



**universidad  
de león**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

# **EL EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL SOBRE LOS NIVELES DE ESTRÉS EN PECES.**

## **EFFECT OF ENVIROMENTAL ENRICHMENT ON FISH STRESS LEVELS**

**Autora: Miriam Vázquez Antón**

**Tutora: Marta Fernández Riesco**

**Cotutora: Vanesa Robles Rodríguez**

**Grado en Biología**

**Julio 2022**

# ÍNDICE

**RESUMEN**

**PALABRAS CLAVE**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. 1 El pez cebra como animal modelo .....</b>	<b>4</b>
<b>1. 2 Enriquecimiento animal en peces .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Enriquecimiento social .....	6
1.2.2 Enriquecimiento nutricional.....	8
1.2.3 Enriquecimiento ocupacional.....	9
1.2.4 Enriquecimiento sensorial .....	10
1.2.5 Enriquecimiento físico.....	10
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. 1. Declaración de Ética .....</b>	<b>12</b>
<b>3. 2 Mantenimiento y cuidado de los animales.....</b>	<b>12</b>
<b>3. 3 Tipo de enriquecimiento ambiental .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Ensayo en nuevo tanque o “Novel tank assay” .....</b>	<b>13</b>
<b>3. 5 Análisis estadístico .....</b>	<b>14</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>23</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>

## **RESUMEN**

La creciente preocupación actual por el bienestar animal en el campo de la investigación y en la industria piscícola ha permitido el desarrollo de estrategias de enriquecimiento ambiental. El objetivo de su utilización es la creación de entornos en cautiverio adecuados e interactivos que garanticen un estado de bienestar general y eviten los estados de estrés.

En el presente estudio se analizó el efecto de un enriquecimiento gradual hacia uno de los extremos del tanque de estabulación sobre la conducta del pez cebra. El enriquecimiento incluyó plantas artificiales y una imagen que asemejaba el sustrato natural. Para la evaluación del comportamiento se utilizó el "Novel Tank Test" (NTT). Los resultados mostraron que la introducción de estructuras de enriquecimiento ambiental altera significativamente la preferencia de nado, mostrando una preferencia por aquel extremo del tanque enriquecido frente al extremo que no presenta enriquecimiento alguno.

## **PALABRAS CLAVE**

Bienestar animal, enriquecimiento ambiental, estrés, pez cebra, prueba "Novel Tank Test" (NTT).

## **ABSTRACT**

Animal welfare is a growing concern in our society. Current environmental enrichment strategies used in scientific research and in the fish farming industry seek to create suitable and interactive environments for animals that avoid stress and guarantee a state of general well-being.

In the present study, the effect of a gradual enrichment towards one of the ends of the housing tank on zebrafish behavior was analyzed using the "Novel Tank Test" (NTT). Results demonstrated that the introduction of artificial plants and images mimicking the natural substrate, modified swimming pattern and fish showed a preference for the enriched end of the tank.

## **KEYWORDS**

Animal welfare, environmental enrichment, Novel Tank Test (NTT), stress, zebrafish.

## INTRODUCCIÓN

El bienestar animal es una de las principales preocupaciones para aquellas personas y empresas cuyo trabajo se basa en la experimentación y en la producción animal. Esta inquietud ha favorecido al desarrollo de un punto de vista más ético intentando dejar atrás entornos diseñados desde una perspectiva humana y basada en requisitos económicos (Ashley, 2007). Este hecho hace que se apueste por entornos que intentan satisfacer las necesidades animales durante el alojamiento en cautiverio. Hace tiempo que esta tendencia se lleva observando en mamíferos, donde se ha visto que el enriquecimiento ha reducido el miedo y la agresividad en animales de zoológicos o animales de granja de la industria alimenticia (Rodnick & Planas, 2016).

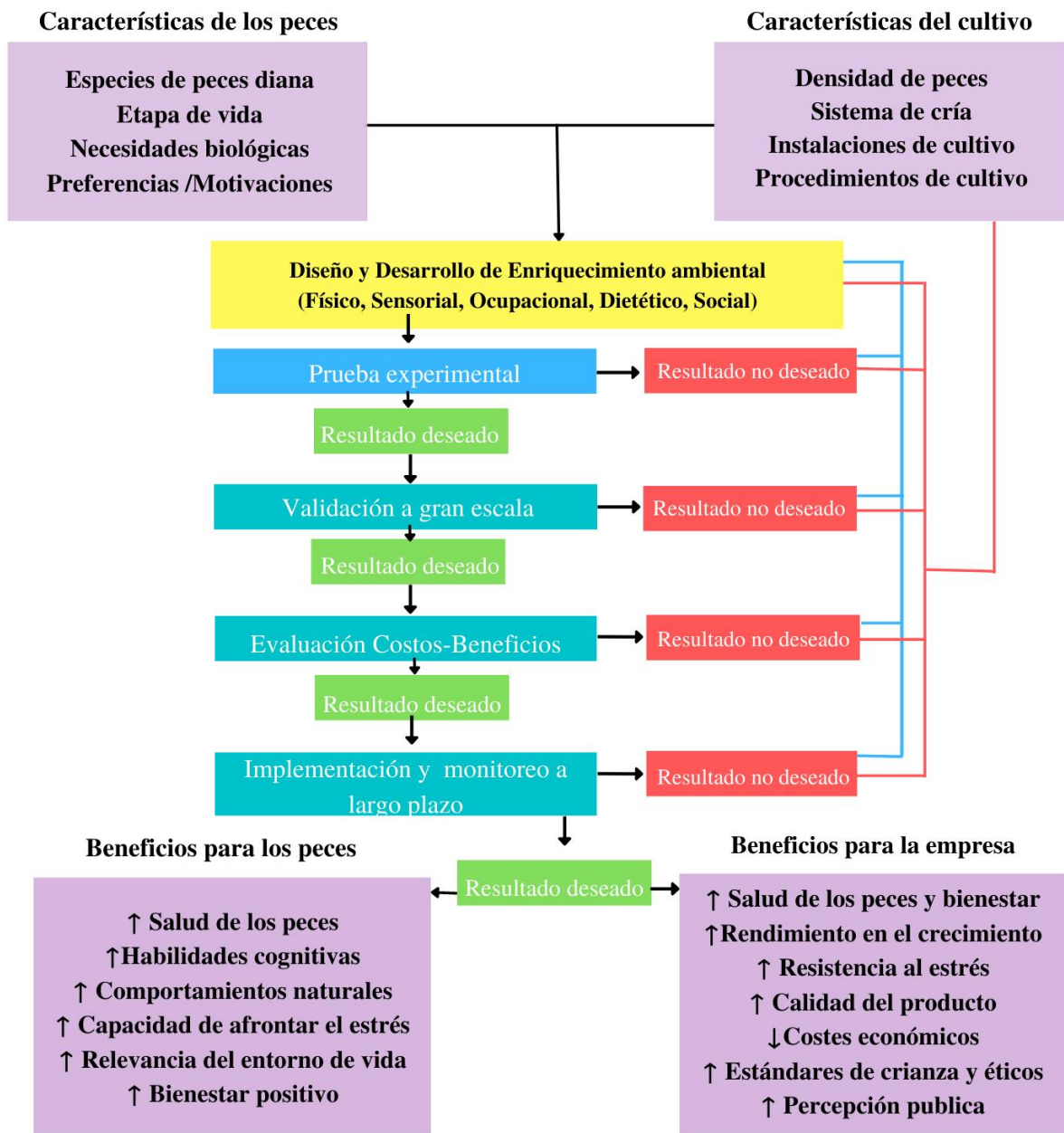
La preocupación por el bienestar animal también está presente en el uso de peces, tanto en las áreas de investigación científica, donde la manipulación antropológica de especies modelo influye tremendamente en los comportamientos fisiológicos y posteriormente en la validez de los datos (Williams *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2019), sino también en áreas de producción piscícola y adaptación al medio natural de aquellos peces que se crían para la repoblación de ecosistemas acuáticos. (Buenhombre *et al.*, 2021).

