas mediante la agregación fueron evaluados mediante un análisis de clúster para generar dos grupos de personalidad.

Tabla 8 - Etograma de los comportamientos analizados en cada prueba, con el nombre utilizado en el texto y su descripción (basado en SANCHES, 2018).

<b>Comportamientos</b>	<b>Descripción</b>
<b>Locomoción</b>	Nº de cuadrantes cruzados
<b>Tiempo en el centro y la periferia</b>	Tiempo de permanencia, respectivamente, en los cuadrantes centrales y periféricos y número de cuadrantes atravesados (cuando 2/3 del animal este en el próximo cuadrante).
<b>Entradas en el centro y la periferia</b>	Nº de entradas, respectivamente, en el centro y periferia o número de cuadrantes atravesados (cuando 2/3 del animal este en el próximo cuadrante).
<b>Número de pasajes</b>	Cantidad de pasajes entre los puntos 1, 2, 3 y 4 o número de cuadrantes atravesados (cuando 2/3 del animal este en el próximo cuadrante).
<b>Permanencia en cada punto</b>	Tiempo total que permanece em el punto 1, 2,3, y 4 o número de cuadrantes atravesados (cuando 2/3 del animal este en el próximo cuadrante).
<b>Inmovilidad</b>	Quedarse quieto sin desplazamiento dentro del acuario.
<b>Congelamiento</b>	Cese completo del movimiento en el fondo del acuario (excepto las branquias y los ojos)

<b>Nado errático</b>	Nade con cambios bruscos de dirección o velocidad con carreras rápidas y repetidas
<b>Movimiento</b>	Movimientos por el acuario aparentemente sin otra razón.
<b>Fuga</b>	Los intentos de escapar a través del cristal golpeando la boca contra este
<b>Inspección al predador</b>	Aproximaciones rápidas e visibles en dirección a imagen del predador
<b>Buscar cardumen</b>	Intenta ingresar al compartimento que contiene miembros de la misma especie
<b>Golpes al espejo</b>	Golpear con la boca al cristal donde aparece su imagen
<b>Mirada fija al espejo</b>	Miradas dirigidas hacia la imagen del espejo mientras nada en medio del acuario

Fuente: Elaboración propia, 2022.

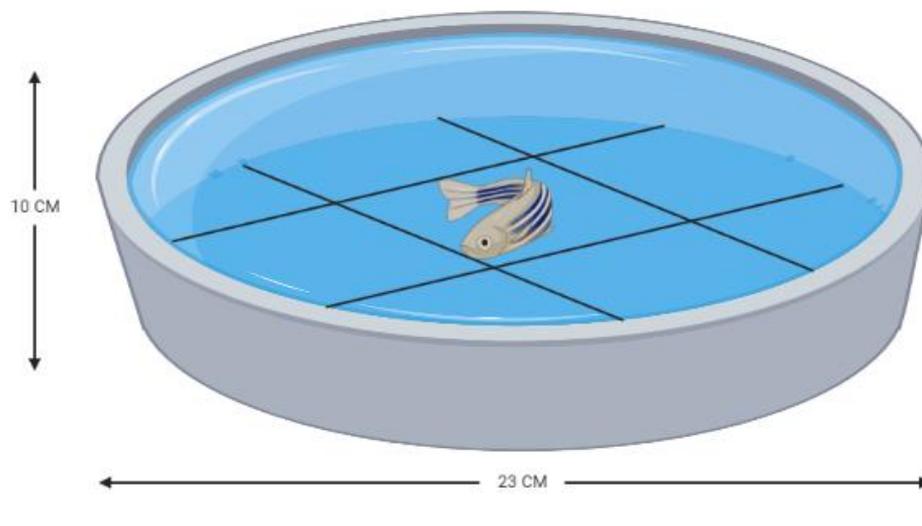
### Descripción de los dispositivos y procedimientos usados para las cuatro pruebas de personalidad.

#### Campo Abierto.

El aparato fue un tanque circular blanco mate de 23 cm de diámetro, 10 cm de alto y una columna de agua de 8 cm. El fondo del acuario se dividió en nueve áreas (1 central y 8 periféricas) (Figura 9).

Cada pez se colocó dentro de un cilindro de plástico blanco opaco en el área central durante 2 minutos para su aclimatación, luego se levantó el cilindro y se observó el comportamiento del pez durante 5 minutos.

Figura 9 - Imagen ilustrativa del Acuario de campo abierto que muestra la dimensión de la cuadrícula para el análisis de locomoción



Fuente: modificado de SANCHES, (2018). Creado en Biorender, 2022.

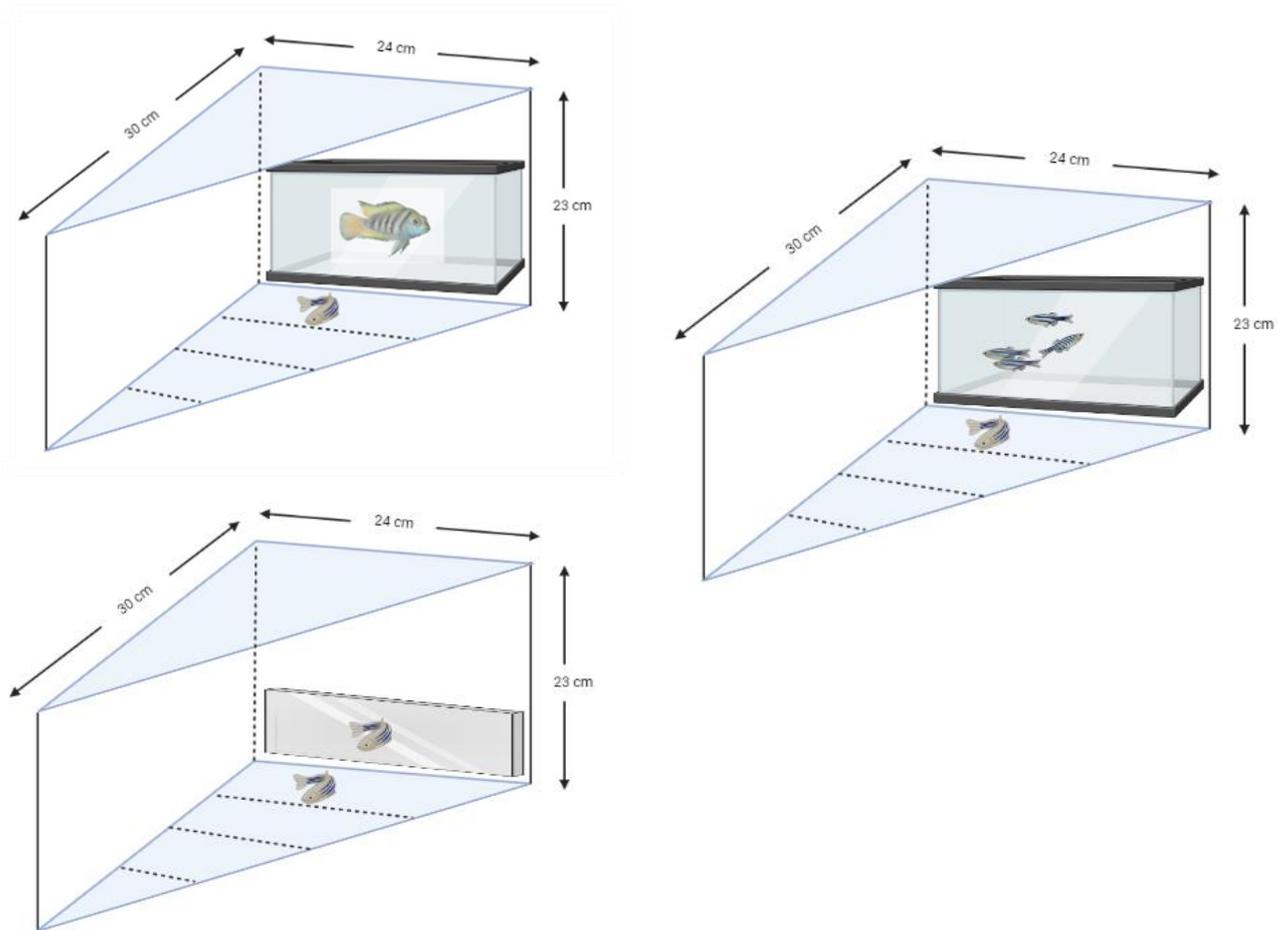
### **Inspección de depredador, cardumen y prueba de espejo.**

El mismo procedimiento y aparato fue utilizado para estas tres pruebas excepto por el estímulo colocado en la base del triángulo al frente del punto 4 dependiendo de cada prueba. De esta forma se colocó un acuario que contenía un pez (*Amatitlania nigrofasciata*), cuatro conespecíficos masculinos y una placa de espejo para la prueba de inspección de depredador, cardumen y prueba de espejo respectivamente (Figura 10).

El aparato para estas pruebas consistió en un acuario triangular con vértices de 30x30x24 cm y 23 cm de profundidad y una columna de agua de 10 cm, que contenía una puerta deslizante que separaba aproximadamente 1/3 del tamaño total del acuario (compartimento llamado compartimento de inicio). El fondo del acuario contenía tres líneas paralelas que delimitarán cuatro áreas (Punto 1: 28 cm; Punto 2: 18 cm; Punto 3: 11 cm; Punto 4: 3 cm) (Figura 10).

Cada pez se colocó en el compartimento de partida con la puerta extraíble cerrada y se observó durante 5 minutos (Pre-test), luego, levantamos la puerta deslizante, dejando que el pez saliera del área de partida para explorar todo el aparato y se observó al pez durante 5 minutos (Test).

Figura 10 - Imagen ilustrativa de la prueba de inspección de depredador, cardumen y prueba de espejo



**Fuente:** modificado de SANCHES, 2018). Creado en Biorender, 2022. **Leyenda:** Imagen ilustrativa de la prueba de inspección de depredador, cardumen y prueba de espejo que muestra las dimensiones y los límites de los puntos 1, 2, 3 y 4.

## Experimento 2. Efectos de las manipulaciones del alojamiento sobre el sesgo de juicio cognitivo y la prueba de claro/oscuro.

Setenta y dos peces se dividieron aleatoriamente en seis grupos experimentales o manipulaciones de alojamiento de 12 individuos por grupo ( $n = 12/\text{tratamiento}$ ): grupo I (enriquecimiento constante), II (pérdida gradual de enriquecimiento), III (pérdida repentina de enriquecimiento), IV (estéril constante), V (ganancia gradual de enriquecimiento) y VI (ganancia repentina de enriquecimiento). Ya que tres peces no aprendieron a alimentarse en el entrenamiento de discriminación visual, estos fueron retirados del estudio. Por ende, para el entrenamiento de discriminación visual se utilizaron sesenta y nueve peces. De manera similar cinco peces terminaron el entrenamiento con dolencias y por ende fueron retirados para la

prueba de sesgo cognitivo y claro/oscuro. En consecuencia, para estas últimas pruebas se evaluaron sesenta y cuatro peces.

El enriquecimiento ambiental estructural se basó en una jerarquía de preferencias por las características bióticas del hábitat del pez cebra (SCHROEDER et al., 2014). El enriquecimiento estructural aquí consistió en los siguientes cuatro elementos: arena (<1 mm), grava (>5 mm), cuatro palos de bambú de plástico y cinco plantas de plástico.

### **Sesgo cognitivo**

#### **Aparato para la prueba de sesgo de juicio cognitivo**

El aparato para la habituación y entrenamiento de discriminación visual que preceden al SJC consistió en un acuario de vidrio rectangular hecho a la medida (45 x 10 x 15 cm<sup>3</sup>) forrado con papel de contacto opaco no reflectante que cubría las paredes y el fondo del acuario. El aparato se dividió en tres zonas: una mitad roja y otra mitad verde con las mismas dimensiones (15 x 10 x 15 cm<sup>3</sup>) separadas por una zona blanca central (área de espera) (10 x 10 x 15 cm<sup>3</sup>). El área de espera tenía dos puertas corredizas blancas que definían una caja central en esta área.

Asimismo, para la prueba de SJC utilizamos el mismo aparato con el dispositivo forrado en colores ambiguos (verde y rojo amarillento).

#### **Habitación para la prueba de sesgo de juicio cognitivo**

Los peces se sometieron a una serie de cuatro pruebas de habituación: dos pruebas reforzadas (con comida) en el área roja y dos no reforzadas en el área verde. En cada prueba, colocamos un pez en el área de espera durante unos dos minutos. Luego, levantamos una puerta corrediza para permitir que los peces investigaran libremente el área correspondiente mientras que la otra puerta corrediza permanecía cerrada para evitar que los peces pasaran al lado opuesto. La prueba reforzada finalizó 30 segundos después de que el pez hubiera consumido su alimento o un minuto y medio después de la exploración. La prueba no reforzada finalizó un minuto y medio después de la exploración.

#### **Entrenamiento para la prueba de sesgo de juicio cognitivo**

Para el entrenamiento, realizamos 12 ensayos que duraron aproximadamente cuatro minutos cada uno. Primero, colocamos a cada pez individualmente en el área de espera durante unos dos minutos. Luego, levantamos las puertas corredizas, dejando que el pez saliera del área

de espera para explorar las áreas verde y roja. El pez fue recompensado con comida solo cuando permaneció en el área roja (el área objetivo) durante estas sesiones. Proporcionamos tres recompensas de alimentos. El pez recibió la primera recompensa inmediatamente después de ingresar a la zona roja. Ofrecimos una segunda recompensa 30 segundos después si el pez había comido todo su alimento y permanecía en el área; de lo contrario, el pez no recibió más alimento hasta que volvió a entrar en el área roja. Siempre que el pez cumpliera con la condición anterior, recibía una tercera recompensa 30 segundos después o no recibía comida hasta que la prueba finalizaba 30 segundos después. Determinamos qué color ocupaba la posición izquierda según esta secuencia GRRGRGGRRGRG (G = verde, R = rojo).

Medimos la latencia y duración de los peces en cada área para evaluar el proceso de aprendizaje de la discriminación visual. Los criterios para el aprendizaje de la tarea de discriminación fueron la latencia media en la aproximación a la zona verde ( $< 2$  s) y el tiempo medio de permanencia en la zona verde ( $> 70$  s) durante las tres últimas sesiones de entrenamiento.

No alimentamos a los peces en sus tanques de alojamiento durante los días de habituación y entrenamiento, sino en el aparato de prueba. Las recompensas de comida para el experimento consistieron en aproximadamente cuatro hojuelas de Tetra Flocculated Feed®.

### **Prueba de sesgo de juicio cognitivo**

La prueba de sesgo de juicio generalmente pasa por tres etapas (*e.g.*, (BETHELL, 2015; LAGISZ et al., 2020; NEVILLE et al., 2020)). Por lo tanto, seguimos estos pasos para llevar a cabo esta prueba.

En la primera etapa, realizamos un entrenamiento de discriminación visual en un campo de dos opciones. Los peces debían permanecer en el área roja para obtener un resultado favorable (hojuela de alimento) y evitar el área roja que indicaba un resultado relativamente negativo (sin alimento). Ejecutamos este procedimiento durante 16 días, 4 días de habituación y 12 días de entrenamiento. Durante esta etapa, los peces se mantuvieron en condiciones enriquecidas (I enriquecimiento constante, II pérdida gradual de enriquecimiento y III pérdida repentina de enriquecimiento) o estériles (IV constante estéril, V ganancia gradual de enriquecimiento y VI ganancia repentina de enriquecimiento).

En la segunda etapa, ejecutamos las manipulaciones de la vivienda. Una vez que finalizamos el entrenamiento de discriminación visual, cambiamos las condiciones de

alojamiento de los peces para manipular sus estados afectivos. Para los grupos I (enriquecimiento constante) y IV (estéril constante) las condiciones se mantuvieron constantes. Eliminamos un ítem por día en el grupo II (pérdida gradual de enriquecimiento) e introducimos un ítem por día en el grupo V (ganancia gradual de enriquecimiento); este procedimiento duró cuatro días consecutivos. En el grupo III (pérdida repentina de enriquecimiento), eliminamos todos los elementos, y en el grupo VI (ganancia repentina de enriquecimiento), agregamos todos los elementos, de una sola vez al día siguiente del entrenamiento de discriminación visual. La lógica fue que condiciones constantes estériles, cambios repentinos y la pérdida de enriquecimiento podían producir un estado afectivo negativo, mientras que una ganancia gradual de enriquecimiento y un enriquecimiento constante podían producir un estado afectivo positivo. Este procedimiento duró cuatro días adicionales.

En la tercera etapa, luego de la manipulación de la vivienda, realizamos la prueba de sesgo de juicio cognitivo. A los peces se les presentaron señales intermedias y, por lo tanto, ambiguas (áreas de color verde amarillento y rojo amarillento). La lógica fue que los animales en un estado emocional positivo probablemente juzgarían estos estímulos ambiguos como si predijeran un resultado positivo (pasarían más tiempo en el área roja amarillenta), en comparación con los animales en un estado negativo. Para ello medimos la duración obtenida para cada zona.

### **Prueba de claro/oscuro**

Al día siguiente de realizar la prueba de sesgo de juicio cognitivo, llevamos a cabo la prueba de claro/oscuro para medir comportamientos similares a la ansiedad. Basamos este procedimiento en el protocolo descrito por Maximino et al. (2010). Brevemente, el aparato era un tanque acrílico rectangular ( $45 \times 10 \times 15 \text{ cm}^3$ ) dividido en tres zonas: una mitad blanca y otra mitad negra con las mismas dimensiones para ambas zonas ( $15 \times 10 \times 15 \text{ cm}^3$ ) separadas por una zona blanca central (área de espera) ( $10 \times 10 \times 15 \text{ cm}^3$ ) con dos puertas corredizas. Llenamos el dispositivo con agua hasta 10 cm de profundidad y los peces se introdujeron individualmente en la cámara central durante cinco minutos para su habituación. Luego, quitamos las puertas corredizas, permitiendo que los peces nadaran libremente en el aparato. Registramos la actividad locomotora del pez durante los siguientes 15 minutos y medimos el tiempo que pasaba en la zona blanca. Evaluamos la proporción del tiempo pasado en el espacio en blanco para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad. Cuanto mayor era el tiempo pasado en el área blanca, menor era el comportamiento similar a la ansiedad.

## **Observaciones de comportamiento**

Registramos todas las observaciones de comportamiento con cámaras de video digitales (GZ-EX210, JVC y DCR-PJ5 y SONY) ubicadas sobre cada aparato, lo que permite una vista completa de los sujetos y todas las áreas del acuario. Posteriormente, los videos se analizaron con los programas Zebtrack® (duraciones) y BORIS® (latencias). Todos los videos fueron codificados por un solo observador entrenado y ciego.

## **Análisis estadístico**

### **Experimento 1**

Los datos se analizaron utilizando IBM SPSS Statistics®. El análisis de personalidad siguió las recomendaciones de Budaev, (1997) y Sanches, (2018), evaluando las variables más correlacionadas mediante Pearson para el análisis de confiabilidad y agregación de datos. En total, se incluyeron 26 medidas dentro del análisis: Tiempo y frecuencia de nado errático e inmovilidad para prueba de cardumen; entradas y tiempo en el centro y tiempo en la periferia para prueba de campo abierto; número de pasajes y tiempo de permanencia en los puntos 1, 2, 3 y 4 para pruebas de espejo, predador y cardumen; tiempo de permanencia en los puntos 1 y 2 del pretest para espejo y cardumen. Con las puntuaciones obtenidas para estas medidas se realizó un análisis de clúster (K-mean cluster) y la representación gráfica del orden de esos agrupamientos o conglomerados-cluster jerárquicos, mediante un dendograma, para identificar las dimensiones de la personalidad entre los peces del estudio actual (N = 72) y del estudio anterior (N = 68) con el que comparamos los resultados.

### **Experimento 2**

Los datos se analizaron utilizando IBM SPSS Statistics®. Se confirmaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los datos que no se ajustaban a una distribución normal o tenían desviaciones estándar considerablemente diferentes se transformaron para cumplir con los supuestos. Los datos que no cumplieron con los supuestos aún después de la transformación fueron analizados con la prueba no paramétrica correspondiente.

El análisis utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks reveló que los datos no se distribuyeron normalmente. Debido a que los datos no pudieron normalizarse después de la transformación, se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis de datos.

Los parámetros medidos para las pruebas de sesgo de juicio cognitivo y claro/oscuro se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de un análisis post hoc de Dunn-Bonferroni para determinar las diferencias significativas entre grupos específicos.

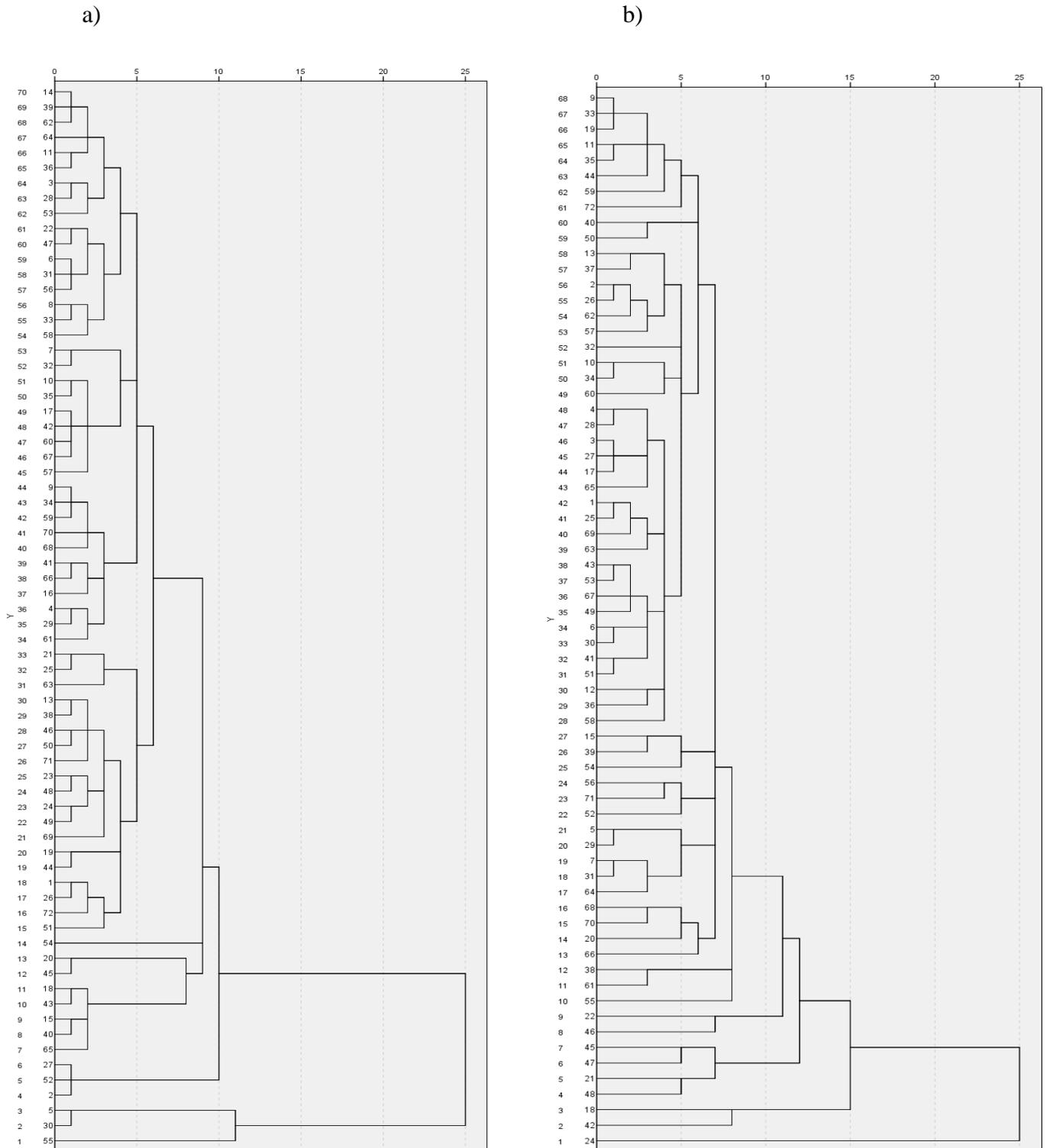
Para evaluar el aprendizaje de discriminación visual, se llevó a cabo una prueba de Friedman seguida de un análisis post hoc de Dunn-Bonferroni para comparar los aprendizajes entre ensayos. Para cada ensayo, se llevó a cabo una prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre los grupos de enriquecimiento y estériles.

## **Resultados.**

### **Experimento 1**

Los datos arrojados por el análisis de clúster (K-mean cluster) mostraron consistencias comportamentales a través de las cuatro pruebas indicando dos perfiles conductuales o de personalidad: Un primer grupo más osado, activo, agresivo, sociable y más reactivo a estímulos. Un segundo grupo más tímido, menos activo, menos agresivo y sociable. Estos fenotipos pueden ser asociados a los ejes osado-tímido, proactivo-reactivo observados en varias especies. Para el estudio actual encontramos que la mayoría de los peces tenían una personalidad más tímida-reactiva (N = 72) mientras que en el estudio anterior (N = 68) la mayoría tenían una personalidad más osada (Figura 11).

Figura 11 - Dendrograma del análisis de clúster para la categorización de los peces en dos fenotipos comportamentales



**Fuente:** Software SPSS® IBM Company – V 19. **Elaboración propia.** **Leyenda:** a) Gráfico izquierdo donde la mayoría de los peces fueron categorizados como osados-proactivos. n=68. b) Gráfico derecho donde la mayoría de los peces fueron categorizados como tímidos-reactivos. n=72.

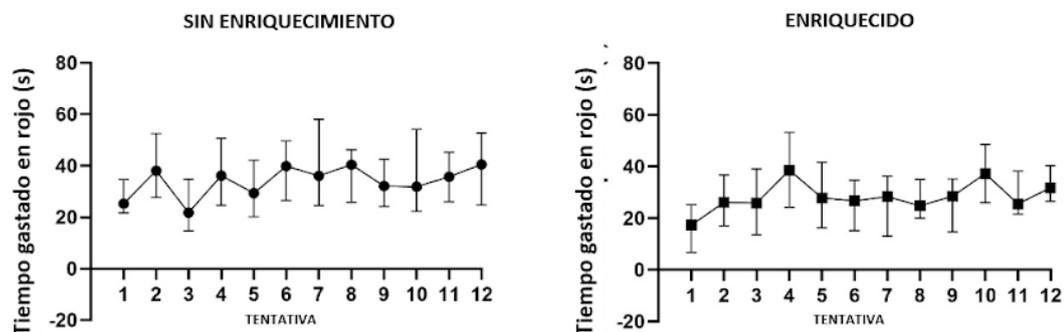
## Experimento 2

### Entrenamiento de discriminación visual grupo tímido-reactivo

La prueba de Friedman arrojó una diferencia significativa entre las sesiones de entrenamiento para el tiempo de duración en el área roja ( $\chi^2[11] = 20,525$ ,  $p = <0.039$ ). No obstante, la prueba Dunn-Bonferroni post hoc solo arrojó diferencia entre la primera y la cuarta sesión ( $p < 0.026$ ) (Figura 12).

Al realizar la comparación entre grupos para cada sesión de entrenamiento, la prueba de Mann-Whitney U encontró una diferencia significativa entre grupos para la sesión dos ( $Z = -2.467$ ,  $p = 0.014$ , Cohen's  $d = 0.29$ ) y siete ( $Z = -2.022$ ,  $p = 0.043$ , Cohen's  $d = 0.23$ ) pero no se encontró una tendencia clara. Por lo cual interpretamos esto como una diferencia ambigua (Figura 12).

Figura 12 - Sesiones de aprendizaje fenotipo tímido-reactivo

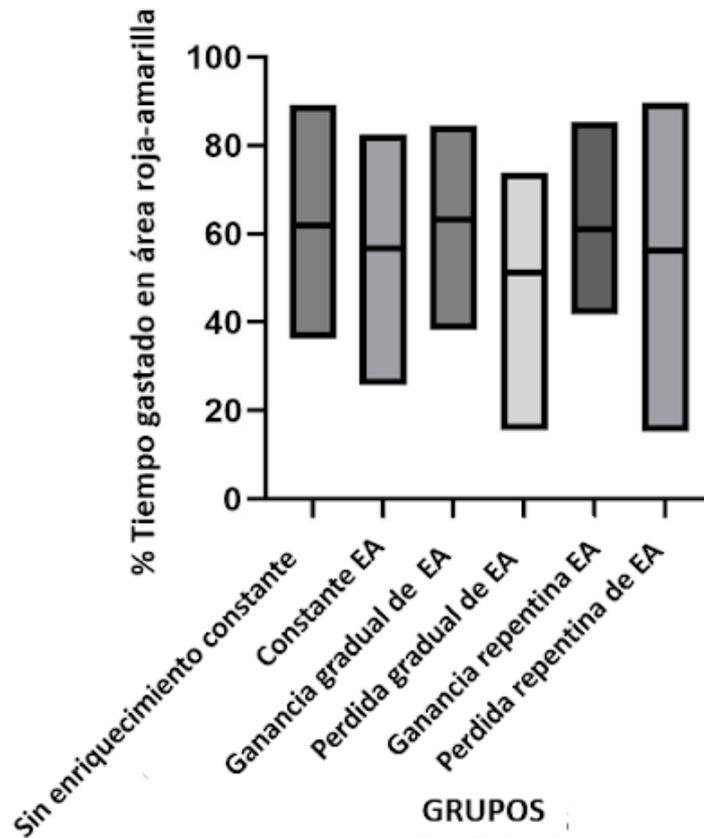


**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** La prueba de Friedman no evidenció diferencias significativas entre las primeras y las últimas sesiones de entrenamiento que indiquen aprendizaje. Igualmente, la prueba de Mann-Whitney U no reveló diferencias de aprendizaje entre los grupos con enriquecimiento ambiental y aquellos mantenidos bajo condiciones estériles.  $n=69$ .

### Sesgo de Juicio Cognitivo grupo tímido-reactivo

Los datos sugieren que no existió cambios en el sesgo cognitivo como resultado de las modificaciones ambientales. La prueba de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas entre tratamientos ( $H(5)=1.713$ ,  $p=0.887$ ). (Figura 12).

Figura 13 - Sesgo de juicio cognitivo fenotipo tímido-reactivo

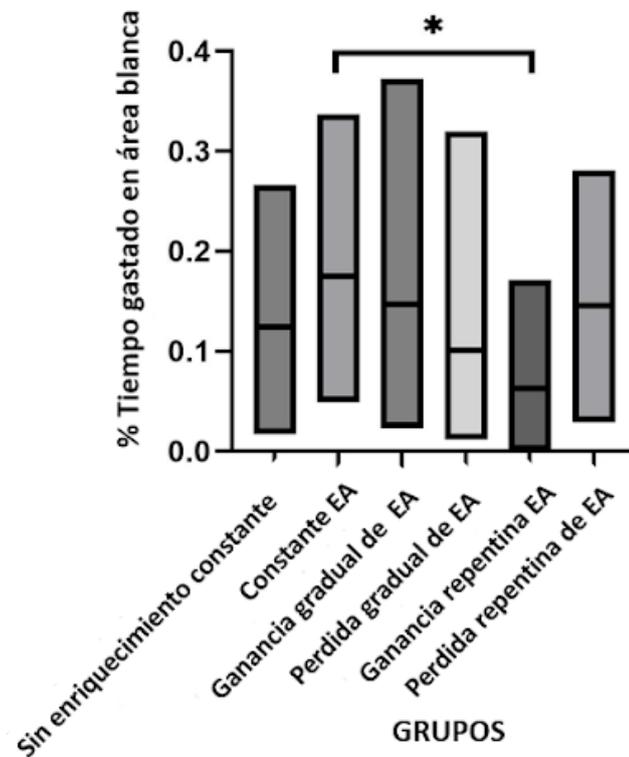


**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** La prueba de Kruskal-Wallis no evidenció diferencias significativas entre grupos para el tiempo gastado en el área ambigua (amarilla-rojiza). Las barras flotantes muestran las medianas y los rangos intercuartiles. n=64.

### Prueba de claro/oscuro grupo tímido-reactivo

Los datos sugieren que los peces expuestos a una ganancia súbita de enriquecimiento presentaron más comportamientos tipo ansiedad que aquellos que tuvieron un enriquecimiento ambiental constante. La prueba de Kruskal-Wallis reveló que las manipulaciones ambientales generaron una diferencia significativa en los comportamientos de ansiedad, medidos como porcentaje de tiempo de duración en el área blanca ( $H(5)=11.542$ ,  $p=0.042$ ). La comparación Dunn's pairwise mostró ( $p<0.032$ ) una diferencia significativa entre los peces que tuvieron una ganancia súbita y aquellos bajo enriquecimiento constante. La mediana para el porcentaje de tiempo en el área blanca para el grupo de ganancia súbita fue (0.0401) comparada con la de (0.1719) en enriquecimiento constante (Figura 14).

Figura 14 - Prueba de claro/oscuro fenotipo tímido-reactivo



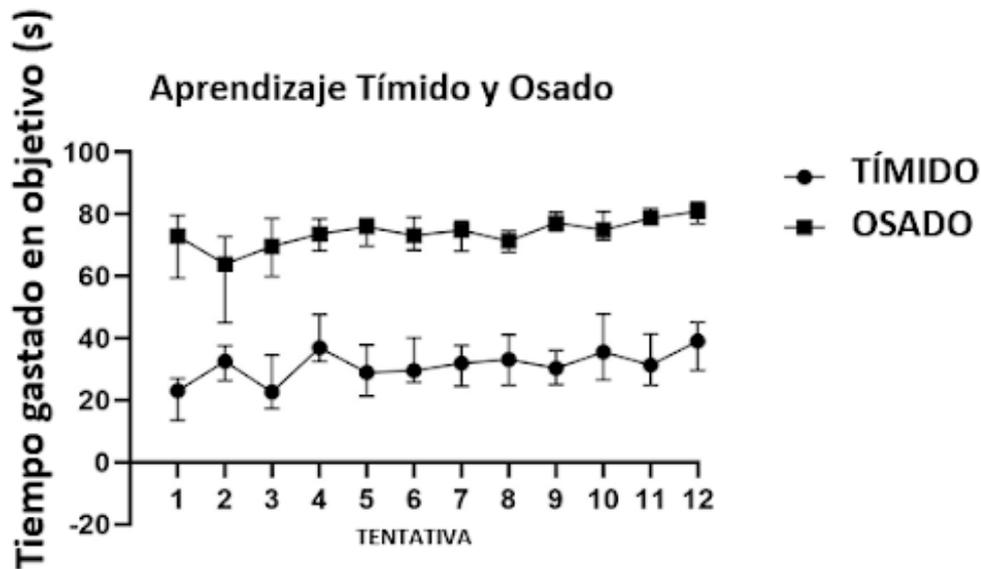
**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Los peces que recibieron una ganancia súbita de enriquecimiento ambiental presentaron más conductas relacionadas a la ansiedad que los peces bajo enriquecimiento ambiental constante. La prueba de Kruskal Wallis seguida por la prueba de Dunn-Bonferroni post hoc mostraron estas diferencias significativas. Las barras flotantes muestran las medianas y los rangos intercuartiles. El asterisco muestra las diferencias significativas entre tratamientos: \* $p < 0.05$ .  $n = 66$ .

### Comparación resultados grupos osado- proactivo versus tímido-reactivo.

#### Entrenamiento de discriminación visual

Los datos sugieren que el aprendizaje discriminativo para los peces clasificados como osados fue mayor que el de los peces categorizados como tímidos. Al realizar la comparación entre grupos para cada sesión de entrenamiento, la prueba de Mann-Whitney U encontró una diferencia significativa entre grupos para todas las sesiones (todas las  $p < 0.001$ ) encontrándose siempre una mediana y un rango más elevado para el grupo de los peces osados en comparación con el grupo de peces tímidos (Figura 15).

Figura 15 - Sesiones de aprendizaje en los dos fenotipos



**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Los datos muestran que la tasa de aprendizaje fue mucho mayor para el grupo osado-proactivo (línea con cuadrados) que para el grupo tímido-reactivo (línea con círculos). La prueba de Mann-Whitney U reveló diferencias de aprendizaje entre los grupos para todas las sesiones de aprendizaje ( $p < 0.001$ ).  $n = 140$ .

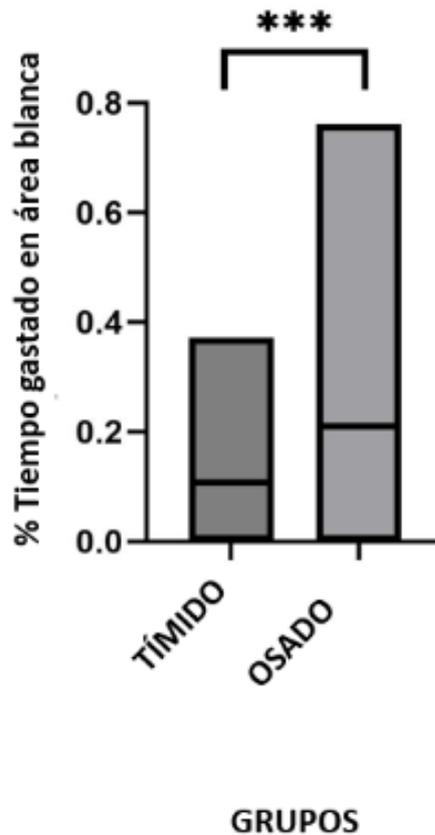
### Sesgo de Juicio Cognitivo

Ya que los peces del grupo tímido-reactivo no aprendieron la tarea de discriminación visual y siendo este aprendizaje un prerrequisito para realizar la prueba de sesgo cognitivo, decidimos no realizar la comparación entre los grupos osado-proactivo vs. tímido-reactivo para esta prueba.

### Prueba de claro/oscurο

Los datos sugieren que los comportamientos relacionados a la ansiedad para los peces clasificados como osados fueron menores que los de los peces categorizados como tímidos. Al realizar la comparación de los resultados obtenidos en la prueba de claro oscuro, la prueba de Kruskal-Wallis reveló que las manipulaciones ambientales generaron una diferencia significativa en los comportamientos de ansiedad, medidos como porcentaje de tiempo de duración en el área blanca ( $Z = -4.557$ ,  $p < 0.001$ , Cohen's  $d = 0.39$ ). La mediana para el porcentaje de tiempo en el área blanca para el grupo osado-proactivo fue (0.2105) comparada con la del tímido-reactivo (0.1078) (Figura 16).

Figura 16 - Prueba de claro/oscuro en los dos fenotipos



**Fuente:** Prism GraphPad by Dotmatics. Elaboración propia. **Leyenda:** Los peces que fueron clasificados en su mayoría como tímidos-reactivos presentaron más conductas relacionadas a la ansiedad que los peces catalogados como osados-proactivos. La prueba de Mann-Whitney U mostro una diferencia significativa entre grupos. Las barras flotantes muestran las medianas y los rangos intercuartiles. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre tratamientos: \*\*\* $p < 0.001$ .  $n = 134$ .

### Discusión.

Este estudio mostro que los rasgos de personalidad reflejados por las respuestas conductuales durante cuatro pruebas (Prueba de campo abierto, prueba de inspección de depredador, prueba de cardumen y prueba de espejo) se relacionaron con el rendimiento cognitivo de una tarea de discriminación de dos colores y con la respuesta de escototaxia (preferencia por un área oscura en detrimento de una clara) (MAXIMINO et al., 2010b) medida mediante la prueba de claro oscuro. De forma similar se evidencio que el enriquecimiento ambiental estructural también modificó la respuesta de escototaxia. Aunque uno de los objetivos era evaluar el efecto de la personalidad sobre el SJC este efecto no se pudo evidenciar. Tampoco se evidenciaron diferencias para peces mantenidos en condiciones

enriquecidas o estériles para la tarea de discriminación visual independientemente del tipo de personalidad.

Para los peces de este estudio que en su mayoría fueron caracterizados como tímidos-reactivos no encontramos diferencias de aprendizaje para aquellos peces mantenidos en condiciones estériles o de enriquecimiento. Resultados similares fueron encontrados en una réplica anterior para peces osados-proactivos (BUENHOMBRE et al., 2022). Este resultado fue inesperado ya que en esta y otras especies se evidencia que el enriquecimiento ambiental mejora el aprendizaje (VOLGIN et al., 2018b). No obstante, la mayoría de los estudios que han encontrado efectos positivos del enriquecimiento ambiental sobre el aprendizaje del pez cebra han utilizado un paradigma distinto (prueba de laberinto) y han usado un periodo de exposición mayor a 70 días (DEPASQUALE et al., 2016; SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011). Por el contrario, cuando se han utilizado manipulaciones ambientales durante cortos periodos de tiempo no se han evidenciado efectos sobre el aprendizaje (SHAMS et al., 2018). Por lo tanto, el corto tiempo (16 días) de exposición al enriquecimiento ambiental durante este estudio pudo no ser suficiente para generar efectos sobre el aprendizaje y un mayor tiempo de evaluación será requerido en futuros estudios.