La industria de la acuicultura ha desarrollado un crecimiento exponencial en los últimos años generando que los peces sean los animales más cultivados en los sistemas de producción animal a escala mundial (Ashley, 2007). De hecho, la organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) resalta el papel de la acuicultura en la industria alimentaria debido al aumento del consumo total de pescado comestible, por su alto contenido en proteínas de alta calidad, aminoácidos esenciales o micronutrientes, como vitaminas y minerales (Estado Mundial Sostenibilidad En Acción, 2018). Los peces criados mediante acuicultura suelen estar expuestos a condiciones desfavorables en los sistemas de explotación y a procedimientos de granja como: el manejo de pescado, el pre-sacrificio y el sacrificio (Ashley, 2007), que pueden perjudicar gravemente su estado de bienestar y la calidad del producto final (Poli, 2016).

Las estrategias de enriquecimiento ambiental han mostrado un beneficio genérico en todas las especies piscícolas, pero no existe ninguna estrategia que cumpla los requerimientos ideales para todas las especies. Por lo que es necesario un estudio y planificación individualizada para cada especie, etapa de vida, tamaño y tipo de grupo y de métodos de crianza (Toni *et al.*, 2019).

Consecuentemente resulta necesario el planteamiento de una propuesta única de diseño y su posterior implementación comercial, para la obtención de beneficios positivos tanto para la empresa como para el animal (Sullivan *et al.*, 2016; Toni *et al.*, 2019) (Figura 1).

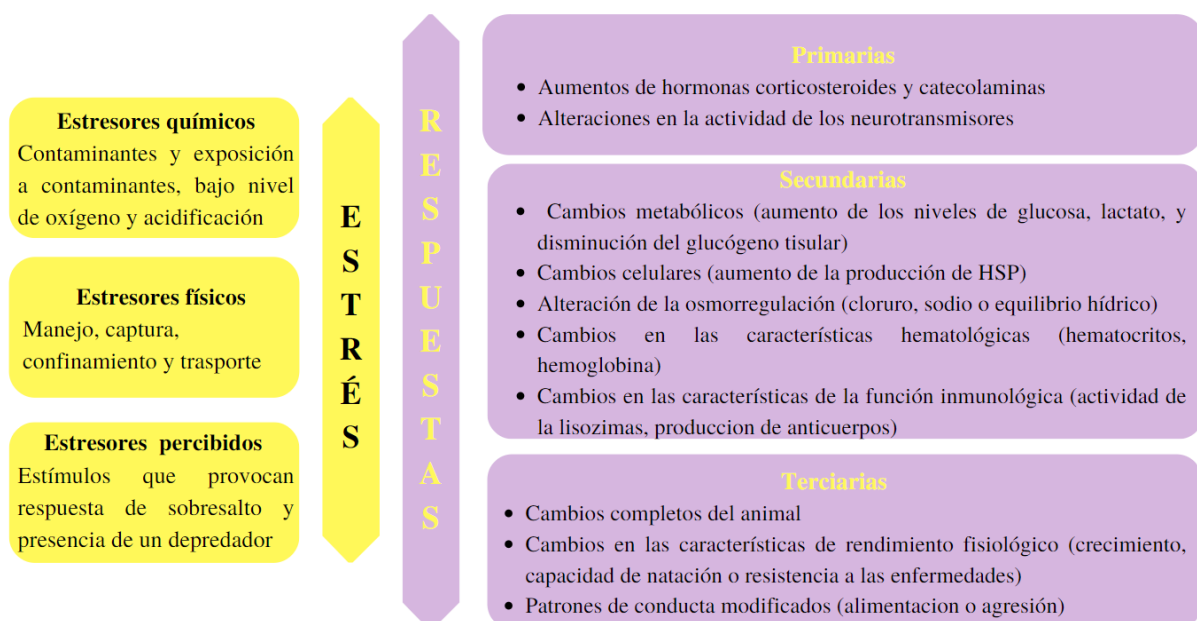
La concienciación científica e industrial ha estimulado una tendencia hacia el desarrollo de estrategias de enriquecimiento ambiental (Figura 1) para garantizar un estado de bienestar general, que evite los estados de estrés en entornos en cautiverio (Williams *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Esquema en el que se relatan la toma de decisiones necesarias para el diseño y desarrollo de estrategias de enriquecimiento ambiental que generen beneficios económicos manteniendo el bienestar animal, adaptación de (Arechavala-Lopez *et al.*, 2022).