Adicionalmente, para los peces tímidos-reactivos no encontramos diferencias entre las primeras y las últimas sesiones del entrenamiento de discriminación visual de dos colores (rojo vs. verde). Adicionalmente los peces no alcanzaron el criterio de aprendizaje después de 12 sesiones de entrenamiento (tiempo medio de permanencia en la zona roja  $> 70$  s). Este resultado fue inesperado ya que en la réplica anterior (BUENHOMBRE et al., 2022) con la cual comparamos los resultados del presente estudio, este número de sesiones bastó para cumplir el criterio de aprendizaje y evidenciar una diferencia significativa entre las primeras y las últimas sesiones de entrenamiento. Por otra parte, al comparar los resultados de este estudio para los peces que en su mayoría fueron catalogados como tímidos-reactivos con los resultados de los peces osados- proactivos, estos últimos tuvieron una mayor tasa de aprendizaje (medida como porcentaje de duración en el área objetivo).

De forma similar varios trabajos (BLOCH et al., 2019b; BURMAN et al., 2008; COLWILL et al., 2005; GATTO et al., 2020; PARKER et al., 2012b; SANTACÀ et al., 2021) demuestran que bajo esquemas similares de entrenamiento el pez cebra es capaz de realizar una discriminación visual de los colores entrenados en este experimento. No obstante, se ha observado que el tipo de personalidad puede afectar la velocidad de adquisición de una tarea de aprendizaje en esta especie (BAKER; WONG, 2019), otros teleósteos (BUDAEV; ZHUIKOV,

1998; MESQUITA; BORCATO; HUNTINGFORD, 2015) y aves (EXNEROVÁ et al., 2010) . Por ende, puede ser que la personalidad haya afectado el cómo los animales aprendieron y percibieron los estímulos (DE HAAS et al., 2017). De hecho, peces reactivos tienden a aprender más lentamente tareas exploratorias o de discriminación con condicionamiento apetitivo que sujetos proactivos (BAKER; WONG, 2019; LUCON-XICCATO; BISAZZA, 2017). Lo cual podría explicar la ausencia de aprendizaje para los peces tímidos-reactivos en este estudio.

Otra explicación de la ausencia de aprendizaje para los peces tímidos es que el color reforzado en este estudio fue el rojo, mientras que en la réplica anterior se utilizó el color verde (BUENHOMBRE et al., 2022). Dos estudios recientes (GATTO et al., 2020; SANTACÀ et al., 2021) que utilizaron una configuración similar para el entrenamiento de discriminación de colores encontraron que los peces poseían una mejor discriminación hacía el color verde que hacía el rojo. Igualmente, como se utilizaron diferentes baches de peces entre replicas, numerosos factores de desarrollo, ambientales y relacionados con las pruebas pudieron afectar los resultados experimentales (STEWART et al., 2015). Por ende, será importante para estudios posteriores tener en cuenta que el pez cebra no aprende todas las discriminaciones con la misma velocidad y precisión (por ejemplo, ellos pueden discriminar mejor el tamaño de los objetos que su forma o color) (SANTACÀ et al., 2021) y que este tipo de aprendizaje puede ser afectado por la personalidad.

En consecuencia, tampoco se encontraron diferencias de SJC para los peces tímidos-reactivos de acuerdo con la premisa de un aprendizaje discriminativo previo como prerrequisito para esta prueba (BETHELL, 2015; MENDEL; PAUL, 2020). No obstante, este resultado da cierta robustez a los resultados encontrados en una réplica anterior (BUENHOMBRE et al., 2022) donde peces caracterizados cómo osados-proactivos aprendieron la tarea de discriminación de colores y en consecuencia presentaron un sesgo cognitivo en respuesta a modificaciones ambientales, mientras que en este estudio no se observó ningún sesgo.

Desafortunadamente dado que los peces de este experimento no presentaron SCJ no pudimos observar hasta que punto la personalidad influenció el SCJ en pez cebra. Por lo cuál para estudios posteriores se recomendaría un entrenamiento más largo, el uso de los peces de un mismo bache y el uso de diferentes estímulos durante el entrenamiento de discriminación visual. De esta forma se podrían discernir los posibles efectos de la personalidad sobre el SJC en pez cebra, como ocurre en otras especies (ASHER et al., 2016; LECORPS; WEARY; VON KEYSERLINGK, 2018; ROSS et al., 2019).

Adicionalmente, la prueba de claro oscuro mostró que los peces que en su mayoría fueron catalogados como tímidos-reactivos y que recibieron una ganancia súbita de enriquecimiento ambiental estructural presentaron más comportamientos relacionados a la ansiedad (menor porcentaje de tiempo en el área blanca) que los peces alojados con enriquecimiento estructural constante. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en nuestra replica anterior donde la mayoría de los peces fueron catalogados como osados-proactivos (BUENHOMBRE et al., 2022). Resultados equivalentes también han sido reportados para el uso de enriquecimiento ambiental, donde el uso de este redujo los comportamientos relacionados a la ansiedad en el pez cebra cuando fueron medidos a través de la prueba de claro oscuro (MANUEL et al., 2015a; MAXIMINO et al., 2010b). De manera similar en otras especies se han evidenciado una reducción de comportamiento relacionados a la ansiedad como resultado del enriquecimiento independientemente del tipo de personalidad evaluado (LALOT et al., 2017b; ROSS et al., 2019).

Finalmente, para la prueba de claro oscuro encontramos que los peces osados-proactivos presentaban una menor cantidad de conductas de ansiedad que los peces tímidos-reactivos. Lo cual corrobora los resultados obtenidos mediante el análisis de la personalidad. De manera similar varios estudios han encontrado que los peces con personalidad catalogada como reactiva muestran mayor cantidad de comportamientos relacionados a la ansiedad cuando fueron testeados mediante la prueba del tanque novedoso (BAKER; WONG, 2019; TOMS; ECHEVARRIA, 2014; TUDORACHE; SCHAAF; SLABBEKOORN, 2013; WONG et al., 2012; WONG; FRENCH; RUSS, 2019). Hasta ahora no conocemos estudios adicionales que hayan evaluado esto mediante el test de claro oscuro, por ende, este sería el primer estudio que compara los resultados de esta prueba y la personalidad en pez cebra.

## **Conclusión**

En conclusión, pudimos observar que existen varias interacciones entre la personalidad y el aprendizaje de discriminación visual de dos colores. Específicamente, observamos que un grupo de peces donde la mayoría de los individuos se catalogaron como osados-proactivos obtuvieron una mayor tasa de aprendizaje que individuos catalogados en su mayoría como tímidos-reactivos. Adicionalmente no se evidenciaron diferencias para peces mantenidos en condiciones enriquecidas o estériles para la tarea de discriminación visual independientemente del tipo de personalidad. También mostramos que los comportamientos de ansiedad fueron afectados por una modificación ambiental y por la personalidad, encontrando comportamientos más ansiosos para un aumento súbito del enriquecimiento y para peces

tímidos reactivos, respectivamente. Desafortunadamente no pudimos evaluar los efectos sobre SJC en este estudio, debido a que los peces no alcanzaron el criterio mínimo de aprendizaje para poder realizar esta prueba. Por ende, se recomienda incrementar el tiempo y/o modificar el protocolo de entrenamiento y los estímulos a utilizar para que peces tímidos-reactivos aprendan esa tarea. Lo anterior permitirá evaluar posteriormente si existen efectos de la personalidad sobre el SJC, si el pez cebra solo responde a las manipulaciones ambientales o si existen posibles interacciones entre la personalidad y el enriquecimiento ambiental estructural.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen las contribuciones de PAEC OEA-GCUB, la Universidad Federal de Pará y los departamentos de PNBC y NTPC.

### **Declaración de Intereses**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### **Contribuciones de autor**

Conceptualización, J.B y A.G.J.; Validación, J.B y A.G.J.; Curación de datos, J.B; Análisis Formal, J.B y ED.; Investigación, J.B y A.G.J.; Redacción - borrador original, J.B y ED.; Visualización, J.B y ED.; Supervisión, A.G.J; Redacción - revisión y edición, J.B., ED y A.G.J.

### **Fondos.**

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiación en los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

### **Disponibilidad de datos**

Todos los datos están completamente disponibles sin restricciones; la mayoría se puede encontrar en el archivo de datos complementarios.

### **REFERENCIAS**

ABBEY-LEE, R. N. N. et al. The Influence of Rearing on Behavior, Brain Monoamines, and Gene Expression in Three-Spined Sticklebacks. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 91, n. 4, p. 201–213, 1 ago. 2018.

ABOZAID, H.; WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Elevated Temperature Applied during Gonadal Transformation Leads to Male Bias in Zebrafish (*Danio rerio*). **Sexual Development**, v. 6, n. 4, p. 201–209, jun. 2012.

- ABREU, M. S. et al. Modulation of Cortisol Responses to an Acute Stressor in Zebrafish Visually Exposed to Heterospecific Fish During Development. **Zebrafish**, v. 15, n. 3, p. 228–233, jun. 2018.
- ALESTRÖM, P. et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 3, p. 213, 1 jun. 2020.
- AMPATZIS, K.; DERMON, C. R. Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 385–393, 1 out. 2016.
- ANDERSON, M. G. et al. Environmental complexity positively impacts affective states of broiler chickens. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 20 ago. 2021.
- ANDRÉ, V. et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. **PLoS Biology**, v. 16, n. 4, 16 abr. 2018.
- ANGIULLI, E. et al. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*. **Scientific Reports**, 2020.
- APONTE, A.; PETRUNICH-RUTHERFORD, M. L. Acute net stress of young adult zebrafish (*Danio rerio*) is not sufficient to increase anxiety-like behavior and whole-body cortisol. **PeerJ**, 2019.
- ARIYOMO, T. O.; WATT, P. J. Effect of hunger level and time of day on boldness and aggression in the zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 86, n. 6, p. 1852–1859, 1 jun. 2015.
- ARNOLD, K. E. et al. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. **Biology Letters**, v. 9, n. 4, 23 ago. 2013.
- ASHER, L. et al. Mood and personality interact to determine cognitive biases in pigs. **Biology letters**, v. 12, n. 11, p. 20160402, 16 nov. 2016.
- ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189–196, 1 jul. 2016.
- AUDIRA, G. et al. Which zebrafish strains are more suitable to perform behavioral studies? A comprehensive comparison by phenomic approach. **Biology**, 2020.
- AVDESH, A. et al. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2012.
- BACIADONNA, L.; MCELLIGOTT, A. G. The use of judgement bias to assess welfare in farm livestock. **Animal Welfare**, 2015.
- BAKER, M. R. et al. Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12114, 14 ago. 2018.
- BAKER, M. R.; WONG, R. Y. Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9935, 9 dez. 2019.

- BALDOCK, N. M.; SIBLY, R. M. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. **Applied animal behaviour science**, v. 28, n. 1–2, p. 15–39, 1990.
- BARCELLOS, H. H. A. et al. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. **PeerJ**, v. 6, p. e5162, 23 jul. 2018.
- BARNARD, S. et al. Personality traits affecting judgement bias task performance in dogs (*Canis familiaris*). **Scientific Reports**, 2018.
- BASQUILL, S. P.; GRANT, J. W. A. An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebra fish (*Danio rerio*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, n. 4, p. 770–772, 1998.
- BATESON, M.; NETTLE, D. Development of a cognitive bias methodology for measuring low mood in chimpanzees. **PeerJ**, 2015.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. **Parsing reward. Trends in Neurosciences**, 2003.
- BETHELL, E. J. A “How-To” Guide for Designing Judgment Bias Studies to Assess Captive Animal Welfare. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 2015.
- BETHELL, E. J.; KOYAMA, N. F. Happy hamsters? Enrichment induces positive judgement bias for mildly (but not truly) ambiguous cues to reward and punishment in *Mesocricetus auratus*. **Royal Society Open Science**, 2015.
- BHAT, A.; GREULICH, M. M.; MARTINS, E. P. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (*Danio rerio*) populations. **PLoS ONE**, 2015.
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36931, 17 maio 2012.
- BLOCH, S. et al. Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2019a.
- BLOCH, S. et al. Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 370, p. 111924, 16 set. 2019b.
- BOISSY, A. How to access animal sentience? The close relationship between emotions and cognition. **Animal Welfare: from Science to Law**, n. 978-2-9512167-4-7, 2019.
- BOISSY, A.; ERHARD, H. W. How Studying Interactions Between Animal Emotions, Cognition, and Personality Can Contribute to Improve Farm Animal Welfare. Em: **Genetics and the Behavior of Domestic Animals**. [s.l: s.n.].
- BOISSY, A.; LEE, C. How assessing relationships between emotions and cognition can improve farm animal welfare. **OIE Revue Scientifique et Technique**, 2014.
- BOWER, G. H. Mood and memory. **American Psychologist**, 1981.
- BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J.; SEQUEIRA-CORDERO, A. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, 2020.

BRITO, T. M. DE. **Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no *Carassius auratus* (peixe dourado)**. Universidade de São Paulo, , 2011.

BROWN, A. R. et al. Are Toxicological Responses in Laboratory (Inbred) Zebrafish Representative of Those in Outbred (Wild) Populations? – A Case Study with an Endocrine Disrupting Chemical. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 9, p. 4166–4172, 1 maio 2011.

BROWN, A. R. et al. Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. E1237–E1246, 17 mar. 2015.

BRUCKNER, J. J. et al. The microbiota promotes social behavior by neuro-immune modulation of neurite complexity. **bioRxiv**, p. 2020.05.01.071373, 3 maio 2020.

BRYDGES, N. M. et al. Environmental enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. **Animal Behaviour**, 2011.

BUČKOVÁ, K.; ŠPINKA, M.; HINTZE, S. Pair housing makes calves more optimistic. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 27 dez. 2019.

BUDAEV, S. V. “Personality” in the Guppy (*Poecilia reticulata*): A Correlational Study of Exploratory Behavior and Social Tendency. **Journal of Comparative Psychology**, v. 111, n. 4, p. 399–411, 1997.

BUDAEV, S. V.; ZHUIKOV, A. Y. Avoidance learning and “personality” in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 112, n. 1, p. 92–94, 1998.

BUENHOMBRE, J. et al. 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**, v. 131, p. 765–791, 1 dez. 2021.

BUENHOMBRE, J. et al. Structural environmental enrichment and the way it is offered influence cognitive judgement bias and anxiety-like behaviours in zebrafish. **Animal Cognition**, 2022.

BURGDORF, J. et al. Current Neuropharmacology Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Positive Emotional Learning Induces Resilience to Depression: A Role for NMDA Receptor-mediated Synaptic Plasticity. **Current Neuropharmacology**, 2017.

BURMAN, O. et al. Using judgement bias to measure positive affective state in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, 2011.

BURMAN, O. H. P. et al. A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, 2008.

BURMAN, O. H. P.; MENDEL, M. T. A novel task to assess mood congruent memory bias in non-human animals. **Journal of neuroscience methods**, v. 308, p. 269–275, 1 out. 2018.

CARRERAS UBACH, R. The cognitive bias test as a measure of emotional state in pigs. 2016.

CASTRANOVA, D. et al. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 8, n. 3, p. 141–146, set. 2011.

CERQUEIRA, M. et al. Cognitive appraisal of environmental stimuli induces emotion-like states in fish. **Scientific Reports**, 2017.

CERQUEIRA, M. et al. Cognitive appraisal in fish: Stressor predictability modulates the physiological and neurobehavioural stress response in sea bass. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2020.

CHAKRAVARTY, S. et al. Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 14 maio 2013.

CLEGG, I. L. K. **Cognitive bias in zoo animals: An optimistic outlook for welfare assessment.** **Animals**, 2018.

COLDITZ, I. G.; HINE, B. C. **Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare.** **Animal Production Science**, 2016.

COLLIER, A. D.; KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J. Zebrafish models of anxiety-like behaviors. Em: **The Rights and Wrongs of Zebrafish: Behavioral Phenotyping of Zebrafish.** [s.l: s.n.].

COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 3, p. 280–5, maio 2015a.

COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 3, p. 280, 1 maio 2015b.

COLOM, G. et al. of Positive Humour As a Variable That Reduces Stress. Relationship of Humour With Personality and Performance Variables. **Animal Biology**, 2013.

COLWILL, R. M. et al. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, v. 70, n. 1, p. 19–31, 31 ago. 2005.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1670–1672, 1999.

CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. **Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2015.

CRUMP, A.; ARNOTT, G.; BETHELL, E. J. **Affect-driven attention biases as animal welfare indicators: Review and methods.** **Animals**, 2018.

CZÉH, B.; WIBORG, O.; FUCHS, E. Experimental Animal Models for Depressive Disorders. **Understanding Depression: Volume 1. Biomedical and Neurobiological Background**, p. 221, 2018.

DAHLBOM, S. J. et al. Boldness Predicts Social Status in Zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23565, 17 ago. 2011.

DAHLBOM, S. J. et al. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 333–338, 17 mar. 2012.

DAHLBOM, S. J. **Bully or Bullied?: The Zebrafish as a Model for Social Stress and Depression**. [s.l: s.n.].

DALGLEISH, T.; WERNER-SEIDLER, A. **Disruptions in autobiographical memory processing in depression and the emergence of memory therapeutics**. **Trends in Cognitive Sciences**, 2014.

DE HAAS, E. N. et al. Individual differences in personality in laying hens are related to learning a colour cue association. **Behavioural Processes**, v. 134, p. 37–42, jan. 2017.

DEMIN, K. A. et al. **The role of intraspecies variation in fish neurobehavioral and neuropharmacological phenotypes in aquatic models**. **Aquatic Toxicology**, 2019.

DEMIN, K. A. et al. **Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish**. **Stress**, 2020a.

DEMIN, K. A. et al. **Cross-species Analyses of Intra-species Behavioral Differences in Mammals and Fish**. **Neuroscience**, 2020b.

DEPASQUALE, C. et al. The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behaviour. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1823, p. 20152564, 27 jan. 2016.

DEPASQUALE, C. et al. The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, 2019.

DEPASQUALE, C.; LERI, J. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, 2018.

DEPASQUALE, C.; STURGILL, J.; BRAITHWAITE, V. A. A standardized protocol for preference testing to assess fish welfare. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 156, 1 fev. 2020.

DÉSIRÉ, L. et al. On the way to assess emotions in animals: do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? **Journal of Comparative Psychology**, v. 118, n. 4, p. 363, 2004.

DOUGLAS, C. et al. Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, 2012.

DUNCAN, I. J. **Measuring preferences and the strength of preferences**. **Poultry science**, 1992.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2009.

- ENKEL, T. et al. Ambiguous-Cue Interpretation is Biased Under Stress- and Depression-Like States in Rats. **Neuropsychopharmacology** 2010 **35:4**, v. 35, n. 4, p. 1008–1015, 30 dez. 2009.
- EXNEROVÁ, A. et al. Personality matters: individual variation in reactions of naive bird predators to aposematic prey. **Proceedings. Biological sciences**, v. 277, n. 1682, p. 723–728, 7 mar. 2010.
- EYSENCK, M. W. et al. Bias in Interpretation of Ambiguous Sentences Related to Threat in Anxiety. **Journal of Abnormal Psychology**, 1991.
- FARES, R. P. et al. Standardized Environmental Enrichment Supports Enhanced Brain Plasticity in Healthy Rats and Prevents Cognitive Impairment in Epileptic Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 14 jan. 2013.
- FAUSTINO, A. I.; OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, R. F. Linking appraisal to behavioral flexibility in animals: Implications for stress research. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2015.
- FIFE-COOK, I.; FRANKS, B. Positive Welfare for Fishes: Rationale and Areas for Future Study. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 31, 23 maio 2019.
- FILBY, A. L. et al. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 5, p. 576–587, 2 dez. 2010.
- FILE, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 3–12, 1996.
- FONTANA, B. D. et al. Moderate early life stress improves adult zebrafish (*Danio rerio*) working memory but does not affect social and anxiety-like responses. **Developmental Psychobiology**, 2020.
- FORKMAN, B. et al. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiology and Behavior**, 2007.
- FRANKS, B. What do animals want? **Animal Welfare**, 2019.
- FRANKS, B.; GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. Is Heightened-Shoaling a Good Candidate for Positive Emotional Behavior in Zebrafish? **Animals**, v. 8, n. 9, p. 152, 24 ago. 2018.
- FULCHER, N. et al. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. **Zebrafish**, v. 14, n. 1, p. 23–34, fev. 2017.
- GAIKWAD, S. et al. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. **Behavioural Processes**, 2011.
- GALHARDO, L.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, R. F. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 130, n. 1–2, p. 60–70, fev. 2011.

- GALHARDO, L.; VITAL, J.; OLIVEIRA, R. F. The role of predictability in the stress response of a cichlid fish. **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 3–4, p. 367–372, 1 mar. 2011.
- GATTO, E. et al. The devil is in the detail: Zebrafish learn to discriminate visual stimuli only if salient. **Behavioural Processes**, v. 179, 1 out. 2020.
- GENARIO, R. et al. **The evolutionarily conserved role of melatonin in CNS disorders and behavioral regulation: Translational lessons from zebrafish.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2019.
- GERLAI, R. Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 178, p. 30–38, 1 mar. 2019.
- GERLAI, R. **Evolutionary conservation, translational relevance and cognitive function: The future of zebrafish in behavioral neuroscience.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.
- GIACOMINI, A. C. V. V. et al. My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. **Physiology and Behavior**, v. 139, p. 182–187, fev. 2015.
- GIACOMINI, A. C. V. V. V. et al. Environmental and pharmacological manipulations blunt the stress response of zebrafish in a similar manner. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28986, 28 set. 2016.
- GORISSEN, M. et al. Differences in inhibitory avoidance, cortisol and brain gene expression in TL and AB zebrafish. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 5, p. 428–438, jun. 2015.
- GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. Free-choice exploration increases affiliative behaviour in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, 2018a.
- GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. **Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour.** **Applied Animal Behaviour Science**, 2018b.
- GREEN, T. C.; MELLOR, D. J. Extending ideas about animal welfare assessment to include ‘quality of life’ and related concepts. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2011.610283>, v. 59, n. 6, p. 263–271, nov. 2011.
- GREENAWAY, K. H.; KALOKERINOS, E. K.; WILLIAMS, L. A. Context is Everything (in Emotion Research). **Social and Personality Psychology Compass**, 2018.
- GREIVELDINGER, L.; VEISSIER, I.; BOISSY, A. The ability of lambs to form expectations and the emotional consequences of a discrepancy from their expectations. **Psychoneuroendocrinology**, 2011.
- GRONQUIST, D.; BERGES, J. A. Effects of Aquarium-Related Stressors on the Zebrafish: A Comparison of Behavioral, Physiological, and Biochemical Indicators. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 25, n. 1, p. 53–65, mar. 2013.
- GYGAX, L. The A to Z of statistics for testing cognitive judgement bias. **Animal Behaviour**, v. 95, p. 59–69, 2014.
- HARDING, E. J.; PAUL, E. S.; MENDEL, M. Cognitive bias and affective state. **Nature**, 2004.

- HEDLUND, L.; LØVLIE, H. Personality and production: Nervous cows produce less milk. **Journal of Dairy Science**, 2015.
- HEIJTZ, R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 15 fev. 2011.
- HENDRIE, C. A.; WEISS, S. M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 13–20, 1996.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.
- HOLLEY, E. D. et al. Predictability of food supply, but not ration, increases exploratory behaviour in zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, 2014.
- IYASERE, O. S. et al. Elevated levels of the stress hormone, corticosterone, cause “pessimistic” judgment bias in broiler chickens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- JOHANSSON, J. I.; CARLSSON, M.; SUNDSTROM, L. F. Habitat preference increases territorial defence in brown trout (*Salmo trutta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 48, n. 5, p. 373–377, 2000.
- JONES, N. A. R. et al. Shade as enrichment: testing preferences for shelter in two model fish species. **Journal of fish biology**, v. 95, n. 4, p. 1161–1165, 1 out. 2019.
- JONES, N. A. R.; WEBSTER, M. M.; SALVANES, A. G. V. Physical enrichment research for captive fish: Time to focus on the DETAILS. **Journal of Fish Biology**, 2021.
- KALUEFF, A. V. et al. **Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond**. **Zebrafish**, 2013.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. **Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders**. **Trends in Pharmacological Sciences** Elsevier Current Trends, , 1 fev. 2014.
- KAREKLAS, K.; ELWOOD, R. W.; HOLLAND, R. A. Grouping promotes risk-taking in unfamiliar settings. **Behavioural Processes**, 2018.
- KECK, V. A. et al. Effects of Habitat Complexity on Pair-Housed Zebrafish. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 4, p. 378–83, jul. 2015.
- KEEHN, J. D. **Animal models for psychiatry**. [s.l: s.n.].
- KEEN, H. A. et al. Validation of a novel cognitive bias task based on difference in quantity of reinforcement for assessing environmental enrichment. **Animal cognition**, v. 17, n. 3, p. 529–541, 2014.
- KENNEY, J. W. et al. Contextual fear conditioning in zebrafish. **Learning and Memory**, 2017.
- KERN, E. M. A. et al. Correlated evolution of personality, morphology and performance. **Animal Behaviour**, v. 117, p. 79–86, jul. 2016.

KIRSTEN, K. et al. First description of behavior and immune system relationship in fish. **Scientific Reports**, 2018.

KIRSTEN, K. et al. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 107–112, 2021.

KISTLER, C. et al. Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 4, p. 318–327, dez. 2011.

KOOLHAAS, J. M.; REENEN, C. G. VAN. Interaction between coping style / personality , stress , and welfare : Relevance for domestic farm animals 1. **Journal of Animal Science**, 2016.

KORTZFLEISCH, V. T. VON et al. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments’. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 6 out. 2020.

KOŠŤÁL, L.; SKALNÁ, Z.; PICOVÁ, K. Use of cognitive bias as a welfare tool in poultry. **Journal of Animal Science**, 2020.

KREMER, L. et al. Housing and personality effects on judgement and attention biases in dairy cows. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 26 nov. 2021.

KRZYSZTOF, W.; PRZEMYSŁAW, P. C.; ROMAN, K. Cognitive bias test as a tool for accessing fish welfare. **Frontiers in Marine Science**, 2015.

KYSIL, E. V. et al. **Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. Zebrafish**, 2017.

LAGISZ, M. et al. Optimism, pessimism and judgement bias in animals: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 118, p. 3–17, 1 nov. 2020.

LALOT, M. et al. You know what? I’m happy. Cognitive bias is not related to personality but is induced by pair-housing in canaries (*Serinus canaria*). **Behavioural Processes**, v. 134, p. 70–77, jan. 2017a.

LALOT, M. et al. You know what? I’m happy. Cognitive bias is not related to personality but is induced by pair-housing in canaries (*Serinus canaria*). **Behavioural Processes**, v. 134, p. 70–77, 1 jan. 2017b.

LAMBERT, H.; CARDER, G. Positive and negative emotions in dairy cows: Can ear postures be used as a measure? **Behavioural Processes**, 2019.

LAMPE, J. F. et al. Context-dependent individual differences in playfulness in male rats. **Developmental Psychobiology**, v. 59, n. 4, p. 460–472, maio 2017.

LAUBU, C.; LOUÂPRE, P.; DECHAUME-MONCHARMONT, F. X. Pair-bonding influences affective state in a monogamous fish species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1904, 12 jun. 2019.

LAWRENCE, C.; EBERSOLE, J. P.; KESSELI, R. V. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Biology of Fishes 2007 81:2**, v. 81, n. 2, p. 239–246, 24 jan. 2007.

- LAWRENCE, C.; EISEN, J. S.; VARGA, Z. M. Husbandry and Health Program Survey Synopsis. <https://home.liebertpub.com/zeb>, v. 13, p. S5–S7, 28 jun. 2016.
- LECORPS, B.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. G. Pessimism and fearfulness in dairy calves. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1421, 23 dez. 2018.
- LEE, C. J.; PAULL, G. C.; TYLER, C. R. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 94, n. 1, p. jfb.13865, 10 dez. 2018.
- LIDSTER, K. et al. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. **Journal of Fish Biology**, v. 90, n. 5, p. 1891–1905, 1 maio 2017.
- LIEGGI, C. et al. The Influence of Behavioral, Social, and Environmental Factors on Reproducibility and Replicability in Aquatic Animal Models. **ILAR Journal**, v. 60, n. 2, p. 270, 2019.
- LIEW, W. C. et al. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34397, 10 abr. 2012.
- LINDSEY, B. W.; TROPEPE, V. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. **Developmental Neurobiology**, v. 74, n. 11, p. 1053–1077, 1 nov. 2014.
- LIU, H. et al. Biological and Psychological Perspectives of Resilience: Is It Possible to Improve Stress Resistance? **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 0, p. 326, 21 ago. 2018.
- LUCON-XICCATO, T.; BISAZZA, A. Individual differences in cognition among teleost fishes. **Behavioural Processes**, v. 141, p. 184–195, 1 ago. 2017.
- LUZIO, A. et al. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 22–35, 1 maio 2016.
- MACLEOD, A. K.; BYRNE, A. Anxiety, depression, and the anticipation of future positive and negative experiences. **Journal of Abnormal Psychology**, 1996.
- MAGALHÃES, R. et al. Biomarkers of resilience and susceptibility in rodent models of stress. Em: **Stress Resilience: Molecular and Behavioral Aspects**. [s.l: s.n.].
- MAKOWSKA, I. J.; WEARY, D. M. **Assessing the emotions of laboratory rats**. **Applied Animal Behaviour Science**, 2013.
- MANUEL, R. et al. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: Stronger effects in the resting phase than in the active phase. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 21, p. 3919–3928, 1 nov. 2014.
- MANUEL, R. et al. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio hamilton*). **Zebrafish**, 2015a.
- MANUEL, R. et al. The Effects of Environmental Enrichment and Age-Related Differences on Inhibitory Avoidance in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 152–165, abr. 2015b.

- MANUEL, R. et al. Providing a food reward reduces inhibitory avoidance learning in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 120, p. 69–72, nov. 2015c.
- MARCHANT, J. N. et al. The effect of agonistic interactions on the heart rate of group-housed sows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 46, n. 1–2, p. 49–56, 1995.
- MARCHANT-FORDE, J. N. The science of animal behavior and welfare: Challenges, opportunities, and global perspective. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, p. 16, 2015.
- MARCON, M. et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb176735, 15 fev. 2018a.
- MARCON, M. et al. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. **PeerJ**, v. 6, p. e5136, 5 jul. 2018b.
- MATHESON, S. M.; ASHER, L.; BATESON, M. Larger, enriched cages are associated with “optimistic” response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). **Applied Animal Behaviour Science**, 2008.
- MATHEWS, A. Autobiographical memory and clinical anxiety. **Cognition and Emotion**, 1992.
- MATHEWS, A. Cognitive Approaches to Emotion and Emotional Disorders. **Annual Review of Psychology**, 1994.
- MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.
- MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, 2010b.
- MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, n. 10–12, p. 1099–1123, 1 jan. 2012.
- MAXIMINO, C. et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain and Behavior**, 2013.
- MELLOR, D. J. Positive animal welfare states and reference standards for welfare assessment. **New Zealand Veterinary Journal**, 2015.
- MENDL, M. et al. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. **Applied Animal Behaviour Science**, 2009.
- MENDL, M.; BURMAN, O. H. P.; PAUL, E. S. An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1696, p. 2895–2904, 2010.
- MENDL, M.; PAUL, E. S. Animal affect and decision-making. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 112, p. 144–163, 1 maio 2020.
- MESQUITA, F. O.; BORCATO, F. L.; HUNTINGFORD, F. A. Cue-based and algorithmic learning in common carp: A possible link to stress coping style. **Behavioural processes**, v. 115, p. 25–29, 1 jun. 2015.

- MEYER, B. M. et al. Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 2013.
- MILLER, T. H. et al. Social status–dependent shift in neural circuit activation affects decision making. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 2137–2148, 22 fev. 2017.
- MILLOT, S. et al. Behavioural Stress Responses Predict Environmental Perception in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108800, 29 set. 2014.
- MINEKA, S.; OEHLBERG, K. The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. **Acta Psychologica**, 2008.
- MOGG, K. et al. Effects of threat cues on attentional shifting, disengagement and response slowing in anxious individuals. **Behaviour Research and Therapy**, 2008.
- MOHER, D. et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, jul. 2009.
- MUSTAFA, A.; ROMAN, E.; WINBERG, S. Boldness in Male and Female Zebrafish (*Danio rerio*) Is Dependent on Strain and Test. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2019.
- NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates Näslund, J., & Johnsson, J. I. (2016). Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish a. Fish and Fisheries*, v. 17, n. 1, p. 1–30, mar. 2016a.
- NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 1, p. 1–30, mar. 2016b.
- NEVILLE, V. et al. **Pharmacological manipulations of judgement bias: A systematic review and meta-analysis. Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.
- NGUYEN, H. A. T.; GUO, C.; HOMBERG, J. R. **Cognitive Bias Under Adverse and Rewarding Conditions: A Systematic Review of Rodent Studies. Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2020.
- NOVAK, J. et al. An exploration based cognitive bias test for mice: Effects of handling method and stereotypic behaviour. **PLoS ONE**, 2015.
- NOWORYTA, K. et al. Neuromolecular Underpinnings of Negative Cognitive Bias in Depression. **Cells 2021, Vol. 10, Page 3157**, v. 10, n. 11, p. 3157, 13 nov. 2021.
- NYGREN, T. E. et al. The influence of positive affect on the decision rule in risk situations: Focus on outcome (and especially avoidance of loss) rather than probability. **Organizational Behavior and Human Decision Processes**, 1996.
- OHL, F.; PUTMAN, R. J. Animal Welfare Considerations: Should Context Matter? **undefined**, 2014.

- OSWALD, M. E. et al. Is Behavioral Variation along the Bold-Shy Continuum Associated with Variation in the Stress Axis in Zebrafish? **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, n. 6, p. 718–728, nov. 2012.
- PAGNUSSAT, N. et al. One for all and all for one: The importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. **Zebrafish**, 2013.
- PARKER, M. O. et al. Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34992, 11 abr. 2012a.
- PARKER, M. O. et al. Discrimination reversal and attentional sets in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 264–268, 15 jun. 2012b.
- PAUL, E. S. et al. **Towards a comparative science of emotion: Affect and consciousness in humans and animals**. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.
- PAUL, E. S.; HARDING, E. J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 3, p. 469–491, 2005.
- PAUL, E. S.; MENDEL, M. T. Animal emotion: Descriptive and prescriptive definitions and their implications for a comparative perspective. **Applied animal behaviour science**, v. 205, p. 202–209, 1 ago. 2018.
- PAVLIDIS, M. et al. Husbandry of Zebrafish, *Danio Rerio*, and the Cortisol Stress Response. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 524–531, dez. 2013.
- PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 60, p. 121–131, jul. 2015.
- PIATO, A. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, 2011a.
- PIATO, A. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2011b.
- PROCTOR, H.; CARDER, G. Can changes in nasal temperature be used as an indicator of emotional state in cows? **Applied Animal Behaviour Science**, 2016.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Can ear postures reliably measure the positive emotional state of cows? **Applied Animal Behaviour Science**, 2014.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Measuring positive emotions in cows: Do visible eye whites tell us anything? **Physiology and Behavior**, 2015a.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Nasal temperatures in dairy cows are influenced by positive emotional state. **Physiology and Behavior**, 2015b.
- RABBANE, M. G. et al. Effects of stocking density on growth of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). **Bangladesh Journal of Zoology**, 2017.

- RAMBO, C. L. et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH**, v. 171, p. 50–54, 15 mar. 2017.
- RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57, 1997.
- RAMSAY, J. M. et al. Husbandry stress exacerbates mycobacterial infections in adult zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 931–941, nov. 2009.
- RAOULT, C. M. C.; MOSER, J.; GYGAX, L. Mood as cumulative expectation mismatch: A test of theory based on data from non-verbal cognitive bias tests. **Frontiers in Psychology**, 2017.
- RAOULT, V. et al. Stress profile influences learning approach in a marine fish. **PeerJ**, v. 5, p. e3445, 8 jun. 2017.
- REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 85–92, jan. 2018.
- RIBAS, L. et al. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. E941–E950, 7 fev. 2017a.
- RIBAS, L. et al. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 6, p. 1056–1064, 15 mar. 2017b.
- RICE, A. S. C. et al. Sensory profiling in animal models of neuropathic pain: a call for back-translation. **Pain**, v. 159, n. 5, p. 819–824, 2018.
- RICHTER, S. H. et al. A glass full of optimism: Enrichment effects on cognitive bias in a rat model of depression. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, 2012.
- ROBERTSON, C. E. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1786, 21 maio 2014.
- ROBINSON, O. J. et al. The effect of induced anxiety on cognition: Threat of shock enhances aversive processing in healthy individuals. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 217–227, 12 jun. 2011.
- ROCHE, D. G.; CAREAU, V.; BINNING, S. A. **Demystifying animal “personality” (or not): Why individual variation matters to experimental biologists**. **Journal of Experimental Biology** Company of Biologists Ltd, , 15 dez. 2016.
- ROELOFS, S. et al. **Making decisions under ambiguity: Judgment bias tasks for assessing emotional state in animals**. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2016.
- ROMÁN, A.-C. et al. Histone H4 acetylation regulates behavioral inter-individual variability in zebrafish. **Genome Biology** 2018 **19:1**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 25 abr. 2018.

- ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, 2011.
- ROSS, M. et al. Welfare-improving enrichments greatly reduce hens' startle responses, despite little change in judgment bias. **Scientific Reports**, 2019.
- ROY, T.; BHAT, A. Learning and Memory in Juvenile Zebrafish: What makes the Difference - Population or Rearing Environment? **Ethology**, v. 122, n. 4, p. 308–318, 1 abr. 2016.
- ROY, T.; BHAT, A. Population, sex and body size: Determinants of behavioural variations and behavioural correlations among wild zebrafish *Danio rerio*. **Royal Society Open Science**, 2018a.
- ROY, T.; BHAT, A. Repeatability in boldness and aggression among wild zebrafish (*Danio rerio*) from two differing predation and flow regimes. **Journal of Comparative Psychology**, 2018b.
- ROY, T.; SHUKLA, R.; BHAT, A. Risk-Taking During Feeding: Between- and Within-Population Variation and Repeatability Across Contexts Among Wild Zebrafish. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 393–403, out. 2017.
- RUSHEN, J. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, 1991.
- RUSSELL, J. A. Core affect and the psychological construction of emotion. **Psychological review**, v. 110, n. 1, p. 145, 2003.
- SANCHES, E. **Avaliação das Dimensões de Personalidade em *Danio rerio***. Master Thesis—[s.l.] Universidade Federal do Pará, 2018.
- SANTACÀ, M. et al. Stimulus characteristics, learning bias and visual discrimination in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, v. 192, 2021.
- SANTARELLI, S. et al. Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. **European Neuropsychopharmacology**, 2014.
- SANTOS, D.; LUZIO, A.; COIMBRA, A. M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 141–163, 1 out. 2017.
- SCHROEDER, P. et al. What do zebrafish want? Impact of social grouping dominance and gender on preference for enrichment. **Laboratory Animals**, v. 48, n. 4, p. 328–337, 17 out. 2014.
- SCHWARZ, N. **Emotion, cognition, and decision making**. **Cognition and Emotion**, 2000.
- SERT, N. P. DU et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000410, 1 jul. 2020.
- SHAMS, S. et al. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, 2017.

- SHAMS, S. et al. Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. **Developmental Psychobiology**, v. 60, n. 1, p. 43–56, jan. 2018.
- SHAMS, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 283–287, out. 2015.
- SIMPSON, J.; KELLY, J. P. **The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects.** **Behavioural Brain Research**, 2011.
- SINGHAL, G. et al. **Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment.** **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2014.
- SMAIL, M. A. et al. **Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits.** **Pharmacology Biochemistry and Behavior** Elsevier Inc., , 1 out. 2020. . Acesso em: 7 abr. 2021
- SMITH, A. J. et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. **Laboratory Animals**, v. 52, n. 2, p. 135–141, 1 abr. 2018.
- SOARES, S. M. et al. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according to controlled housing conditions. **Physiology & Behavior**, v. 222, p. 112944, 1 ago. 2020.
- SONG, C. et al. Building neurophenomics in zebrafish: Effects of prior testing stress and test batteries. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 24–30, set. 2016.
- SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384–394, 2 fev. 2018.
- SPENCE, R.; MAGURRAN, A. E.; SMITH, C. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. **Animal Cognition**, v. 14, n. 4, p. 607–612, 1 jul. 2011.
- STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231, 2002.
- STEPHENSON, E.; HASKELL, M. J. The Use of a “Go/Go” Cognitive Bias Task and Response to a Novel Object to Assess the Effect of Housing Enrichment in Sheep (*Ovis aries*). **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 25, n. 1, p. 62–74, 2022.
- STEVENS, C. H.; REED, B. T.; HAWKINS, P. Enrichment for Laboratory Zebrafish—A Review of the Evidence and the Challenges. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 698, 5 mar. 2021.
- STEWART, A. et al. **Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review.** **Neuropharmacology. Anais...**2012.
- STEWART, A. M. et al. Constructing the habitume for phenotype-driven zebrafish research. **Behavioural Brain Research**, 2013.
- STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 1 maio 2014.