El estrés suele definirse como un estado de homeostasis amenazada que se restablece mediante un conjunto complejo de respuestas adaptativas, pero que si no es restaurada podría volverse perjudicial para el bienestar animal (Chrousos, 1998). Una gran severidad y duración del factor estresante podría comprometer los mecanismos de respuesta fisiológica y perjudicar la salud y el bienestar de los peces, generando una importante preocupación en los administradores y acuicultores (Selye, 1976; Barton and Iwama, 1991).

Las respuestas fisiológicas de los peces a los factores estresantes ambientales se han agrupado en primarias, secundarias y terciarias (Barton, 2002) (Figura 2). Las respuestas primarias implican las respuestas neuroendocrinas como la liberación de catecolaminas del tejido cromafín (Reid *et al.*, 1998) y la estimulación del eje hipotálamo-pituitario-interrenal (HPI) que culmina en la liberación de hormonas corticosteroides a la circulación (Mommsen *et al.*, 1999). Por su parte las respuestas secundarias incluyen cambios en los niveles de iones y metabolitos en plasma y tejidos, características hematológicas y proteínas de choque térmico o estrés (HSP). Estas respuestas se relacionan con ajustes fisiológicos como en el metabolismo, la respiración, el estado ácido-base, el equilibrio hidromineral, función inmune y respuestas celulares (Figura 2) (Mommsen *et al.*, 1999). Además, se pueden producir respuestas terciarias, que incluirían aspectos relacionados con rendimiento general del animal, como cambios en el crecimiento, la resistencia general a las enfermedades, el alcance metabólico de la actividad, el comportamiento y, en última instancia, la supervivencia (Wedemeyer *et al.*, 1990) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquemización de los estresores físicos, químicos y otros que actúan sobre los peces provocando respuestas primarias, secundarias y terciarias. Adaptación de (Barton, 2002).

Las respuestas frente al estrés son una de las pruebas que permite apoyar el punto vista científico y moral que se asume que los peces son animales sintientes, con capacidad de percibir estímulos nocivos mediante órganos de los sentidos y procesos sensoriales y probablemente, un sistema nervioso central capaz de experimentar al menos algunos de los estados adversos asociados con el dolor en los mamíferos. Por ello, existen una atención especial sobre las condiciones de bienestar y la calidad de vida de los peces cuando se encuentran en cautividad (Franks *et al.*, 2018; Sneddon *et al.*, 2018).

Actualmente existe una creciente evidencia que sugiere que el enriquecimiento ambiental de tanques estériles como forma de mejora en las condiciones de alojamiento y vivienda de estos peces, reduce los niveles de estrés y la ansiedad en cautividad (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021). Esta evidencia está recogida en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio”, que promueve el enriquecimiento ambiental y el alojamiento social estimula la expresión de comportamientos naturales, consiguiendo que los sujetos experimenten comportamientos normativos que podamos analizar. (Krueger *et al.*, 2020). Existen numerosos estudios que utilizan el pez cebra como modelo para el estudio del comportamiento en peces (Spence, 2011).

### **1. 1 El pez cebra como animal modelo**

El pez cebra (*Danio rerio*) ha experimentado una creciente popularidad como animal modelo ya que ofrece ventajas significativas sobre otros vertebrados. Las dos características más representativas que han propiciado el incremento de su utilización en la investigación son: el desarrollo embrionario rápido y la numerosidad de sus progenies, ambas características muy interesantes para un modelo biológico animal (Chakraborty *et al.*, 2016). La brevedad en el lapso entre generaciones y la alta prolificidad posibilita la realización de estudios transgeneracionales con un elevado número de individuos y el análisis de sus características genéticas.

Este animal modelo presenta una gran relevancia en distintas áreas de investigación en varias disciplinas entre las que destacan: neurociencia (Kalueff *et al.*, 2014; Adams & Kafaligonul, 2018), comportamiento animal (Spence, 2011), cáncer (Astone *et al.*, 2017), regeneración de tejidos (Gemberling *et al.*, 2013), inmunología (Shao *et al.*, 2018), infección (Spagnoli *et al.*, 2015), el envejecimiento (Adams and Kafaligonul, 2018) y la investigación

toxicológica (Jeevanandam *et al.*, 2019), biología del desarrollo (Chávez *et al.*, 2016), la genética (Gutiérrez-Lovera *et al.*, 2017), entre otras muchas.

## **1. 2 Enriquecimiento animal en peces**

El enriquecimiento ambiental suele definirse como el aumento deliberado de la complejidad ambiental para reducir rasgos y comportamientos anormales o mal-adaptados, en peces criados en entornos con pocos estímulos (Robinson *et al.*, 2019). Esta estrategia es una de las más usadas en la mejora del bienestar de peces en cautiverio.

El término enriquecimiento solo debería usarse estrictamente para referirse a aquellas modificaciones que han demostrado proporcionar un claro beneficio de bienestar, pero frecuentemente se utiliza para aquellas modificaciones que no han demostrado mejorar el bienestar animal o aquellas que podrían satisfacer las necesidades básicas de los animales en lugar de proporcionar un beneficio adicional. (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021).

El bienestar animal se define en función a tres elementos: un adecuado funcionamiento del organismo, un correcto estado emocional, que excluya emociones negativas tales como el dolor y el miedo crónico, y la posibilidad de expresar comportamiento normativos (Ashley, 2007) como la correcta búsqueda de alimento, un mejor crecimiento y reproducción. Contrariamente los comportamientos ansiosos y estresantes se asocian con una natación anormal (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021), velocidad reducida o movimientos erráticos (Stewart *et al.*, 2012). A pesar de que cada animal presenta una amplia gama de comportamientos específicos propios de cada especie, (como la exploración centrada en el entorno, actividades de adquisición de alimentos, contacto entre animales o las actividades interactivas) (Mellor, 2016), existen comportamiento genéricos como que se pueden asociar con estados de comodidad, placer, interés, confianza y una sensación de control, que demuestran que los animales están fisiológica y conductualmente bien adaptados al medio ambiente y prosperan (Ashley, 2007).