- STEWART, A. M. et al. Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity. **Zebrafish**, v. 12, n. 5, p. 339–348, out. 2015.
- SULLIVAN, M.; LAWRENCE, C.; BLACHE, D. Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment Sullivan, M., Lawrence, C., & Blache, D. (2016). Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment for captive fish. *Applied Animal Behaviour Science*., **Applied Animal Behaviour Science**, v. 174, p. 181–188, jan. 2016.
- SURIYAMPOLA, P. S. et al. Water flow impacts group behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioral Ecology**, v. 28, n. 1, p. arw138, 2016a.
- SURIYAMPOLA, P. S. et al. Zebrafish Social Behavior in the Wild. **Zebrafish**, 2016b.
- SZPUNAR, K. K.; SCHACTER, D. L. Get real: Effects of repeated simulation and emotion on the perceived plausibility of future experiences. **Journal of Experimental Psychology: General**, 2013.
- TELES, M. C.; OLIVEIRA, R. F. Androgen response to social competition in a shoaling fish. **Hormones and behavior**, v. 78, p. 8–12, fev. 2016.
- THÖRNQVIST, P. O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 927–934, 1 fev. 2019a.
- THÖRNQVIST, P.-O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural brain research**, v. 359, p. 927–934, 1 fev. 2019b.
- TOMS, C. N.; ECHEVARRIA, D. J. Back to basics: Searching for a comprehensive framework for exploring individual differences in zebrafish (*Danio rerio*) behavior. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 325–340, 28 jul. 2014.
- TONI, M. et al. Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. **animal** Toni, M., Manciooco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C., & Malavasi, S. (2019). Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. **Animal**, 13(1), 161–170. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000940>, v. 13, n. 1, p. 161–170, 2 jan. 2019a.
- TONI, M. et al. Environmental temperature variation affects brain protein expression and cognitive abilities in adult zebrafish (*Danio rerio*): A proteomic and behavioural study. **Journal of Proteomics**, v. 204, 30 jul. 2019b.
- TRAN, S. et al. Neurochemical factors underlying individual differences in locomotor activity and anxiety-like behavioral responses in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 65, p. 25–33, 4 fev. 2016.
- TRAN, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, 2014.

- TRAN, S.; GERLAI, R. Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2013.
- TUDORACHE, C. et al. Biological clock function is linked to proactive and reactive personality types. **BMC Biology**, v. 16, n. 1, p. 148, 21 dez. 2018.
- TUDORACHE, C.; SCHAAF, M. J. M. M.; SLABBEEKOORN, H. Covariation between behaviour and physiology indicators of coping style in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 3, p. 251–258, dez. 2013.
- UTNE-PALM, A. C.; SMITH, A. Fish as Laboratory Animals. Em: [s.l: s.n.]. p. 375–400.
- VIGNET, C. et al. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, 2013.
- VITAL, C.; MARTINS, E. P. Socially-Central Zebrafish Influence Group Behavior More than Those on the Social Periphery. **PLoS ONE**, 2013.
- VOLGIN, A. D. et al. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 425–432, out. 2018a.
- VOLGIN, A. D. et al. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 425–432, 1 out. 2018b.
- VOLGIN, A. D. et al. **Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions.** **Journal of Neuroscience Research**, 2019.
- VON KROGH, K. et al. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 1, p. 32–39, ago. 2010.
- WAFER, L. N. et al. Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 291–294, 2016.
- WEARY, D. M.; ROBBINS, J. A. Understanding the multiple conceptions of animal welfare. **Animal Welfare**, v. 28, n. 1, p. 33–40, 1 fev. 2019.
- WEBER, D. N.; GHORAI, J. K. Experimental Design Affects Social Behavior Outcomes in Adult Zebrafish Developmentally Exposed to Lead. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 294–302, set. 2013.
- WHITE, L. J. et al. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, v. 132, p. 189–199, out. 2017.
- WICHMAN, A.; KEELING, L. J.; FORKMAN, B. Cognitive bias and anticipatory behaviour of laying hens housed in basic and enriched pens. **Applied Animal Behaviour Science**, 2012.
- WILKES, L. et al. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 139, n. 1–2, p. 143–150, jun. 2012.
- WOLFER, D. P. et al. Cage enrichment and mouse behaviour. **Nature** 2004 **432:7019**, v. 432, n. 7019, p. 821–822, 15 dez. 2004.

WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2010.

WONG, R. Y. et al. Comparing behavioral responses across multiple assays of stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behaviour**, 2012.

WONG, R. Y.; FRENCH, J.; RUSS, J. B. Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles. **Royal Society Open Science**, 2019.

WOODWARD, M. A.; WINDER, L. A.; WATT, P. J. Enrichment increases aggression in zebrafish. **Fishes**, 2019.

YUAN, M. et al. Behavioral and Metabolic Phenotype Indicate Personality in Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Physiology**, v. 0, n. MAY, p. 653, 30 maio 2018.

ZABEGALOV, K. N. et al. Understanding zebrafish aggressive behavior. **Behavioural processes**, v. 158, p. 200–210, 1 jan. 2018.

ZÁVORKA, L. et al. Effects of Familiarity and Population Density on Competitive Interactions and Growth: An Experimental Study on a Territorial Salmonid Fish. **Ethology**, v. 121, n. 12, p. 1202–1211, 1 dez. 2015.

ZHANG, Z. et al. A Comparative Study on Two Territorial Fishes: The Influence of Physical Enrichment on Aggressive Behavior. **Animals 2021, Vol. 11, Page 1868**, v. 11, n. 7, p. 1868, 23 jun. 2021.

ZIDAR, J. et al. Environmental complexity buffers against stress-induced negative judgement bias in female chickens. **Scientific Reports**, 2018.

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

El pez cebra es un excelente modelo de estudio del bienestar animal ya que su ambiente es fácil de modificar en condiciones de laboratorio. Lo cual permite simular diferentes condiciones ambientales para luego evaluar como estas afectan su bienestar. Por ejemplo, manipulaciones ambientales antagonistas y de larga duración han inducido o reducido con éxito las respuestas de estrés y calidad de vida del pez cebra. Tal es el caso del enriquecimiento ambiental (EA) el cuál generalmente reduce los comportamientos relacionados con la ansiedad y mejora la inmunidad, mientras que el estrés crónico impredecible (ECI) y estresores de baja intensidad relacionados con condiciones estándar del acuario (vibraciones, diferentes colores de fondo, diferentes tipos de luz e intensidad de luz, etc.) generan efectos opuestos. No obstante, el enriquecimiento ambiental no siempre funciona de la forma deseada y aún se desconocen los mecanismos por los cuales este produce efectos benéficos sobre el comportamiento y el bienestar animal (BUENHOMBRE et al., 2021).

Hoy en día la respuesta conductual y fisiológica del pez cebra como modelo de ansiedad se encuentra bastante estandarizada y ha sido ampliamente evaluada (BUENHOMBRE et al., 2021; COLLIER; KALUEFF; ECHEVARRIA, 2017; SONG et al., 2018; STEWART et al., 2012). Lo que proporciona una serie de pruebas valiosas para la estimación del efecto de las modificaciones ambientales como el EA y el ECI sobre el bienestar de esta especie. No obstante, actualmente el bienestar animal no puede entenderse solo como la ausencia de estados emocionales negativos, sino como el balance positivo entre los diferentes estados emocionales evaluados en un animal (GREEN; MELLOR, 2011; MENDL; PAUL, 2020; PAUL et al., 2020; PAUL; MENDL, 2018). Por lo tanto, nuevos paradigmas son necesarios para esta evaluación.

Existen algunos comportamientos como la formación de un cardumen cerca de la superficie del agua “cardumen elevado” (FRANKS; GRAHAM; VON KEYSERLINGK, 2018) o las pruebas de preferencia (DEPASQUALE; STURGILL; BRAITHWAITE, 2020) como indicadores positivos de bienestar animal. No obstante, el primero solo ha sido reportado en condiciones seminaturales y acuarios de tamaño considerablemente más grandes que los utilizados normalmente en condiciones de laboratorio (FRANKS; GRAHAM; VON KEYSERLINGK, 2018). Las pruebas de preferencia por otra parte dan una buena primera

indicación de cómo se sienten y están los animales, pero puede haber dificultades para interpretar los resultados. La preferencia puede ser afectada por las experiencias previas, la escogencia puede ser el menor de los males o un lujo, las preferencias a corto plazo pueden entrar en conflicto con el bienestar a largo plazo y los animales no siempre escogen lo que es mejor para su bienestar (DUNCAN, 1992).

Para solventar los problemas de los escasos indicadores conductuales positivos y las fallas en la interpretación de las pruebas de preferencia, una métrica alternativa que ha surgido en otras especies como indicador de los estados emocionales y por ende del bienestar animal, es el sesgo cognitivo, que evalúa la relación entre emociones y cognición (BURMAN; MENDEL, 2018; HARDING; PAUL; MENDEL, 2004; MENDEL; PAUL, 2020; PAUL; HARDING; MENDEL, 2005). Los estudios de estas pruebas cognitivas en mamíferos han mostrado resultados prometedores (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; CLEGG, 2018; ROELOFS et al., 2016). Sin embargo, otros grupos taxonómicos como el pez cebra no han sido objeto de esta investigación (BETHELL, 2015) y por lo tanto, la aplicabilidad de las pruebas cognitivas para evaluar los estados afectivos en esta especie esta aun por ser determinada. Aunque estudios recientes en cíclidos parecen demostrar que al menos el paradigma del sesgo de juicio cognitivo (que mide la respuesta de un animal frente a un estímulo ambiguo entre dos previamente entrenados, basado en su experiencia y estados emocionales previos) puede ser útil en peces (LAUBU; LOUÂPRE; DECHAUME-MONCHARMONT, 2019).

Por consiguiente, en los artículos de esta tesis, conducimos varios estudios empíricos para investigar el efecto del enriquecimiento ambiental estructural sobre el bienestar animal del pez cebra como modelo. Evaluando si la prueba de sesgo del juicio cognitivo podía ser utilizada como indicador de los estados emocionales resultantes de las diferentes modificaciones ambientales en esta especie. También evaluamos comportamientos relacionados a la ansiedad (escototaxia y congelamiento) para determinar que tanto estas conductas covariaban con la prueba de sesgo cognitivo.

Por lo general el EA suele considerarse una experiencia positiva, que reduce la respuesta de estrés, no obstante, con el tiempo este puede generar cambios fisiológicos consistentes con estrés leve, por ejemplo, secreción elevada de cortisol (CORT), aumento de la masa suprarrenal, etc. (BUENHOMBRE et al., 2021; SMAIL et al., 2020). Por ende, más que producir una disminución del estrés como tal, parece que el EA más bien prepara a un animal para hacer frente a los factores estresantes y viceversa. Actuando como un estresor leve en un espectro entre demasiada ECI y muy poca (condiciones estándar) intensidad (BUENHOMBRE

et al., 2021; COLDITZ; HINE, 2016; SMAIL et al., 2020). Por ejemplo, la exposición en la vida temprana tanto a EA como a estresores leves mejoran el aprendizaje (DEPASQUALE et al., 2016; SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011) y reduce las respuestas relacionadas con la ansiedad (ABREU et al., 2018; DEPASQUALE et al., 2016; SHAMS et al., 2018). Por ende, más allá de un aumento en la complejidad del ambiente, el EA podría entenderse como una exposición controlada a estresores que genera una respuesta adaptativa y beneficiosa, incrementando la resiliencia al estrés o la capacidad para que el animal se recupere rápidamente del impacto de los factores estresantes físicos, sociales y de enfermedad (COLDITZ; HINE, 2016; LIU et al., 2018; MAGALHÃES et al., 2019).

Adicionalmente, está bien establecido en humanos y mamíferos que los factores cognitivos desempeñan un rol importante en el desencadenamiento de la respuesta al estrés (también conocido como teoría de la evaluación cognitiva), pero esto se ha estudiado muy poco en otros taxones de vertebrados. Recientemente algunos estudios demuestran que la predictibilidad es un factor clave de la evaluación cognitiva de los estímulos y que está evaluación del estímulo por parte del individuo, es quizá más importante para el desencadenamiento de una respuesta emocional que las características intrínsecas del estímulo en sí (CERQUEIRA et al., 2017, 2020; MILLOT et al., 2014). Por ende, otro factor clave a analizar en los estudios de enriquecimiento ambiental es la percepción del individuo de los diferentes estímulos ambientales utilizados.

Dado lo anterior en esta tesis decidimos no solo evaluar la presencia y ausencia de enriquecimiento ambiental estructural, sino también los efectos de su pérdida o ganancia de manera súbita (impredecible) o gradual (predecible). En los resultados de nuestra investigación no encontramos efectos puntuales para la presencia o ausencia de enriquecimiento, sin embargo, encontramos diferencias significativas para la ganancia súbita y la pérdida gradual de enriquecimiento en comparación con condiciones constantes o una ganancia de enriquecimiento gradual, lo que concuerda parcialmente con la teoría de la evaluación cognitiva (CERQUEIRA et al., 2017, 2020). Al parecer la forma de presentación del EA más que su presencia como tal, fue lo que consiguió modificar las respuestas conductuales evaluadas en esta tesis.

No obstante, es importante recalcar que el tiempo de duración del enriquecimiento ambiental en nuestro estudio fue relativamente corto (16 días), comparado con otros estudios que lo han realizado por largos periodos de tiempo (24 meses) (MANUEL et al., 2015a). Tal vez un mayor tiempo de exposición sea necesario para generar efectos adicionales sobre los

estados emocionales y las respuestas conductuales relacionadas en este pez, como se ha observado en otros estudios de mayor duración (BUENHOMBRE et al., 2021; NÄSLUND; JOHANSSON, 2016b; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021). Otro aspecto que pudo afectar los resultados de la tesis de forma importante fue la experiencia previa del animal. Todos los peces del estudio estuvieron durante un tiempo prolongado en acuarios estériles y condiciones de aislamiento antes del estudio, sin embargo, ninguno de ellos experimentó previamente condiciones de enriquecimiento ambiental en grupo, lo cual pudo influenciar sus respuestas (LIEGGI et al., 2019).

Adicionalmente no encontramos evidencia que indicará que los resultados del sesgo cognitivo coviaran por completo con las conductas relacionadas a la ansiedad evaluadas (escototaxia y congelamiento). Lo cual indicaría que tal vez las manipulaciones ambientales utilizadas no causaron cambios en el estado afectivo de la forma deseada para generar el sesgo observado (MENDL et al., 2009). En la mayoría de los estudios que evalúan sesgo cognitivo, la lógica de la manipulación del estado afectivo, es utilizar las mismas o manipulaciones similares a aquellas previamente testeadas mediante pruebas convencionales y que han producido cambios conductuales y fisiológicos relacionados a un estado emocional (MENDL et al., 2009). Tal es el caso de la inclusión de enriquecimiento y la disminución de comportamientos de ansiedad en el claro oscuro o el tanque novedoso (BLASER; ROSEMBERG, 2012; COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015b; MAXIMINO et al., 2012). Por ende, se espera cierta relación entre el sesgo cognitivo y la prueba convencional que midió la manipulación originalmente (MENDL et al., 2009).

Por otra parte, también podría ser que la prueba del SJC no detectó los efectos del positivos del enriquecimiento ambiental (reducción de escototaxia), pero si fue capaz de detectar los estados emocionales negativos del pez, de forma muy similar a la respuesta de claro/oscuro. Ya que una ganancia súbita (impredecible) de enriquecimiento ambiental produjo un sesgo cognitivo negativo y concomitantemente se evidenció más escototaxia en los peces. Quizá al igual que en otras especies esta prueba detecta más fácilmente estados emocionales negativos que positivos (BACIADONNA; MCELLIGOTT, 2015; ROELOFS et al., 2016).

Adicionalmente son muy pocos los estudios que han evaluado cambios concomitantes del SJC con otras pruebas convencionales para medir estados afectivos y confirmar el efecto predictivo de este sesgo. Dentro de estos, por ejemplo, ratas expuestas a viviendas impredecibles parecían estar menos ansiosas, como lo indica el campo abierto y la prueba de laberinto en cruz y mostraron respuestas más optimistas en la tarea de SJC (Parker,

2008). No obstante, otros estudios no encontraron esa relación (MENDL et al., 2009). Incluyendo un experimento similar al nuestro en aves donde tampoco se encontró que el sesgo de juicio cognitivo covariara con una respuesta que evaluaba el miedo (ROSS et al., 2019). Lo que puede indicar que las respuestas de disminución de ansiedad que no son detectadas por el sesgo cognitivo siguen mecanismos diferentes a pesar de que ambos involucren la evaluación de estímulos. El sesgo cognitivo midiendo una respuesta voluntaria de control cognitivo ejecutivo (IYASERE et al., 2017) y la prueba de claro/oscuro una respuesta refleja involuntaria (MAXIMINO et al., 2010b). Adicionalmente, en pez cebra se ha encontrado que diferentes pruebas evocan diferentes comportamientos y pueden estimular diferentes vías neurológicas, incluso cuando las pruebas están midiendo conductas relacionadas a el mismo estado emocional (BLASER; ROSEMBERG, 2012; MAXIMINO et al., 2012). De manera similar, ningún paradigma captura adecuadamente toda la información necesaria para interpretar los resultados de ansiedad (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015b).

Si bien la capacidad del EA para contrarrestar las alteraciones de la conducta relacionadas con el estrés y mejorar la calidad de vida en un animal es prometedora, es importante mencionar que el EA es un paradigma complejo de modelar por sus múltiples elementos, donde cada elemento puede afectar de forma diferente las respuestas evaluadas. Por ejemplo, existen diversos tipos de enriquecimiento ambiental (social, estructural, auditivo, alimenticio, cognitivo, etc.), condiciones heterogéneas entre acuarios (dimensión, diseño, dinámicas sociales, densidad de población, etc.), la cantidad e intensidad de los ítems utilizados difiere entre estudios, la duración de exposición puede variar de días a meses, los efectos de esa exposición pueden ser diferentes de acuerdo con el periodo ontogénico evaluado y existen diferencias importantes en las respuestas evaluadas de acuerdo a la especie, raza, línea genética y diferencias individuales como el sexo y la personalidad (BUENHOMBRE et al., 2021; LIEGGI et al., 2019; STEVENS; REED; HAWKINS, 2021). Todos estos elementos dificultan establecer cuáles son los mecanismos mediante los cuales el EA genera una experiencia positiva y promueve la resiliencia al estrés. Igualmente, toda esta heterogeneidad ha generado respuestas inconsistentes entre los pocos estudios que han evaluado este paradigma en el pez cebra (BUENHOMBRE et al., 2021).

En consecuencia, en la presente tesis nos propusimos evaluar uno de los elementos que pueden modificar las respuestas conductuales frente al enriquecimiento ambiental; la personalidad. También decidimos evaluar esta diferencia individual por que varios estudios han encontrado que la personalidad puede modificar el sesgo de juicio cognitivo en varias especies.

No obstante evaluar los efectos e interacciones de la personalidad, el enriquecimiento ambiental y el sesgo cognitivo resultó ser un desafío. Solo conseguimos el condicionamiento de discriminación visual requerido para realizar posteriores pruebas de sesgo de juicio en peces categorizados como osados-proactivos. Los peces catalogados como tímidos-reactivos no lograron este condicionamiento y por ende no pudimos comparar la respuesta de sesgo cognitivo de acuerdo con el tipo de personalidad a pesar de que el mismo protocolo fue utilizado para ambos tipos. Sin embargo, estas respuestas indican que existen diferencias individuales importantes para este tipo de tarea cognitiva y muy probablemente sobre el sesgo cognitivo como tal. Resultados similares han encontrado que peces clasificados como reactivos evidencian un tiempo más prolongado para generar un condicionamiento apetitivo (BAKER; WONG, 2019).

Asimismo, existe la posibilidad de que los estímulos entrenados presentaran sesgos de aprendizaje, ya que algunos estudios recientes han encontrado que el color verde es más fácil de entrenar que el color rojo (GATTO et al., 2020; SANTACÀ et al., 2021), lo que también pudo influir sobre la capacidad de discriminación visual de los peces tímidos reactivos que fueron entrenados para responder al rojo mientras que los osados lo hicieron en el verde.