El bienestar animal habitualmente se centra en el paradigma de las cinco libertades (Mellor, 2016) :

- El animal no sufre sed, hambre ni malnutrición, porque tiene acceso a agua y se le suministra una dieta adecuada a sus necesidades.



- El animal no sufre estrés físico ni térmico, porque se le proporciona un ambiente adecuado, incluyendo refugio frente a las inclemencias climáticas y un área de descanso cómoda.
- El animal no sufre dolor, lesiones ni enfermedades, gracias a una prevención adecuada y/o a un diagnóstico y tratamiento rápidos.
- El animal es capaz de mostrar la mayoría de sus patrones normales de conducta, porque se le proporciona el espacio necesario y las instalaciones adecuadas.
- El animal no experimenta miedo ni estrés, porque se garantizan las condiciones necesarias para evitar el sufrimiento mental.

Existen cinco tipos de enriquecimiento principales, ampliamente estudiados y caracterizados en peces cebra:

### **1.2.1 Enriquecimiento social**

El pez cebra a menudo se describe como una especie muy sociable y generalmente se encuentra en grupos variables en la naturaleza. Esta preferencia natural del pez cebra podría sugerir que el alojamiento en grupo es beneficioso para su bienestar. (Sundin *et al.*, 2019; Suriyampola *et al.*, 2016). Los peces alojados en grupo presentan comportamientos menos ansiosos, ya que este ambiente social sugiere una mayor sensación de seguridad y promueve una recuperación más rápida del estrés tras distintos desafíos. Se ha comprobado que tras la manipulación, el comportamiento del pez cebra alojado en grupos vuelve a los niveles normales de forma más rápida que los peces aislados o en pareja (White *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 2021).

El aislamiento en pareja es uno de los estresores más frecuentemente utilizados para la elevación de los niveles de cortisol (respuesta primaria al estrés por la activación del eje hipotálamo-pituitario-interrenal). Por su parte en peces cebra alojados individualmente durante largos periodos de tiempo y expuestos a un estresor agudo presentaron unos niveles de cortisol menores que aquellos peces aislados en grupos de 10 individuos. La respuesta del cortisol al estrés se redujo en el pez cebra alojado individualmente porque dependen únicamente de sus propias percepciones del factor estresante, mientras que entre los peces cebra agrupados, la respuesta al estrés puede verse aumentada por señales químicas y/o conductuales de los otros miembros del banco (Giacomini *et al.*, 2015).

En otro estudio realizado en peces cebra se observó que el aislamiento social experimentado por el pez cebra (durante 60 días) desencadenó cambios severos en las funciones

fisiológicas e inmunológicas que pueden afectar la calidad de vida. También se estudió los niveles de cortisol y el índice de crecimiento, pero no se vieron diferencias significativas frente a los individuos control (sin aislamiento). Donde sí se vieron diferencias en los niveles de cortisol fue tras someter a los peces a un estrés por persecución, en este caso los peces aislados presentaban niveles de cortisol más bajos que los individuos control. Por su parte la exposición a depredadores provocó niveles más altos de cortisol en peces aislados socialmente (Forsatkar *et al.*, 2017).

La sensación de seguridad y calma mostrada por los individuos alojados en grupo podrían deberse a distintos mecanismos sociales como el 'contagio emocional', donde la respuesta de un individuo a un estímulo influye en la respuesta de los individuos cercanos (Giacomini *et al.*, 2015). También podría deberse al llamado efecto 'amortiguador social', donde las respuestas de miedo o estrés disminuyen cuando los individuos están en un grupo, o están en contacto visual u olfativo (Giacomini *et al.*, 2015 ; Kareklas *et al.*, 2018). Todos estos efectos podrían determinar que la fuerza de la respuesta a un factor estresante puede depender de la composición de un grupo, la densidad poblacional y la familiaridad (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el pez cebra reconoce a individuos familiares y es posible que este hecho sea relevante para moderar el comportamiento ansioso (Fernandes Silva *et al.*, 2019). Aunque no debemos asumir que la mera presencia de otros peces cebra siempre es enriquecedora; ya que debemos tener en cuenta otros factores. En este sentido el sexo (Kurtzman *et al.*, 2010) y la densidad de los grupos también son elementos importantes a tener en cuenta. Un estudio demostró que densidades bajas de población pueden conducir a mayores niveles de agresión debido a que el pez cebra tiene más espacio disponible para defender el territorio. Esto sugiere que tanto la densidad de población como la disponibilidad de espacio son importantes y pueden afectar el estrés y el bienestar (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021). Por ejemplo, si hablamos de la aplicación del enriquecimiento en la industria piscícola intensiva vemos que las densidades tanto bajas como altas pueden comprometer el bienestar del salmón del Atlántico, y el bienestar general se obtiene a densidades intermedias (Salvanes *et al.*, 2013; Hyvärinen and Rodewald, 2013).

A pesar de los numerosos estudios que abogan por los grandes beneficios del enriquecimiento social, no podemos asumir que el alojamiento en grupo sin otras formas de enriquecimiento satisface todas las necesidades de comportamiento y bienestar del pez cebra (Arechavala-Lopez *et al.*, 2022). Por ejemplo, se ha comprobado que los peces que tienen un enriquecimiento ambiental doble, en el que incluyen a otros peces y a estructuras y plantas

es mucho más beneficioso, ya que puede ayudarlos a evitar el contacto social no deseado (Collymore *et al.*, 2015).

Otras formas de enriquecimiento social que también han demostrado beneficios son el uso de tanques vecinos con individuos. Un estudio demostró que existía una preferencia hacia el lado social del tanque (lado en el que se encontraba el tanque con otros peces cebra), ya sea solos o en grupo, frente a una ausencia de los mismos. Y en cuanto a la colocación del lado social no hubo diferencias significativas, el pez se trasladaba preferentemente al lado en el que se encontraran otros peces cebra independientemente de la posición que ocupase el enriquecimiento ambiental (Krueger *et al.*, 2020).

### **1.2.2 Enriquecimiento nutricional**

El enriquecimiento dietético se refiere al tipo de alimento o estrategia de alimentación (distribución, cantidad, periodicidad, etc.) que afecta principalmente el comportamiento e ingesta alimenticia, pero no incluye la composición de la dieta ya que se consideraría enriquecimiento “interno o nutricional” (Arechavala-Lopez *et al.*, 2022). Las estrategias de alimentación juegan un papel importante debido a que los regímenes, horarios y procedimientos de alimentación pueden afectar en gran medida, positiva o negativamente, el estado de bienestar de los peces (Juell, 1995).

El objetivo principal de estas dietas enriquecidas con y sin alimentos vivos (como *Artemia spp.* o rotíferos) se han centrado principalmente en la mejora del crecimiento, supervivencia o las necesidades biológicas de cada especie y etapa de vida (Lidster *et al.*, 2017). Esta forma de enriquecimiento ayuda a controlar el comportamiento de búsqueda de alimento, y reduce las respuestas conductuales e interacciones sociales no deseadas (Juell, 1995). También se ha visto que los sistemas de recompensas alimentarias aumenta la estimulación cognitiva y reduce la geotaxis, escototaxis (preferencia y posterior movimiento hacia la oscuridad) (Maximino, Marques De Brito, *et al.*, 2010) y locomoción, parámetros que se suelen relacionar con comportamientos ansiosos (Buenhombre *et al.*, 2021).

Las investigaciones han reportado una mejora en el bienestar del pez cebrado cuando se le proporciona alimento vivo, este descubrimiento puede mejorar los valores nutricionales mediante el uso de estímulos quimio- sensoriales como el comportamiento natural de depredación (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021).

En cuanto a la introducción de piensos pueden ser de diferentes tamaños y formas, sabores, potenciadores, textura, palatabilidad y color. Incluso también se pueden formular para

que se hundan o floten dependiendo de la alimentación del pez en la columna de agua (Levina *et al.*, 2021).

Otras vías de enriquecimiento nutricional se basan en el uso de horarios de alimentación alterados y el suministro de alimentos sabrosos como golosinas o proporcionando una dieta más variada (Juell, 1995). La frecuencia y horarios de alimentación también puede afectar el comportamiento del pez cebra, ya que los peces alimentados una vez al día muestran una mayor ansiedad que los peces alimentados dos veces al día o más (Dametto *et al.*, 2018).

### **1.2.3 Enriquecimiento ocupacional**

Cuando hablamos de enriquecimientos ocupacionales nos referimos a cualquier estructura o juguete que impulse al animal a interactuar con el medio ambiente de alguna manera (Bloomsmith and Schapiro, 1991). En el caso del pez cebra, los rompecabezas y laberintos permiten a los peces, hacer ejercicio, aliviar el aburrimiento o el estrés psicológico. A pesar de que estas intervenciones no son fáciles de diseñar, existen evidencias que podrían indicar que estos elementos reducen el estrés y ansiedad (DePasquale & Leri, 2018).

Se ha descubierto que el pez cebra mejora la capacidad de aprendizaje y reduce los niveles de ansiedad en entornos con flujo de agua (Luchiari & Chacon, 2013; DePasquale & Leri, 2018), el ejercicio realizado para nadar contracorriente puede promover el desarrollo muscular y óseo, lo que puede proteger contra los efectos degenerativos del envejecimiento y, por lo tanto, promover un mejor estado de bienestar a medida que los peces envejecen (Hasumura & Meguro, 2016; DePasquale & Leri, 2018).

Los peces cebras salvajes que vive en aguas corrientes parece presentar niveles más altos de agresión, menos cohesión grupal y cambios de liderazgo más frecuentes que los peces cebra que se encuentran en aguas tranquilas. Esta actitud comportamental también se han visto en el laboratorio, representada por niveles más altos de agresión y un comportamiento antisocial (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021). El patrón descrito podría estar relacionado con la preferencia de los peces cebra por los compartimentos con flujo de agua y estructuras (plantas y sustrato) sobre un compartimento estéril o un compartimento que contiene estructuras, pero sin flujo de agua. La presencia de estructuras físicas también es relevante en cuestiones de enriquecimiento ocupacional ya que brinda la opción de interactuar con el flujo o no, mientras ejercen cierta protección frente a la corriente y generan aguas más tranquilas que se asemejen a las condiciones naturales (DePasquale & Leri, 2018).

La recirculación y flujo de agua a través de las distintas estructuras también proporciona beneficios reproductivos, ya que gracias a estos sistemas los cambios en los parámetros del tanque se modifican progresivamente y esto ayuda en la generación de comportamientos fisiológico como por ejemplo el desove y la cría inducida por cambios de temperatura (Williams *et al.*, 2009).

#### **1.2.4 Enriquecimiento sensorial**

En entornos naturales los animales están expuestos a una gran variedad de estímulos sensoriales como estímulos visuales, olfativos, auditivos y táctiles, pero que no suelen replicarse en un entorno de cautiverio en laboratorio (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021).

Recientemente se ha explorado este campo mediante la introducción de estímulos visuales, algunos ejemplos son la introducción de imágenes en el exterior de tanque vacíos que emulan condiciones ambientales. Las fotografías de grava son elementos que promueve una sensación de seguridad, por lo que son frecuentemente usados como estrategia de camuflaje frente a depredadores aéreos. Algunos estudios han demostrado como esta nueva forma de enriquecimiento es preferida por los peces cebra frente a tanques estériles, incluso esta preferencia era casi tan grande como la introducción real de grava en el tanque (Schroeder *et al.*, 2014). Otro ejemplo es la colocación la pared posterior de una imagen azul que asemejara el paisaje marino. Esta estructura ha mostrado beneficios a nivel reproductivo ya que aumento de huevos produjo más huevos en aquellos individuos con un tanque enriquecido frente al tanque estéril (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021).