Para la respuesta de claro/oscurito la diferencia en escototaxia reflejo lo esperado, encontrando que peces tímidos presentan más conductas de este tipo y por ende más ansiedad. Además, los resultados encontrados para esta prueba fueron muy similares entre las dos réplicas evaluadas en la tesis, lo que indica que esta prueba es bastante sensible para evaluar cambios en las modificaciones ambientales, independientemente de la personalidad. Adicionalmente, la prueba de claro/oscurito no requirió condicionamiento previo y por lo tanto, fue mucho más fácil de implementar.

## 5. CONCLUSIONES GENERALES

Los datos proporcionan cierta evidencia de que el enriquecimiento ambiental estructural y la forma en que este se presenta pueden alterar el sesgo cognitivo y los comportamientos similares a la ansiedad del pez cebra. Adicionalmente se muestra que la aplicación de técnicas de sesgo de juicio cognitivo desarrolladas para humanos, otros mamíferos e inclusive otros teleósteos no es tan sencilla de establecer, ni los resultados tan intuitivos de interpretar. Los datos demuestran que la prueba de claro oscuro es bastante sensible a ciertas modificaciones ambientales independientemente del tipo de personalidad. Además, esta prueba parece ser un mejor indicador que el sesgo de juicio para detectar cambios en el comportamiento debido a la manipulación de la vivienda y es más fácil y rápida de evaluar.

Esta tesis es una primera aproximación al uso del sesgo cognitivo para la evaluación de los efectos del enriquecimiento ambiental y los estados emocionales del pez cebra. Por ende, los métodos estudiados aquí para manipular y evaluar los estados afectivos del pez cebra deben optimizarse y validarse aún más. Igualmente, en esta tesis solo se evaluó un tipo de sesgo cognitivo; el sesgo de juicio cognitivo o toma de decisiones. Por lo tanto, los sesgos sobre la atención y la memoria están aún por ser evaluados en esta especie.

Para el sesgo de juicio cognitivo se recomienda mejorar las condiciones control (condiciones constantes) alterándolas (*e.g.*, moviendo elementos, pero manteniendo constante el enriquecimiento). Esto ayudaría a corroborar que tanto la percepción de los estímulos más que sus características intrínsecas influyen las respuestas evaluadas. Asimismo, vale la pena evaluar un diseño cruzado donde el pez cebra que ha experimentado un entorno enriquecido se aloja luego en un entorno estéril para volver al enriquecimiento o viceversa. Esto podría dar más claridad a los efectos de la adición o pérdida de enriquecimiento sobre el bienestar de los peces. También se recomienda mejorar la manipulación afectiva que precede al SJC, aumentando el tiempo de exposición a las manipulaciones ambientales. Con respecto a la experiencia previa sería importante colocar a los peces en condiciones enriquecidas y estériles antes del experimento, lo que ayudaría a dilucidar si la habituación o la novedad juega un papel importante en las respuestas evaluadas.

Igualmente sería interesante evaluar el efecto de un estrés crónico impredecible versus el efecto del enriquecimiento ambiental y condiciones estándar de laboratorio. De esta

manera se podría corroborar o contradecir la hipótesis de “inoculación del estrés” donde el enriquecimiento actuaría como un estresor leve que generaría un nivel óptimo de estimulación capaz de promover la resiliencia al estrés.

Con respecto al condicionamiento previo al SJC se recomienda evaluar varios aspectos de este. Utilizando por ejemplo diferentes clases de estímulos (espacial, olfativo, auditivo) a los utilizados en este estudio (visual de dos colores), determinando su facilidad de entrenamiento y analizando que tan factible es establecer su ambigüedad. A la par sería importante corroborar que el nuevo tipo de señales no presenten sesgos de aprendizaje. Además, sería útil comparar un tipo de aparato, tarea y esquemas de refuerzo y castigo diferentes a los de nuestro estudio.

Finalmente, las influencias de la raza, el sexo y la personalidad deben evaluarse y correlacionarse en experimentos futuros. Para evaluar el efecto de la personalidad sobre el juicio cognitivo, recomiendo realizar el condicionamiento de discriminación y establecer el protocolo de entrenamiento primero sobre los peces reactivos, para luego replicar esto en los proactivos. Lo anterior debido a que aparentemente el aprendizaje de este tipo de tareas es más lento en peces reactivos. Esta es la primera vez que un estudio en animales investiga si estas medidas conceptualmente similares están relacionadas empíricamente. Por ende, los resultados encontrados para la personalidad en este estudio son un primer acercamiento y los paradigmas utilizados deben optimizarse y validarse aún más.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio realizado es una aproximación inicial a una línea de investigación de bajo costo, con posibilidad de manipular muchas de las variables que afectan el bienestar de los peces y otros animales, permitiendo realizar varias homologías y analogías entre especies. No obstante, como aproximación inicial presento varias limitaciones a mejorar.

Uno de los factores limitantes más importantes es que solo pudimos capturar la valencia negativa, por ende, es muy importante mejorar la metodología empleada para generar y estudiar el sesgo cognitivo positivo. Para ello sería interesante en futuros estudios utilizar ambientes seminaturales o realizar una exposición más prolongada al enriquecimiento ambiental estructural u otro tipo de enriquecimiento. Por otra parte, ya que el pez cebrá es muy sensible a las principales clases de fármacos neurotrópicos clínicamente activos, se podrían usar fármacos ansiolíticos o antidepresivos para modular el sesgo cognitivo positivo.

Igualmente debido a limitaciones de tiempo y disponibilidad de recursos, en este estudio no pudimos realizar mediciones neuroendocrinas. No obstante, sería interesante realizar la medición de la actividad cerebral en áreas análogas a las involucradas en los procesos de recompensa, aversión y memoria del cerebro de los mamíferos, a saber, la zona medial del área telencefálica dorsal (supuesta estructura homóloga de la amígdala) y la zona lateral del área telencefálica dorsal (supuesta estructura homóloga del hipocampo). Sería de especial interés medir la expresión inmediata de ARNm de genes, evaluando cortes de telencéfalo cerebral a través de secciones coronales en las áreas antes mencionadas, ya que este pez presenta elevación comprobada de c-fos en respuesta a comportamientos relacionados a la ansiedad (Para más información ver artículo I de esta tesis). También se podrían utilizar pruebas y ensayos que analicen niveles de serotonina y dopamina en este pez, ya que al igual que en los humanos, la habénula del pez cebrá influye en la liberación de serotonina y dopamina. Como se observa la estructura y la morfología de los cerebros de pez cebrá son comparables a las de otros mamíferos y tanto la estructura a nivel macro como las células a nivel micro comparten elementos con los humanos (Para más información ver artículo I de esta tesis) que pueden modularse y observarse para evaluar sus estados emocionales y bienestar.

De manera similar sería importante evaluar la actividad del eje hipotalámico pituitario interrenal el cuál es homólogo al eje hipotalámico pituitario adrenal en humanos, con

el cortisol siendo la hormona más importante en ambas especies. Esta respuesta neuroendocrina conservada entre el pez cebra y los humanos lo posicionan como un modelo único para evaluar las respuestas mediadas por respuestas de estrés o en este caso como parte del enriquecimiento ambiental. Por ende, sería interesante su medición a través de cortisol en cuerpo completo, venas de la cola o el tronco o directamente en el agua. (Para más información sobre actividad neuroendocrina en esta especie leer artículo I de esta tesis).

Otro aspecto limitante de este estudio fue el uso de adultos obtenidos de forma comercial, lo cual no permitió conocer la influencia de la historia de vida de los animales sobre los efectos del enriquecimiento ambiental y la prueba de sesgo cognitivo, ni evaluar las etapas de larva y juvenil. De forma similar la compra comercial no permitió obtener poblaciones homogéneas con una determinada dimensión de personalidad para inferir la influencia de esta sobre el sesgo cognitivo y el aprendizaje. Relacionado a lo anterior se podrían examinar otras influencias individuales como el sexo en estudios futuros.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS GENERALES

ABBEY-LEE, R. N. N. et al. The Influence of Rearing on Behavior, Brain Monoamines, and Gene Expression in Three-Spined Sticklebacks. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 91, n. 4, p. 201–213, 1 ago. 2018.

ABOZAID, H.; WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Elevated Temperature Applied during Gonadal Transformation Leads to Male Bias in Zebrafish (*Danio rerio*). **Sexual Development**, v. 6, n. 4, p. 201–209, jun. 2012.

ABREU, M. S. et al. Modulation of Cortisol Responses to an Acute Stressor in Zebrafish Visually Exposed to Heterospecific Fish During Development. **Zebrafish**, v. 15, n. 3, p. 228–233, jun. 2018.

ALESTRÖM, P. et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 3, p. 213, 1 jun. 2020.

AMPATZIS, K.; DERMON, C. R. Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 385–393, 1 out. 2016.

ANDERSON, M. G. et al. Environmental complexity positively impacts affective states of broiler chickens. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 20 ago. 2021.

ANDRÉ, V. et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. **PLoS Biology**, v. 16, n. 4, 16 abr. 2018.

ANGIULLI, E. et al. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*. **Scientific Reports**, 2020.

APONTE, A.; PETRUNICH-RUTHERFORD, M. L. Acute net stress of young adult zebrafish (*Danio rerio*) is not sufficient to increase anxiety-like behavior and whole-body cortisol. **PeerJ**, 2019.

ARIYOMO, T. O.; WATT, P. J. Effect of hunger level and time of day on boldness and aggression in the zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 86, n. 6, p. 1852–1859, 1 jun. 2015.

ARNOLD, K. E. et al. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. **Biology Letters**, v. 9, n. 4, 23 ago. 2013.

ASHER, L. et al. Mood and personality interact to determine cognitive biases in pigs. **Biology letters**, v. 12, n. 11, p. 20160402, 16 nov. 2016.

ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189–196, 1 jul. 2016.

- AUDIRA, G. et al. Which zebrafish strains are more suitable to perform behavioral studies? A comprehensive comparison by phenomic approach. **Biology**, 2020.
- AVDESH, A. et al. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2012.
- BACIADONNA, L.; MCELLIGOTT, A. G. The use of judgement bias to assess welfare in farm livestock. **Animal Welfare**, 2015.
- BAKER, M. R. et al. Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12114, 14 ago. 2018.
- BAKER, M. R.; WONG, R. Y. Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9935, 9 dez. 2019.
- BALDOCK, N. M.; SIBLY, R. M. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. **Applied animal behaviour science**, v. 28, n. 1–2, p. 15–39, 1990.
- BARCELLOS, H. H. A. et al. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. **PeerJ**, v. 6, p. e5162, 23 jul. 2018.
- BARNARD, S. et al. Personality traits affecting judgement bias task performance in dogs (*Canis familiaris*). **Scientific Reports**, 2018.
- BASQUILL, S. P.; GRANT, J. W. A. An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebra fish (*Danio rerio*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, n. 4, p. 770–772, 1998.
- BATESON, M.; NETTLE, D. Development of a cognitive bias methodology for measuring low mood in chimpanzees. **PeerJ**, 2015.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. **Parsing reward. Trends in Neurosciences**, 2003.
- BETHELL, E. J. A “How-To” Guide for Designing Judgment Bias Studies to Assess Captive Animal Welfare. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 2015.
- BETHELL, E. J.; KOYAMA, N. F. Happy hamsters? Enrichment induces positive judgement bias for mildly (but not truly) ambiguous cues to reward and punishment in *Mesocricetus auratus*. **Royal Society Open Science**, 2015.
- BHAT, A.; GREULICH, M. M.; MARTINS, E. P. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (*Danio rerio*) populations. **PLoS ONE**, 2015.
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36931, 17 maio 2012.
- BLOCH, S. et al. Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2019a.
- BLOCH, S. et al. Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 370, p. 111924, 16 set. 2019b.

BOISSY, A. How to access animal sentience? The close relationship between emotions and cognition. **Animal Welfare: from Science to Law**, n. 978-2-9512167-4-7, 2019.

BOISSY, A.; ERHARD, H. W. How Studying Interactions Between Animal Emotions, Cognition, and Personality Can Contribute to Improve Farm Animal Welfare. Em: **Genetics and the Behavior of Domestic Animals**. [s.l.: s.n.].

BOISSY, A.; LEE, C. How assessing relationships between emotions and cognition can improve farm animal welfare. **OIE Revue Scientifique et Technique**, 2014.

BOWER, G. H. Mood and memory. **American Psychologist**, 1981.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J.; SEQUEIRA-CORDERO, A. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, 2020.

BRITO, T. M. DE. **Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no *Carassius auratus* (peixe dourado)**. Universidade de São Paulo, , 2011.

BROWN, A. R. et al. Are Toxicological Responses in Laboratory (Inbred) Zebrafish Representative of Those in Outbred (Wild) Populations? – A Case Study with an Endocrine Disrupting Chemical. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 9, p. 4166–4172, 1 maio 2011.

BROWN, A. R. et al. Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. E1237–E1246, 17 mar. 2015.

BRUCKNER, J. J. et al. The microbiota promotes social behavior by neuro-immune modulation of neurite complexity. **bioRxiv**, p. 2020.05.01.071373, 3 maio 2020.

BRYDGES, N. M. et al. Environmental enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. **Animal Behaviour**, 2011.

BUČKOVÁ, K.; ŠPINKA, M.; HINTZE, S. Pair housing makes calves more optimistic. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 27 dez. 2019.

BUDAEV, S. V. “Personality” in the Guppy (*Poecilia reticulata*): A Correlational Study of Exploratory Behavior and Social Tendency. **Journal of Comparative Psychology**, v. 111, n. 4, p. 399–411, 1997.

BUDAEV, S. V.; ZHUIKOV, A. Y. Avoidance learning and “personality” in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 112, n. 1, p. 92–94, 1998.

BUENHOMBRE, J. et al. 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**, v. 131, p. 765–791, 1 dez. 2021.

BUENHOMBRE, J. et al. Structural environmental enrichment and the way it is offered influence cognitive judgement bias and anxiety-like behaviours in zebrafish. **Animal Cognition**, 2022.

- BURGDORF, J. et al. Current Neuropharmacology Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Positive Emotional Learning Induces Resilience to Depression: A Role for NMDA Receptor-mediated Synaptic Plasticity. **Current Neuropharmacology**, 2017.
- BURMAN, O. et al. Using judgement bias to measure positive affective state in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, 2011.
- BURMAN, O. H. P. et al. A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, 2008.
- BURMAN, O. H. P.; MENDL, M. T. A novel task to assess mood congruent memory bias in non-human animals. **Journal of neuroscience methods**, v. 308, p. 269–275, 1 out. 2018.
- CARRERAS UBACH, R. The cognitive bias test as a measure of emotional state in pigs. 2016.
- CASTRANOVA, D. et al. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 8, n. 3, p. 141–146, set. 2011.
- CERQUEIRA, M. et al. Cognitive appraisal of environmental stimuli induces emotion-like states in fish. **Scientific Reports**, 2017.
- CERQUEIRA, M. et al. Cognitive appraisal in fish: Stressor predictability modulates the physiological and neurobehavioural stress response in sea bass. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2020.
- CHAKRAVARTY, S. et al. Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 14 maio 2013.
- CLEGG, I. L. K. **Cognitive bias in zoo animals: An optimistic outlook for welfare assessment**. **Animals**, 2018.
- COLDITZ, I. G.; HINE, B. C. **Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare**. **Animal Production Science**, 2016.
- COLLIER, A. D.; KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J. Zebrafish models of anxiety-like behaviors. Em: **The Rights and Wrongs of Zebrafish: Behavioral Phenotyping of Zebrafish**. [s.l: s.n.].
- COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 3, p. 280–5, maio 2015a.
- COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 3, p. 280, 1 maio 2015b.
- COLOM, G. et al. of Positive Humour As a Variable That Reduces Stress. Relationship of Humour With Personality and Performance Variables. **Animal Biology**, 2013.

- COLWILL, R. M. et al. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, v. 70, n. 1, p. 19–31, 31 ago. 2005.
- CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1670–1672, 1999.
- CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. **Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment**. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2015.
- CRUMP, A.; ARNOTT, G.; BETHELL, E. J. **Affect-driven attention biases as animal welfare indicators: Review and methods**. **Animals**, 2018.
- CZÉH, B.; WIBORG, O.; FUCHS, E. Experimental Animal Models for Depressive Disorders. **Understanding Depression: Volume 1. Biomedical and Neurobiological Background**, p. 221, 2018.
- DAHLBOM, S. J. et al. Boldness Predicts Social Status in Zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23565, 17 ago. 2011.
- DAHLBOM, S. J. et al. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 333–338, 17 mar. 2012.
- DAHLBOM, S. J. **Bully or Bullied?: The Zebrafish as a Model for Social Stress and Depression**. [s.l: s.n.].
- DALGLEISH, T.; WERNER-SEIDLER, A. **Disruptions in autobiographical memory processing in depression and the emergence of memory therapeutics**. **Trends in Cognitive Sciences**, 2014.
- DE HAAS, E. N. et al. Individual differences in personality in laying hens are related to learning a colour cue association. **Behavioural Processes**, v. 134, p. 37–42, jan. 2017.
- DEMIN, K. A. et al. **The role of intraspecies variation in fish neurobehavioral and neuropharmacological phenotypes in aquatic models**. **Aquatic Toxicology**, 2019.
- DEMIN, K. A. et al. **Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish**. **Stress**, 2020a.
- DEMIN, K. A. et al. **Cross-species Analyses of Intra-species Behavioral Differences in Mammals and Fish**. **Neuroscience**, 2020b.
- DEPASQUALE, C. et al. The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behaviour. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1823, p. 20152564, 27 jan. 2016.
- DEPASQUALE, C. et al. The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, 2019.
- DEPASQUALE, C.; LERI, J. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, 2018.

- DEPASQUALE, C.; STURGILL, J.; BRAITHWAITE, V. A. A standardized protocol for preference testing to assess fish welfare. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 156, 1 fev. 2020.
- DÉSIRÉ, L. et al. On the way to assess emotions in animals: do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? **Journal of Comparative Psychology**, v. 118, n. 4, p. 363, 2004.
- DOUGLAS, C. et al. Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, 2012.
- DUNCAN, I. J. **Measuring preferences and the strength of preferences. Poultry science**, 1992.
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2009.
- ENKEL, T. et al. Ambiguous-Cue Interpretation is Biased Under Stress- and Depression-Like States in Rats. **Neuropsychopharmacology** 2010 **35:4**, v. 35, n. 4, p. 1008–1015, 30 dez. 2009.
- EXNEROVÁ, A. et al. Personality matters: individual variation in reactions of naive bird predators to aposematic prey. **Proceedings. Biological sciences**, v. 277, n. 1682, p. 723–728, 7 mar. 2010.
- EYSENCK, M. W. et al. Bias in Interpretation of Ambiguous Sentences Related to Threat in Anxiety. **Journal of Abnormal Psychology**, 1991.
- FARES, R. P. et al. Standardized Environmental Enrichment Supports Enhanced Brain Plasticity in Healthy Rats and Prevents Cognitive Impairment in Epileptic Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 14 jan. 2013.
- FAUSTINO, A. I.; OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, R. F. Linking appraisal to behavioral flexibility in animals: Implications for stress research. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2015.
- FIFE-COOK, I.; FRANKS, B. Positive Welfare for Fishes: Rationale and Areas for Future Study. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 31, 23 maio 2019.
- FILBY, A. L. et al. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 5, p. 576–587, 2 dez. 2010.
- FILE, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 3–12, 1996.
- FONTANA, B. D. et al. Moderate early life stress improves adult zebrafish (*Danio rerio*) working memory but does not affect social and anxiety-like responses. **Developmental Psychobiology**, 2020.
- FORKMAN, B. et al. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiology and Behavior**, 2007.
- FRANKS, B. What do animals want? **Animal Welfare**, 2019.

- FRANKS, B.; GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. Is Heightened-Shoaling a Good Candidate for Positive Emotional Behavior in Zebrafish? **Animals**, v. 8, n. 9, p. 152, 24 ago. 2018.
- FULCHER, N. et al. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. **Zebrafish**, v. 14, n. 1, p. 23–34, fev. 2017.
- GAIKWAD, S. et al. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. **Behavioural Processes**, 2011.
- GALHARDO, L.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, R. F. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 130, n. 1–2, p. 60–70, fev. 2011.
- GALHARDO, L.; VITAL, J.; OLIVEIRA, R. F. The role of predictability in the stress response of a cichlid fish. **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 3–4, p. 367–372, 1 mar. 2011.
- GATTO, E. et al. The devil is in the detail: Zebrafish learn to discriminate visual stimuli only if salient. **Behavioural Processes**, v. 179, 1 out. 2020.
- GENARIO, R. et al. **The evolutionarily conserved role of melatonin in CNS disorders and behavioral regulation: Translational lessons from zebrafish. Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2019.
- GERLAI, R. Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 178, p. 30–38, 1 mar. 2019.
- GERLAI, R. **Evolutionary conservation, translational relevance and cognitive function: The future of zebrafish in behavioral neuroscience. Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2020.
- GIACOMINI, A. C. V. V. et al. My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. **Physiology and Behavior**, v. 139, p. 182–187, fev. 2015.
- GIACOMINI, A. C. V. V. et al. Environmental and pharmacological manipulations blunt the stress response of zebrafish in a similar manner. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28986, 28 set. 2016.
- GORISSEN, M. et al. Differences in inhibitory avoidance, cortisol and brain gene expression in TL and AB zebrafish. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 5, p. 428–438, jun. 2015.
- GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. Free-choice exploration increases affiliative behaviour in zebrafish. **Applied Animal Behaviour Science**, 2018a.
- GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. **Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour. Applied Animal Behaviour Science**, 2018b.
- GREEN, T. C.; MELLOR, D. J. Extending ideas about animal welfare assessment to include ‘quality of life’ and related concepts. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2011.610283>, v. 59, n. 6, p. 263–271, nov. 2011.

GREENAWAY, K. H.; KALOKERINOS, E. K.; WILLIAMS, L. A. Context is Everything (in Emotion Research). **Social and Personality Psychology Compass**, 2018.

GREIVELDINGER, L.; VEISSIER, I.; BOISSY, A. The ability of lambs to form expectations and the emotional consequences of a discrepancy from their expectations. **Psychoneuroendocrinology**, 2011.

GRONQUIST, D.; BERGES, J. A. Effects of Aquarium-Related Stressors on the Zebrafish: A Comparison of Behavioral, Physiological, and Biochemical Indicators. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 25, n. 1, p. 53–65, mar. 2013.

GYGAX, L. The A to Z of statistics for testing cognitive judgement bias. **Animal Behaviour**, v. 95, p. 59–69, 2014.

HARDING, E. J.; PAUL, E. S.; MENDEL, M. Cognitive bias and affective state. **Nature**, 2004.

HEDLUND, L.; LØVLIE, H. Personality and production: Nervous cows produce less milk. **Journal of Dairy Science**, 2015.

HEIJTZ, R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 15 fev. 2011.

HENDRIE, C. A.; WEISS, S. M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 13–20, 1996.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.

HOLLEY, E. D. et al. Predictability of food supply, but not ration, increases exploratory behaviour in zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, 2014.

IYASERE, O. S. et al. Elevated levels of the stress hormone, corticosterone, cause “pessimistic” judgment bias in broiler chickens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

JOHNSSON, J. I.; CARLSSON, M.; SUNDSTROM, L. F. Habitat preference increases territorial defence in brown trout (*Salmo trutta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 48, n. 5, p. 373–377, 2000.

JONES, N. A. R. et al. Shade as enrichment: testing preferences for shelter in two model fish species. **Journal of fish biology**, v. 95, n. 4, p. 1161–1165, 1 out. 2019.

JONES, N. A. R.; WEBSTER, M. M.; SALVANES, A. G. V. Physical enrichment research for captive fish: Time to focus on the DETAILS. **Journal of Fish Biology**, 2021.

KALUEFF, A. V. et al. **Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond**. **Zebrafish**, 2013.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. **Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders**. **Trends in Pharmacological Sciences** Elsevier Current Trends, , 1 fev. 2014.

KAREKLAS, K.; ELWOOD, R. W.; HOLLAND, R. A. Grouping promotes risk-taking in unfamiliar settings. **Behavioural Processes**, 2018.

KECK, V. A. et al. Effects of Habitat Complexity on Pair-Housed Zebrafish. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 4, p. 378–83, jul. 2015.

KEEHN, J. D. **Animal models for psychiatry**. [s.l.: s.n.].

KEEN, H. A. et al. Validation of a novel cognitive bias task based on difference in quantity of reinforcement for assessing environmental enrichment. **Animal cognition**, v. 17, n. 3, p. 529–541, 2014.

KENNEY, J. W. et al. Contextual fear conditioning in zebrafish. **Learning and Memory**, 2017.

KERN, E. M. A. et al. Correlated evolution of personality, morphology and performance. **Animal Behaviour**, v. 117, p. 79–86, jul. 2016.

KIRSTEN, K. et al. First description of behavior and immune system relationship in fish. **Scientific Reports**, 2018.

KIRSTEN, K. et al. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 107–112, 2021.

KISTLER, C. et al. Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 4, p. 318–327, dez. 2011.

KOOLHAAS, J. M.; REENEN, C. G. VAN. Interaction between coping style / personality , stress , and welfare : Relevance for domestic farm animals 1. **Journal of Animal Science**, 2016.

KORTZFLEISCH, V. T. VON et al. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments’. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 6 out. 2020.

KOŠŤÁL, L.; SKALNÁ, Z.; PICHOVÁ, K. Use of cognitive bias as a welfare tool in poultry. **Journal of Animal Science**, 2020.

KREMER, L. et al. Housing and personality effects on judgement and attention biases in dairy cows. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 26 nov. 2021.

KRZYSZTOF, W.; PRZEMYSŁAW, P. C.; ROMAN, K. Cognitive bias test as a tool for accessing fish welfare. **Frontiers in Marine Science**, 2015.

KYSIL, E. V. et al. **Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests**. *Zebrafish*, 2017.

LAGISZ, M. et al. Optimism, pessimism and judgement bias in animals: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 118, p. 3–17, 1 nov. 2020.

- LALOT, M. et al. You know what? I'm happy. Cognitive bias is not related to personality but is induced by pair-housing in canaries (*Serinus canaria*). **Behavioural Processes**, v. 134, p. 70–77, jan. 2017a.
- LALOT, M. et al. You know what? I'm happy. Cognitive bias is not related to personality but is induced by pair-housing in canaries (*Serinus canaria*). **Behavioural Processes**, v. 134, p. 70–77, 1 jan. 2017b.
- LAMBERT, H.; CARDER, G. Positive and negative emotions in dairy cows: Can ear postures be used as a measure? **Behavioural Processes**, 2019.
- LAMPE, J. F. et al. Context-dependent individual differences in playfulness in male rats. **Developmental Psychobiology**, v. 59, n. 4, p. 460–472, maio 2017.
- LAUBU, C.; LOUÂPRE, P.; DECHAUME-MONCHARMONT, F. X. Pair-bonding influences affective state in a monogamous fish species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1904, 12 jun. 2019.
- LAWRENCE, C.; EBERSOLE, J. P.; KESSELI, R. V. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Biology of Fishes** **2007 81:2**, v. 81, n. 2, p. 239–246, 24 jan. 2007.
- LAWRENCE, C.; EISEN, J. S.; VARGA, Z. M. Husbandry and Health Program Survey Synopsis. <https://home.liebertpub.com/zeb>, v. 13, p. S5–S7, 28 jun. 2016.
- LECORPS, B.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. G. Pessimism and fearfulness in dairy calves. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1421, 23 dez. 2018.
- LEE, C. J.; PAULL, G. C.; TYLER, C. R. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 94, n. 1, p. jfb.13865, 10 dez. 2018.
- LIDSTER, K. et al. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. **Journal of Fish Biology**, v. 90, n. 5, p. 1891–1905, 1 maio 2017.
- LIEGGI, C. et al. The Influence of Behavioral, Social, and Environmental Factors on Reproducibility and Replicability in Aquatic Animal Models. **ILAR Journal**, v. 60, n. 2, p. 270, 2019.
- LIEW, W. C. et al. Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34397, 10 abr. 2012.
- LINDSEY, B. W.; TROPEPE, V. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. **Developmental Neurobiology**, v. 74, n. 11, p. 1053–1077, 1 nov. 2014.
- LIU, H. et al. Biological and Psychological Perspectives of Resilience: Is It Possible to Improve Stress Resistance? **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 0, p. 326, 21 ago. 2018.
- LUCON-XICCATO, T.; BISAZZA, A. Individual differences in cognition among teleost fishes. **Behavioural Processes**, v. 141, p. 184–195, 1 ago. 2017.

- LUZIO, A. et al. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 22–35, 1 maio 2016.
- MACLEOD, A. K.; BYRNE, A. Anxiety, depression, and the anticipation of future positive and negative experiences. **Journal of Abnormal Psychology**, 1996.
- MAGALHÃES, R. et al. Biomarkers of resilience and susceptibility in rodent models of stress. Em: **Stress Resilience: Molecular and Behavioral Aspects**. [s.l: s.n.].
- MAKOWSKA, I. J.; WEARY, D. M. **Assessing the emotions of laboratory rats**. **Applied Animal Behaviour Science**, 2013.
- MANUEL, R. et al. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: Stronger effects in the resting phase than in the active phase. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 21, p. 3919–3928, 1 nov. 2014.
- MANUEL, R. et al. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio hamilton*). **Zebrafish**, 2015a.
- MANUEL, R. et al. The Effects of Environmental Enrichment and Age-Related Differences on Inhibitory Avoidance in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 152–165, abr. 2015b.
- MANUEL, R. et al. Providing a food reward reduces inhibitory avoidance learning in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 120, p. 69–72, nov. 2015c.
- MARCHANT, J. N. et al. The effect of agonistic interactions on the heart rate of group-housed sows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 46, n. 1–2, p. 49–56, 1995.
- MARCHANT-FORDE, J. N. The science of animal behavior and welfare: Challenges, opportunities, and global perspective. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, p. 16, 2015.
- MARCON, M. et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb176735, 15 fev. 2018a.
- MARCON, M. et al. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. **PeerJ**, v. 6, p. e5136, 5 jul. 2018b.
- MATHESON, S. M.; ASHER, L.; BATESON, M. Larger, enriched cages are associated with “optimistic” response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). **Applied Animal Behaviour Science**, 2008.
- MATHEWS, A. Autobiographical memory and clinical anxiety. **Cognition and Emotion**, 1992.
- MATHEWS, A. Cognitive Approaches to Emotion and Emotional Disorders. **Annual Review of Psychology**, 1994.
- MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.
- MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, 2010b.

- MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, n. 10–12, p. 1099–1123, 1 jan. 2012.
- MAXIMINO, C. et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain and Behavior**, 2013.
- MELLOR, D. J. Positive animal welfare states and reference standards for welfare assessment. **New Zealand Veterinary Journal**, 2015.
- MENDL, M. et al. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. **Applied Animal Behaviour Science**, 2009.
- MENDL, M.; BURMAN, O. H. P.; PAUL, E. S. An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1696, p. 2895–2904, 2010.
- MENDL, M.; PAUL, E. S. Animal affect and decision-making. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 112, p. 144–163, 1 maio 2020.
- MESQUITA, F. O.; BORCATO, F. L.; HUNTINGFORD, F. A. Cue-based and algorithmic learning in common carp: A possible link to stress coping style. **Behavioural processes**, v. 115, p. 25–29, 1 jun. 2015.
- MEYER, B. M. et al. Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 2013.
- MILLER, T. H. et al. Social status–dependent shift in neural circuit activation affects decision making. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 2137–2148, 22 fev. 2017.
- MILLOT, S. et al. Behavioural Stress Responses Predict Environmental Perception in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108800, 29 set. 2014.
- MINEKA, S.; OEHLBERG, K. The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. **Acta Psychologica**, 2008.
- MOGG, K. et al. Effects of threat cues on attentional shifting, disengagement and response slowing in anxious individuals. **Behaviour Research and Therapy**, 2008.
- MOHER, D. et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, jul. 2009.
- MUSTAFA, A.; ROMAN, E.; WINBERG, S. Boldness in Male and Female Zebrafish (*Danio rerio*) Is Dependent on Strain and Test. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2019.
- NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates Näslund, J., & Johnson, J. I. (2016). Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 1, p. 1–30, mar. 2016a.
- NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 1, p. 1–30, mar. 2016b.

NEVILLE, V. et al. **Pharmacological manipulations of judgement bias: A systematic review and meta-analysis.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2020.

NGUYEN, H. A. T.; GUO, C.; HOMBERG, J. R. **Cognitive Bias Under Adverse and Rewarding Conditions: A Systematic Review of Rodent Studies.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2020.

NOVAK, J. et al. An exploration based cognitive bias test for mice: Effects of handling method and stereotypic behaviour. *PLoS ONE*, 2015.

NOWORYTA, K. et al. Neuromolecular Underpinnings of Negative Cognitive Bias in Depression. *Cells* **2021, Vol. 10, Page 3157**, v. 10, n. 11, p. 3157, 13 nov. 2021.

NYGREN, T. E. et al. The influence of positive affect on the decision rule in risk situations: Focus on outcome (and especially avoidance of loss) rather than probability. **Organizational Behavior and Human Decision Processes**, 1996.

OHL, F.; PUTMAN, R. J. Animal Welfare Considerations: Should Context Matter? **undefined**, 2014.

OSWALD, M. E. et al. Is Behavioral Variation along the Bold-Shy Continuum Associated with Variation in the Stress Axis in Zebrafish? **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, n. 6, p. 718–728, nov. 2012.

PAGNUSSAT, N. et al. One for all and all for one: The importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. **Zebrafish**, 2013.

PARKER, M. O. et al. Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. e34992, 11 abr. 2012a.

PARKER, M. O. et al. Discrimination reversal and attentional sets in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 264–268, 15 jun. 2012b.

PAUL, E. S. et al. **Towards a comparative science of emotion: Affect and consciousness in humans and animals.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2020.

PAUL, E. S.; HARDING, E. J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 3, p. 469–491, 2005.

PAUL, E. S.; MENDEL, M. T. Animal emotion: Descriptive and prescriptive definitions and their implications for a comparative perspective. **Applied animal behaviour science**, v. 205, p. 202–209, 1 ago. 2018.

PAVLIDIS, M. et al. Husbandry of Zebrafish, *Danio Rerio*, and the Cortisol Stress Response. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 524–531, dez. 2013.

PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 60, p. 121–131, jul. 2015.

PIATO, A. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, 2011a.

- PIATO, A. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2011b.
- PROCTOR, H.; CARDER, G. Can changes in nasal temperature be used as an indicator of emotional state in cows? **Applied Animal Behaviour Science**, 2016.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Can ear postures reliably measure the positive emotional state of cows? **Applied Animal Behaviour Science**, 2014.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Measuring positive emotions in cows: Do visible eye whites tell us anything? **Physiology and Behavior**, 2015a.
- PROCTOR, H. S.; CARDER, G. Nasal temperatures in dairy cows are influenced by positive emotional state. **Physiology and Behavior**, 2015b.
- RABBANE, M. G. et al. Effects of stocking density on growth of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). **Bangladesh Journal of Zoology**, 2017.
- RAMBO, C. L. et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH**, v. 171, p. 50–54, 15 mar. 2017.
- RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57, 1997.
- RAMSAY, J. M. et al. Husbandry stress exacerbates mycobacterial infections in adult zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 931–941, nov. 2009.
- RAOULT, C. M. C.; MOSER, J.; GYGAX, L. Mood as cumulative expectation mismatch: A test of theory based on data from non-verbal cognitive bias tests. **Frontiers in Psychology**, 2017.
- RAOULT, V. et al. Stress profile influences learning approach in a marine fish. **PeerJ**, v. 5, p. e3445, 8 jun. 2017.
- REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 85–92, jan. 2018.
- RIBAS, L. et al. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. E941–E950, 7 fev. 2017a.
- RIBAS, L. et al. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 6, p. 1056–1064, 15 mar. 2017b.
- RICE, A. S. C. et al. Sensory profiling in animal models of neuropathic pain: a call for back-translation. **Pain**, v. 159, n. 5, p. 819–824, 2018.
- RICHTER, S. H. et al. A glass full of optimism: Enrichment effects on cognitive bias in a rat model of depression. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, 2012.

- ROBERTSON, C. E. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1786, 21 maio 2014.
- ROBINSON, O. J. et al. The effect of induced anxiety on cognition: Threat of shock enhances aversive processing in healthy individuals. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 217–227, 12 jun. 2011.
- ROCHE, D. G.; CAREAU, V.; BINNING, S. A. **Demystifying animal “personality” (or not): Why individual variation matters to experimental biologists**. **Journal of Experimental Biology** Company of Biologists Ltd, , 15 dez. 2016.
- ROELOFS, S. et al. **Making decisions under ambiguity: Judgment bias tasks for assessing emotional state in animals**. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2016.
- ROMÁN, A.-C. et al. Histone H4 acetylation regulates behavioral inter-individual variability in zebrafish. **Genome Biology** **2018 19:1**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 25 abr. 2018.
- ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, 2011.
- ROSS, M. et al. Welfare-improving enrichments greatly reduce hens’ startle responses, despite little change in judgment bias. **Scientific Reports**, 2019.
- ROY, T.; BHAT, A. Learning and Memory in Juvenile Zebrafish: What makes the Difference - Population or Rearing Environment? **Ethology**, v. 122, n. 4, p. 308–318, 1 abr. 2016.
- ROY, T.; BHAT, A. Population, sex and body size: Determinants of behavioural variations and behavioural correlations among wild zebrafish *Danio rerio*. **Royal Society Open Science**, 2018a.
- ROY, T.; BHAT, A. Repeatability in boldness and aggression among wild zebrafish (*Danio rerio*) from two differing predation and flow regimes. **Journal of Comparative Psychology**, 2018b.
- ROY, T.; SHUKLA, R.; BHAT, A. Risk-Taking During Feeding: Between- and Within-Population Variation and Repeatability Across Contexts Among Wild Zebrafish. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 393–403, out. 2017.
- RUSHEN, J. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, 1991.
- RUSSELL, J. A. Core affect and the psychological construction of emotion. **Psychological review**, v. 110, n. 1, p. 145, 2003.
- SANCHES, E. **Avaliação das Dimensões de Personalidade em *Danio rerio***. Master Thesis—[s.l.] Universidade Federal do Pará, 2018.
- SANTACÀ, M. et al. Stimulus characteristics, learning bias and visual discrimination in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, v. 192, 2021.
- SANTARELLI, S. et al. Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. **European Neuropsychopharmacology**, 2014.

- SANTOS, D.; LUZIO, A.; COIMBRA, A. M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 141–163, 1 out. 2017.
- SCHROEDER, P. et al. What do zebrafish want? Impact of social grouping dominance and gender on preference for enrichment. **Laboratory Animals**, v. 48, n. 4, p. 328–337, 17 out. 2014.
- SCHWARZ, N. **Emotion, cognition, and decision making**. **Cognition and Emotion**, 2000.
- SERT, N. P. DU et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000410, 1 jul. 2020.
- SHAMS, S. et al. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, 2017.
- SHAMS, S. et al. Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. **Developmental Psychobiology**, v. 60, n. 1, p. 43–56, jan. 2018.
- SHAMS, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 283–287, out. 2015.
- SIMPSON, J.; KELLY, J. P. **The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects**. **Behavioural Brain Research**, 2011.
- SINGHAL, G. et al. **Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment**. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2014.
- SMAIL, M. A. et al. **Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits**. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** Elsevier Inc., , 1 out. 2020. . Acesso em: 7 abr. 2021
- SMITH, A. J. et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. **Laboratory Animals**, v. 52, n. 2, p. 135–141, 1 abr. 2018.
- SOARES, S. M. et al. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according to controlled housing conditions. **Physiology & Behavior**, v. 222, p. 112944, 1 ago. 2020.
- SONG, C. et al. Building neurophenomics in zebrafish: Effects of prior testing stress and test batteries. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 24–30, set. 2016.
- SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384–394, 2 fev. 2018.
- SPENCE, R.; MAGURRAN, A. E.; SMITH, C. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. **Animal Cognition**, v. 14, n. 4, p. 607–612, 1 jul. 2011.
- STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231, 2002.