La introducción de luz artificial como estímulo visual también ha demostrado tener beneficios positivos ya que podemos definir artificialmente los periodos de noche-día estableciendo ciclos diurnos y estacionales que influyen en la respuesta fisiológica; por ejemplo como señal para el desove en muchas especies (Williams *et al.*, 2009).

#### **1.2.5 Enriquecimiento físico**

El pez cebra se distribuye naturalmente por la India, Nepal, Bangladesh y Pakistán, países que poseen una gran variedad de hábitats en el que incluimos ambientes como arroyos, ríos, estanques y arrozales, que pueden contener plantas acuáticas, vegetación colgante y sustratos como el barro, grava o arena (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008) . Por ello la imitación de alguna de estas características en tanques estériles es una de las prácticas más habituales en el enriquecimiento en laboratorios (Williams *et al.*, 2009; Lidster *et al.*, 2017). El sustrato puede proporcionar cierto camuflaje, lo que puede contribuir a una mayor sensación

de seguridad y un mejor estado de bienestar (Kareklas *et al.*, 2018), incluso se ha visto beneficios reproductivos como la estimulación del desove, construcción de nidos o territorio de cría (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021). Por su parte las plantas, los refugios y otras estructuras pueden proporcionar cobertura o protección ante interacciones sociales negativas como la intimidación, las perturbaciones, el flujo de agua o de las luces del acuario (Williams *et al.*, 2009; Näslund *et al.*, 2014). Pero el uso de gravas y arenas como forma de enriquecimiento puede causar una alta carga orgánica que puede alterar la química y los parámetros acuáticos, dificultando la eliminación de ciertas enfermedades parasitarias, la recuperación de los huevos o camuflando a los peces impidiendo su observación para el análisis de su comportamiento (Williams *et al.*, 2009).

La complejidad ambiental proporcionada por las estructuras físicas puede tener numerosos efectos positivos como una mayor exploración y cohesión social, y una mejora la cognición y el desarrollo cerebral. Estos beneficios pueden traducirse en una mayor flexibilidad conductual y capacidad de respuesta frente a factores estresantes o desafíos (Braithwaite and Salvanes, 2005). La adición de estas estructuras físicas en tanques estériles también ha demostrado tener efectos fisiológicos positivos sobre el bienestar reproductivo, principalmente en la fertilidad y fecundidad (Wendelaar Bonga, 1997). Por ejemplo, se ha observado una relación entre la presencia de hojas de plástico o el pasto plástico, y una mayor protección para los huevos, ya que estas estructuras proporcionan un sustrato “natural” para el desove. Consecuentemente también se ha observado un aumento significativo en el número y supervivencia de alevines en comparación con los ambientes estériles (Lee *et al.*, 2019). Además de los beneficios reproductivos, también se ha demostrado efectos sobre la orientación, navegación y marcaje territorial (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021).

Tras conocer cuáles son los principales tipos de enriquecimiento de los peces cebras ya podremos determinar qué técnicas de enriquecimiento ambiental brindan un mayor beneficio en función del planteamiento del experimento y el objetivo del mismo. Para la elección de un correcto enriquecimiento ambiental es importante no solo prestar atención a un supuesto bienestar visual, sino que también es necesario usar otros métodos para evaluar correctamente si el enriquecimiento está siendo favorable (Williams *et al.*, 2009). Durante el presente trabajo abordaremos cual el beneficio real de la introducción de enriquecimiento ambiental combinado (físico y sensorial), buscando analizar el comportamiento del pez cebras no únicamente desde el bienestar visual sino mediante el análisis de otros parámetros objetivos.

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del enriquecimiento gradual hacia uno de los extremos del tanque de estabulación, sobre la conducta del pez cebra. El enriquecimiento ambiental combina elementos físico y sensoriales. Para ello se propone utilizar el ensayo “Novel Tank Test” (NTT) realizando una división del área estudiada en 4 arenas o zonas y se determinarán parámetros cinéticos de la natación de los peces (distancia recorrida, velocidad y tiempo de permanencia en las distintas arenas).

Este estudio plantea la siguiente hipótesis “La localización de elementos de enriquecimiento ambiental en el tanque de estabulación determina una preferencia de natación por la zona superior del tanque a la estructura de enriquecimiento”.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3. 1. Declaración de Ética**

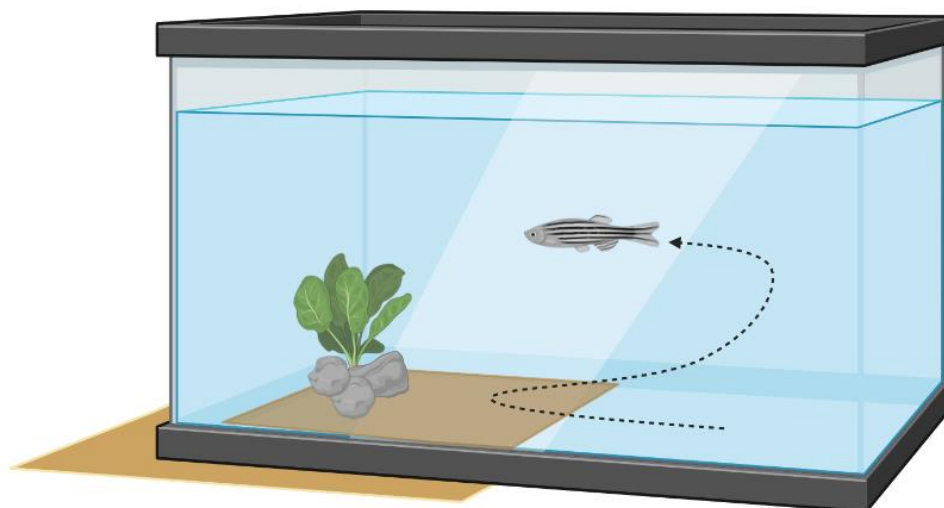
Todos los peces fueron manipulados de acuerdo con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE), siguiendo la normativa española (RD/2013) para el uso de animales de laboratorio. La manipulación de los animales se realizó por personal autorizado.

### **3. 2 Mantenimiento y cuidado de los animales**

En el presente estudio se utilizaron ocho individuos macho (18 meses de edad) de pez cebra de tipo salvaje (cepa AB). Los peces se alojaron en un sistema de recirculación equipado con filtros mecánicos, químicos y biológicos en tanques de 20 cm largo x 8 cm ancho x 20 cm alto, con un volumen de 3 L, temperatura de  $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , pH 7,5 y ciclo de luz/oscuridad de 14/10 h.

### **3. 3 Tipo de enriquecimiento ambiental**

Se evaluaron dos estrategias de enriquecimiento ambiental, que combina elementos físicos y sensoriales i) plantas de plástico y rocas, y ii) foto de sustrato de grava y piedras. Las plantas se localizaron en uno de los extremos del tanque y la foto del sustrato se colocó desde la mitad del tanque hasta el extremo enriquecido. El objetivo es generar un enriquecimiento gradual y sumatorio desde el centro al extremo de la pecera (Figura 3).



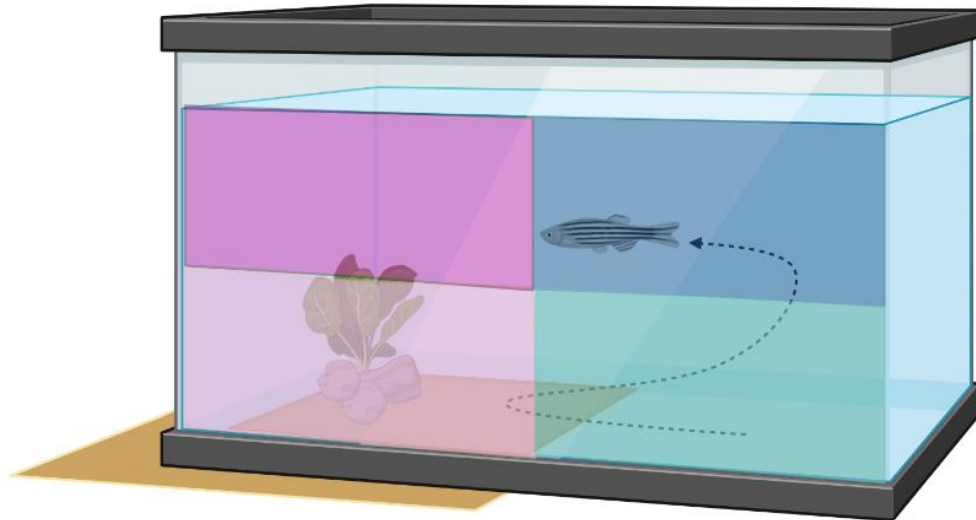
**Figura 3:** Esquematización del ensayo del tanque nuevo o “novel tank assay” en el tanque enriquecido con los 2 elementos de enriquecimiento, i) plantas de plástico y rocas, y ii) foto de sustrato de grava y piedras, en la zona izquierda. Elaborado con BioRender.com.

### 3.4 Ensayo en nuevo tanque o “Novel tank assay”

En el presente experimento se realizó una prueba NTT para el estudio del comportamiento de los individuos, utilizando un acuario de vidrio cuadrangular ( $20 \times 8 \times 18$  cm; largo  $\times$  ancho  $\times$  profundidad) se llenó hasta un volumen total de 3,5 L y se usó como arena de evaluación. Cada pez se colocó individualmente en el fondo del tanque usando una red y su comportamiento de natación se grabó en video ( $1920 \times 1080$  px) de las 8 grabaciones cuatro de ellas presentaban el enriquecimiento en el extremo derecho y los cuatro restantes con enriquecimiento en el extremo izquierdo. El tiempo de grabación fue de 6 minutos, el primer minuto corresponde al tiempo de aclimatación, periodo descrito como el tiempo necesario para un pez se adaptarse a las nuevas condiciones y parámetros del nuevo entorno, y los 5 restantes serán evaluados.

Una vez finalizada la prueba, los peces fueron trasladados a un tanque de recuperación. Los archivos de video se analizaron con el software de seguimiento Noldus Ethovision®, generando una cuadrícula virtual que divide el tanque a media profundidad en áreas superior e inferior, y posteriormente en extremo izquierdo y derecho (Figura 4) y seguidamente se estructuró el esquema genérico del análisis de datos.





**Figura 4.** Esquematización del tanque enriquecido con los 2 elementos de enriquecimiento, i) plantas de plástico y rocas, y ii) foto de sustrato de grava y piedras, en el extremo izquierdo. También se delimita e identifica las cuatro áreas del tanque para su posterior análisis con el software de seguimiento Noldus Ethovision®, para el enriquecimiento en el lado derecho. Elaborado con BioRender.com.

Posteriormente se analizó la distancia total recorrida, velocidad total recorrida, tiempo acumulado/global durante el que permanecen los individuos en la zona superior izquierda del tanque, tiempo acumulado/global durante el que permanecen los individuos en la zona superior derecha del tanque, tiempo por intervalos de un minuto tras el tiempo de aclimatación durante el que permanecen los individuos en la zona superior derecha del tanque y tiempo por intervalos de un minuto tras el tiempo de aclimatación durante el que permanecen los individuos en la zona superior izquierda del tanque