- STEPHENSON, E.; HASKELL, M. J. The Use of a “Go/Go” Cognitive Bias Task and Response to a Novel Object to Assess the Effect of Housing Enrichment in Sheep (*Ovis aries*). **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 25, n. 1, p. 62–74, 2022.
- STEVENS, C. H.; REED, B. T.; HAWKINS, P. Enrichment for Laboratory Zebrafish—A Review of the Evidence and the Challenges. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 698, 5 mar. 2021.
- STEWART, A. et al. **Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review**. *Neuropharmacology*. **Anais...**2012.
- STEWART, A. M. et al. Constructing the habituome for phenotype-driven zebrafish research. **Behavioural Brain Research**, 2013.
- STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 1 maio 2014.
- STEWART, A. M. et al. Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity. **Zebrafish**, v. 12, n. 5, p. 339–348, out. 2015.
- SULLIVAN, M.; LAWRENCE, C.; BLACHE, D. Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment Sullivan, M., Lawrence, C., & Blache, D. (2016). Why did the fish cross the tank? Objectively measuring the value of enrichment for captive fish. *Applied Animal Behaviour Science*,. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 174, p. 181–188, jan. 2016.
- SURIYAMPOLA, P. S. et al. Water flow impacts group behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioral Ecology**, v. 28, n. 1, p. arw138, 2016a.
- SURIYAMPOLA, P. S. et al. Zebrafish Social Behavior in the Wild. **Zebrafish**, 2016b.
- SZPUNAR, K. K.; SCHACTER, D. L. Get real: Effects of repeated simulation and emotion on the perceived plausibility of future experiences. **Journal of Experimental Psychology: General**, 2013.
- TELES, M. C.; OLIVEIRA, R. F. Androgen response to social competition in a shoaling fish. **Hormones and behavior**, v. 78, p. 8–12, fev. 2016.
- THÖRNQVIST, P. O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 927–934, 1 fev. 2019a.
- THÖRNQVIST, P.-O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural brain research**, v. 359, p. 927–934, 1 fev. 2019b.
- TOMS, C. N.; ECHEVARRIA, D. J. Back to basics: Searching for a comprehensive framework for exploring individual differences in zebrafish (*Danio Rerio*) behavior. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 325–340, 28 jul. 2014.
- TONI, M. et al. Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. **animal** Toni, M., Manciooco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C., & Malavasi, S. (2019). **Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a**

focus on European directives. **Animal**, 13(1), 161–170.

<https://doi.org/10.1017/S1751731118000940>, v. 13, n. 1, p. 161–170, 2 jan. 2019a.

TONI, M. et al. Environmental temperature variation affects brain protein expression and cognitive abilities in adult zebrafish (*Danio rerio*): A proteomic and behavioural study.

**Journal of Proteomics**, v. 204, 30 jul. 2019b.

TRAN, S. et al. Neurochemical factors underlying individual differences in locomotor activity and anxiety-like behavioral responses in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 65, p. 25–33, 4 fev. 2016.

TRAN, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, 2014.

TRAN, S.; GERLAI, R. Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2013.

TUDORACHE, C. et al. Biological clock function is linked to proactive and reactive personality types. **BMC Biology**, v. 16, n. 1, p. 148, 21 dez. 2018.

TUDORACHE, C.; SCHAAF, M. J. M. M.; SLABBEKOORN, H. Covariation between behaviour and physiology indicators of coping style in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 3, p. 251–258, dez. 2013.

UTNE-PALM, A. C.; SMITH, A. Fish as Laboratory Animals. Em: [s.l: s.n.]. p. 375–400.

VIGNET, C. et al. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, 2013.

VITAL, C.; MARTINS, E. P. Socially-Central Zebrafish Influence Group Behavior More than Those on the Social Periphery. **PLoS ONE**, 2013.

VOLGIN, A. D. et al. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 425–432, out. 2018a.

VOLGIN, A. D. et al. Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 425–432, 1 out. 2018b.

VOLGIN, A. D. et al. **Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions.** **Journal of Neuroscience Research**, 2019.

VON KROGH, K. et al. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 1, p. 32–39, ago. 2010.

WAFER, L. N. et al. Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 291–294, 2016.

WEARY, D. M.; ROBBINS, J. A. Understanding the multiple conceptions of animal welfare. **Animal Welfare**, v. 28, n. 1, p. 33–40, 1 fev. 2019.

- WEBER, D. N.; GHORAI, J. K. Experimental Design Affects Social Behavior Outcomes in Adult Zebrafish Developmentally Exposed to Lead. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 294–302, set. 2013.
- WHITE, L. J. et al. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, v. 132, p. 189–199, out. 2017.
- WICHMAN, A.; KEELING, L. J.; FORKMAN, B. Cognitive bias and anticipatory behaviour of laying hens housed in basic and enriched pens. **Applied Animal Behaviour Science**, 2012.
- WILKES, L. et al. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 139, n. 1–2, p. 143–150, jun. 2012.
- WOLFER, D. P. et al. Cage enrichment and mouse behaviour. **Nature** 2004 **432:7019**, v. 432, n. 7019, p. 821–822, 15 dez. 2004.
- WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2010.
- WONG, R. Y. et al. Comparing behavioral responses across multiple assays of stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behaviour**, 2012.
- WONG, R. Y.; FRENCH, J.; RUSS, J. B. Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles. **Royal Society Open Science**, 2019.
- WOODWARD, M. A.; WINDER, L. A.; WATT, P. J. Enrichment increases aggression in zebrafish. **Fishes**, 2019.
- YUAN, M. et al. Behavioral and Metabolic Phenotype Indicate Personality in Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Physiology**, v. 0, n. MAY, p. 653, 30 maio 2018.
- ZABEGALOV, K. N. et al. Understanding zebrafish aggressive behavior. **Behavioural processes**, v. 158, p. 200–210, 1 jan. 2018.
- ZÁVORKA, L. et al. Effects of Familiarity and Population Density on Competitive Interactions and Growth: An Experimental Study on a Territorial Salmonid Fish. **Ethology**, v. 121, n. 12, p. 1202–1211, 1 dez. 2015.
- ZHANG, Z. et al. A Comparative Study on Two Territorial Fishes: The Influence of Physical Enrichment on Aggressive Behavior. **Animals** 2021, **Vol. 11, Page 1868**, v. 11, n. 7, p. 1868, 23 jun. 2021.
- ZIDAR, J. et al. Environmental complexity buffers against stress-induced negative judgement bias in female chickens. **Scientific Reports**, 2018.

**ANEXOS**

## ANEXO A

## Anexo A - Aceptación de la revista: Revisiones de Neurociencia y Bioconducta

Neuroscience and Biobehavioral Reviews 131 (2021) 765–791



Contents lists available at ScienceDirect

## Neuroscience and Biobehavioral Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neubiorev](http://www.elsevier.com/locate/neubiorev)

## Review article

## 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

Jhon Buenhombre<sup>a,\*</sup>, Erika Alexandra Daza-Cardona<sup>b</sup>, Pêssi Sousa<sup>a</sup>, Amauri Gouveia Jr.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ICB Biological Sciences, Federal University of Pará, Rua Augusto Correa 01, Belém, PA, Brazil

<sup>b</sup> Health Sciences, Federal University of Ceará, Av. Comandante Maurocílio Rocha Pontes, 100, Sobral, CE, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Stress resilience  
Zebrafish  
Environmental enrichment  
Strain  
Sex  
Personality  
Neurophysiology  
Behaviour

## ABSTRACT

Antagonist and long-lasting environmental manipulations (EM) have successfully induced or reduced the stress responses and quality of life of zebrafish. For instance, environmental enrichment (EE) generally reduces anxiety-related behaviours and improves immunity, while unpredictable chronic stress (UCS) and aquarium-related stressors generate the opposite effects. However, there is an absence of consistency in outcomes for some EM, such as acute exposure to stressors, social enrichment and some items of structural enrichment. Therefore, considering intraspecies variation (sex, personality, and strain), increasing intervention complexity while improving standardisation of protocols and contemplating the possibility that EE may act as a mild stressor on a spectrum between too much (UCS) and too little (standard conditions) stress intensity or stimulation, would reduce the inconsistencies of these outcomes. It would also help explore the mechanism behind stress resilience and to standardise EM protocols. Thus, this review critically analyses and compares knowledge existing over the last decade concerning environmental manipulations for zebrafish and the influences that sex, strain, and personality may have on behavioural, physiological, and fitness-related responses.

## 1. Introduction

Stress and quality of life are significant concerns among researchers interested in preclinical models of stress-related mental disorders (Crofton et al., 2015; Demin et al., 2020b; Santarelli et al., 2014) and animal welfare (Colditz and Hine, 2016). In general, stress resilience and good quality of life are two related terms, associated with maintaining normal physiological and behavioural parameters of stress or rapid return to baseline after a challenge (DePasquale et al., 2016). Consequently, they are also associated with an increment in health and biological fitness due to a better adaptation to subsequent stressors (Colditz and Hine, 2016).

Moreover, the interaction of genetic and environmental factors strongly influences these and other related biological traits such as physiology, behaviour, health, and fitness in zebrafish (*Danio rerio*) (Song et al., 2016; Volgin et al., 2019). Likewise, personality (consistency in behaviour and physiology across time and context) (Toms and Echevarria, 2014) shapes the biological responses of zebrafish. And in turn, it influences and is influenced by environmental and genetic

interactions (Demin et al., 2019; Toms and Echevarria, 2014). Thus, considering individual differences (sex and personality), strain and environmental factors altogether, it is crucial to improve our understanding of stress resilience and quality of life in zebrafish.

The impact of multiple genetic and environmental factors and individual differences on behavioural and physiological phenotypes of stress has been widely studied in various animal models, particularly in rodents (e.g. Magalhães et al., 2019; Song et al., 2016). However, a broader spectrum of animals studied could advance the translational relevance of stress models by providing key overlapping features and biological function mechanisms conserved across species (Gerlai, 2020). Thus, zebrafish could be a promising complementary preclinical model that would offer many overlying stress convergences and differences. For instance, in parallel with its complex behaviour, the endocrine response of zebrafish makes it particularly useful for translational stress research because of its similarities with humans, such as employing cortisol rather than corticosterone as rodents do (Egan et al., 2009). It has also become a popular model in several fields due to its multiple research advantages (Kalueff et al., 2014).

\* Corresponding author.

E-mail address: [jhonjbv@gmail.com](mailto:jhonjbv@gmail.com) (J. Buenhombre).

ANEXO B.

Anexo B - Sometimiento a la revista Cognición Animal

**Animal Cognition**  
**Structural Environmental Enrichment and the Way It Is Offered Influence Cognitive  
 Judgement Bias and Anxiety-Like Behaviours in Zebrafish.**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ANCO-D-22-00014R1
<b>Full Title:</b>	Structural Environmental Enrichment and the Way It Is Offered Influence Cognitive Judgement Bias and Anxiety-Like Behaviours in Zebrafish.
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	Jhon Jairo Buenhombre, Msc Universidade Federal do Pará Belem, PA BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Pará
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Jhon Jairo Buenhombre, Msc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Jhon Jairo Buenhombre, Msc Erika Alexandra Daza-Cardona Péssi Sousa Amauri Gouveia Jr Maria Nelly Cajiao-Pachón
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	Environmental enrichment in zebrafish generally reduces anxiety-related behaviours , improves learning in maze trials and increases health and biological fitness. However, certain types of enrichment or certain conditions induce the opposite effects. Therefore, it is essential to study the characteristics of environmental enrichment that modulate these effects. This study aims to investigate if structural environmental enrichment and the way it is offered influence cognitive judgement bias and anxiety-like behaviours in adult zebrafish. The fish were assigned to six housing manipulations: constant barren, constant enrichment, gradual gain of enrichment, gradual loss of enrichment, sudden gain of enrichment and sudden loss of enrichment. We then transposed the cognitive judgment bias paradigm, formerly used in studies on other animals to measure the link between emotion and cognition, to objectively assess the impact of these manipulations on the zebrafish's interpretation of ambiguous stimuli, considering previous experiences and related emotional states. We used two battery tests (light/dark and activity tests), which measured anxiety-related behaviours to check if these tests covariate with cognitive bias results. The fish with a sudden gain in enrichment showed a pessimistic bias (interpreted ambiguous stimuli as negative). Also, the fish that experienced a sudden gain and a gradual loss in enrichment showed more anxiety-like behaviours than the fish that experienced constant conditions or a gradual gain in enrichment. The data provide some proof that structural environmental enrichment and the way it is presented can alter zebrafish's cognitive bias and anxiety-like behaviours.
<b>Response to Reviewers:</b>	Dear Editor We are grateful for all the constructive feedback from yourself and the reviewers. We acknowledge the common remarks regarding the reviewers' comments about a more cautious discussion, improving general document structure and English redaction. We have made substantial revisions regarding these and other points the reviewers

ANEXO C.

Anexo C - Parecer del comité de ética para la investigación.



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Paulistinha (Danio rerio) como modelo comportamental e fisiológico para o estudo das emoções e o humor nos animais. ", protocolada sob o CEUA nº 9868261118 (ID 001070), sob a responsabilidade de **Mauro Gouveia Júnior e equipe; Jhon Jairo Buenhombre** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 07/02/2019.

We certify that the proposal "Zebrafish (Danio rerio) as a behavioural and physiological model for investigating animal's emotions and mood. ", utilizing 128 Fishes (males and females), protocol number CEUA 9868261118 (ID 001070), under the responsibility of **Mauro Gouveia Júnior and team; Jhon Jairo Buenhombre** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 02/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [12/2019](#)

Área: [Teoria E Pesquisa do Comportamento](#)

Origem: [Não se aplica](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 3 meses](#)

N: [128](#)

Linhagem: [Danio rerio](#)

Peso: [5 a 7 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Neurociências e Comportamento (LabNec), localizado no Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento (NTPC).

Belém, 12 de fevereiro de 2019

Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Vanessa Joia de Mello  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

## ANEXO D.

**Anexo D** -Datos suplementarios.

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA PARA TEST DE MEMORIA				
	Memoria 4 Días Verde	Ultimo entrenamiento verde	Memoria 4 Días Verde	Ultimo entrenamiento rojo
N	27	27	27	27
Mínimo	66,67	64	0	0
25% Percentil	81,67	81	10	9
Mediana	85,86	86	13,33	14
75% Percentil	90	90	16,67	19
Máximo	99	100	30	36
Rango	32,33	36	30	36
Promedio	85,44	84,54	13,14	14,94
Desviación Estándar	7,823	8,198	7,101	8,72
Error del promedio	1,506	1,578	1,367	1,678

**Test Estadístico**

	Último verde - Memoria verde
Z	-,168 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,866

**Test Estadístico**

	Último rojo - Memoria rojo
Z	-,481 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,631

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA PARA TEST DE MEMORIA Y AMBIGÜEDAD				
	Memoria Verde Puro	Memoria Verde-amarillo	Memoria Rojo Puro	Memoria Rojo- amarillo
N	27	27	27	27
Mínimo	66,67	5,43	0	6,45
25% Percentil	81,67	26,45	10	17,55
Mediana	85,86	30,43	13,33	20,56
75% Percentil	90	34,69	16,67	24,03
Máximo	99	48,26	30	32,27
Rango	32,33	42,83	30	25,82
Promedio	85,44	30,49	13,14	20,22
Desviación Estándar	7,823	8,32	7,101	6,032
Error del promedio	1,506	1,601	1,367	1,161

**Test Estadístico**

	Memoria Verde	Memoria Rojo
--	------------------	--------------

Mann-Whitney U	0	156
Wilcoxon W	378	534
Z	-6,307	-3,607
Asymp. Sig. (2-tailed)	0	0

ESTADISTICA DESCRIPTIVA DURACIÓN		
	ENRIQUECIMIENTO	ESTERIL
N	12	12
Mínimo	51,45	58,2
25% Percentil	66,86	66,65
Mediana	68,68	71,23
75% Percentil	72,85	75,44
Máximo	76,07	77,98
Rango	24,62	19,79
Promedio	67,27	70,69
Desviación Estándar	7,562	5,729
Error del promedio	2,183	1,654

DURATION  
Test Estadístico

N	67
Chi-Square	71,125
df	11
Asymp. Sig.	0

a. Friedman Test

ESTADISTICA DESCRIPTIVA LATENCIA		
	ENRIQUECIMIENTO	ESTERIL
N	12	12
Mínimo	0,9982	0,8982
25% Percentil	1,262	1,684
Mediana	1,8	2,618
75% Percentil	4,985	7,373
Máximo	10,76	13,35
Rango	9,761	12,45
Promedio	3,1	4,608
Desviación Estándar	2,923	3,81
Error del promedio	0,8437	1,1

LATENCIA  
Test Estadístico

N	68
Chi-Square	165,583
df	11
Asymp. Sig.	0

a. Friedman Test

ESTADISTICA DESCRIPTIVA SESGO COGNITIVO						
	Ganancia súbita	Perdida súbita	Constante EE	Constante Esteril	Ganancia gradual	Perdida gradual
N	12	12	12	12	10	10
Mínimo	9,68	12,32	12,3	28,61	26,43	12,79
25% Percentil	17,07	29,13	29,09	37,06	27,04	18,68
Mediana	24,43	34,77	35,18	40,22	31,91	34,59
75% Percentil	29,08	39,89	39,79	42,97	37,07	44,11
Máximo	50,63	48,85	42,09	60	40,85	45,13
Rango	40,95	36,53	29,79	31,39	14,42	32,34
Promedio	24,52	33,89	33	40,31	32,62	31,37

Desviación Estándar	10,69	9,497	8,631	8,091	5,208	12,27
Error del promedio	3,085	2,742	2,491	2,336	1,647	3,879

## ANOVA SESGO COGNITIVO

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
VERDE AMARILLO MEDIO	Entre grupos	118,659	5	23,732	0,653	0,660
	Dentro de grupos	2253,353	62	36,344		
	Total	2372,012	67			
VERDE AMARILLO ESQUINA	Entre grupos	993,185	5	198,637	3,033	0,016
	Dentro de grupos	4061,058	62	65,501		
	Total	5054,242	67			
ROJO AMARILLO MEDIO	Entre grupos	407,539	5	81,508	2,928	0,019
	Dentro de grupos	1725,926	62	27,838		
	Total	2133,465	67			
ROJO AMARILLO ESQUINA	Entre grupos	541,538	5	108,308	1,914	0,105
	Dentro de grupos	3508,193	62	56,584		
	Total	4049,731	67			
VERDE AMARILLO	Entre grupos	1532,798	5	306,560	3,528	0,007
	Dentro de grupos	5387,140	62	86,889		
	Total	6919,938	67			
ROJO AMARILLO	Entre grupos	1532,798	5	306,560	3,528	0,007
	Dentro de grupos	5387,140	62	86,889		
	Total	6919,938	67			

## ESTADISTICA DESCRIPTIVA CLARO/OSCURO

	Ganancia súbita	Perdida súbita	Constante EE	Constante Esteril	Ganancia gradual	Perdida gradual
N	12	12	12	12	10	10
Mínimo	0	0,02	0,13	0,1	0,1	0,01
25% Percentil	0,0575	0,12	0,1875	0,1875	0,2025	0,0525
Mediana	0,125	0,185	0,32	0,26	0,3	0,19
75% Percentil	0,1625	0,2775	0,4875	0,3075	0,3525	0,2825
Máximo	0,43	0,76	0,6	0,32	0,41	0,34
Rango	0,43	0,74	0,47	0,22	0,31	0,33
Promedio	0,1333	0,2333	0,3408	0,2425	0,277	0,172

Desviación Estándar	0,1078	0,1927	0,1633	0,072	0,1053	0,1198
Error del promedio	0,03112	0,05564	0,04714	0,02078	0,0333	0,03788

## ANOVA CLARO/OSCURO

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CLARO	Entre grupos	257943,038	5	51588,608	3,535	0,007
	Dentro de grupos	904789,411	62	14593,378		
	Total	1162732,449	67			
OSCURO	Entre grupos	257695,156	5	51539,031	3,538	0,007
	Dentro de grupos	903240,184	62	14568,390		
	Total	1160935,340	67			
LATENCIA CLARO	Entre grupos	168238,834	5	33647,767	2,055	0,083
	Dentro de grupos	1015295,766	62	16375,738		
	Total	1183534,600	67			
LATENCIA OSCURO	Entre grupos	3238,410	5	647,682	1,215	0,313
	Dentro de grupos	33047,916	62	533,031		
	Total	36286,326	67			
PERCWHITE	Entre grupos	0,318	5	0,064	3,529	0,007
	Dentro de grupos	1,118	62	0,018		
	Total	1,437	67			
PERCBLACK	Entre grupos	0,318	5	0,064	3,531	0,007
	Dentro de grupos	1,117	62	0,018		
	Total	1,435	67			

## ESTADISTICA DESCRIPTIVA PRUEBA ACTIVIDAD

	Sudden gain of EE	Sudden loss of EE	Constant EE	Constant Barren	Gradual gain of EE	Gradual loss of EE
N	12	12	12	12	10	10
Mínimo	0	0	0	0	0	0
25% Percentil	0	1,083	0	0	0	74,08
Mediana	5,34	60,81	0	3,92	191,8	141,9
75% Percentil	22,11	602,1	4,008	107,5	536,5	181,1
Máximo	97,6	790,1	231	665	850,9	279,6
Rango	97,6	790,1	231	665	850,9	279,6
Promedio	17,37	231,7	20,31	92,65	275,3	132,2

Desviación Estándar	29,52	324	66,39	193,1	301,1	79,55
Error del promedio	8,521	93,52	19,17	55,76	95,2	25,16

PRUEBA DE ACTIVIDAD

**Test Estadístico**

	ACTIVIDAD
Chi-Square	16,307
df	5
Asymp. Sig.	0,006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:  
GROUP