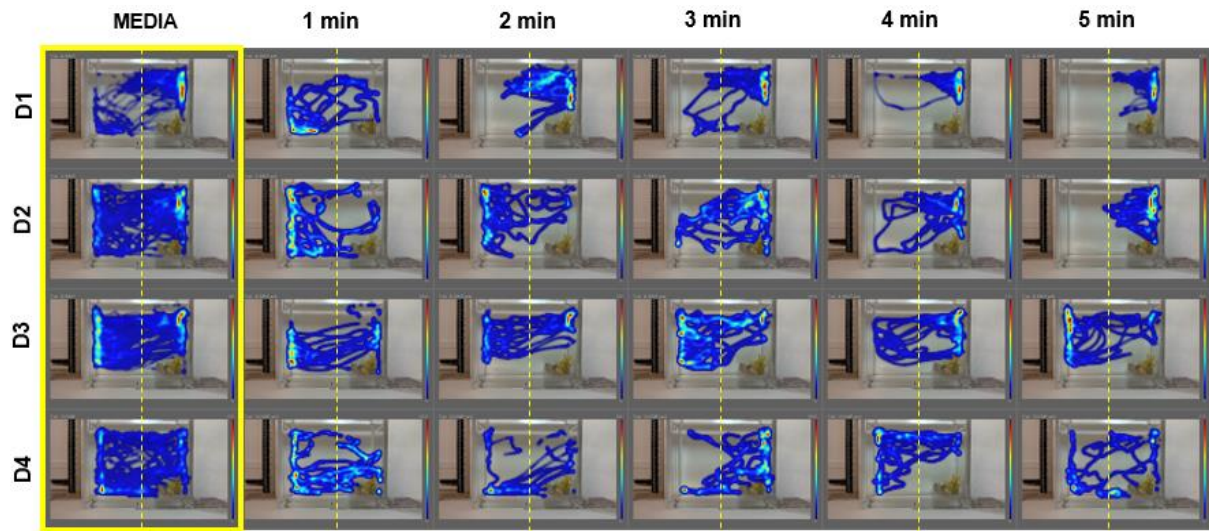
### 3. 5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el software estadístico Graphpad (versión Graphpad prism 8.0.1 Software, CA, EE. UU, 2018), posteriormente también se realizaron las gráficas para la representación de los resultados utilizando este mismo programa estadístico.

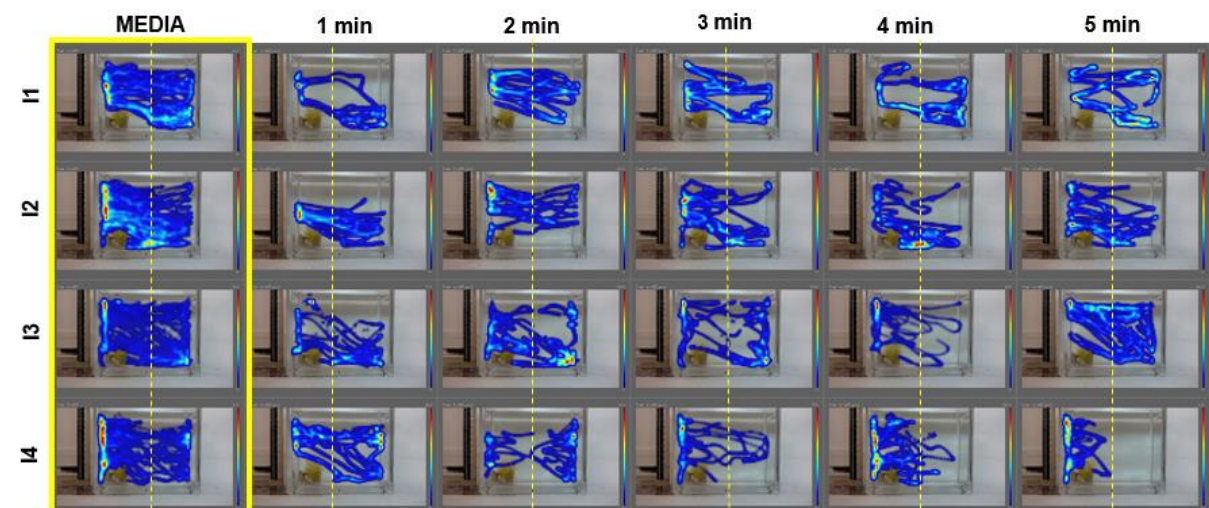
Se realizó el test de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los datos siguen una distribución normal o Gaussiana, y posteriormente un t- Student unipareado. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### 4. RESULTADOS

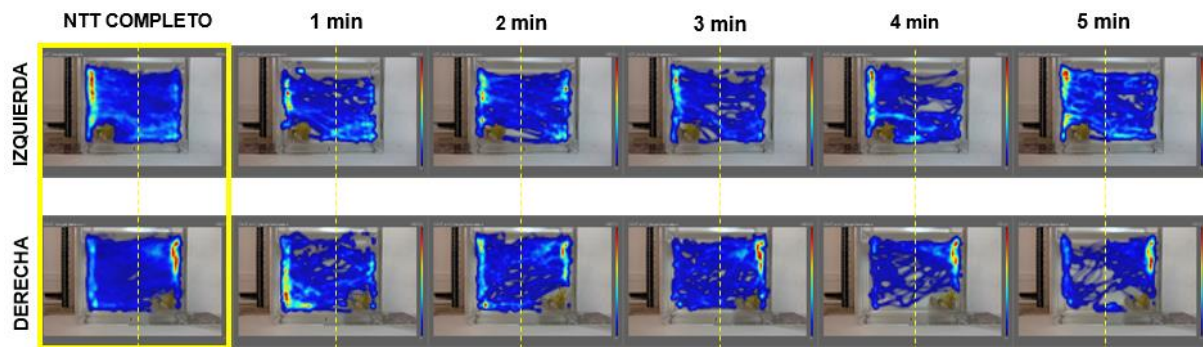
Mediante el software Ethovision, se crearon cuatro subáreas virtuales homogéneas (Figura 4) con el propósito de analizar el patrón de exploración (la dinámica espacial y temporal del comportamiento en tanques con enriquecimiento). Los animales al ser introducidos en un tanque con estructuras de enriquecimiento mostraron una fuerte preferencia general por el área superior a las estructuras de enriquecimiento cuando se analizaron los mapas de calor (Figuras 5, 6, y 7).



**Figura 5.** Representación de los mapas de calor al analizar en intervalos de 60 segundos el comportamiento del pez cebra cuando localizamos en el extremo derecho las estructuras de enriquecimiento. En la columna media observamos el comportamiento durante los 5 minutos completos de análisis. Posteriormente vemos el patrón de comportamientos a intervalos de un minuto.



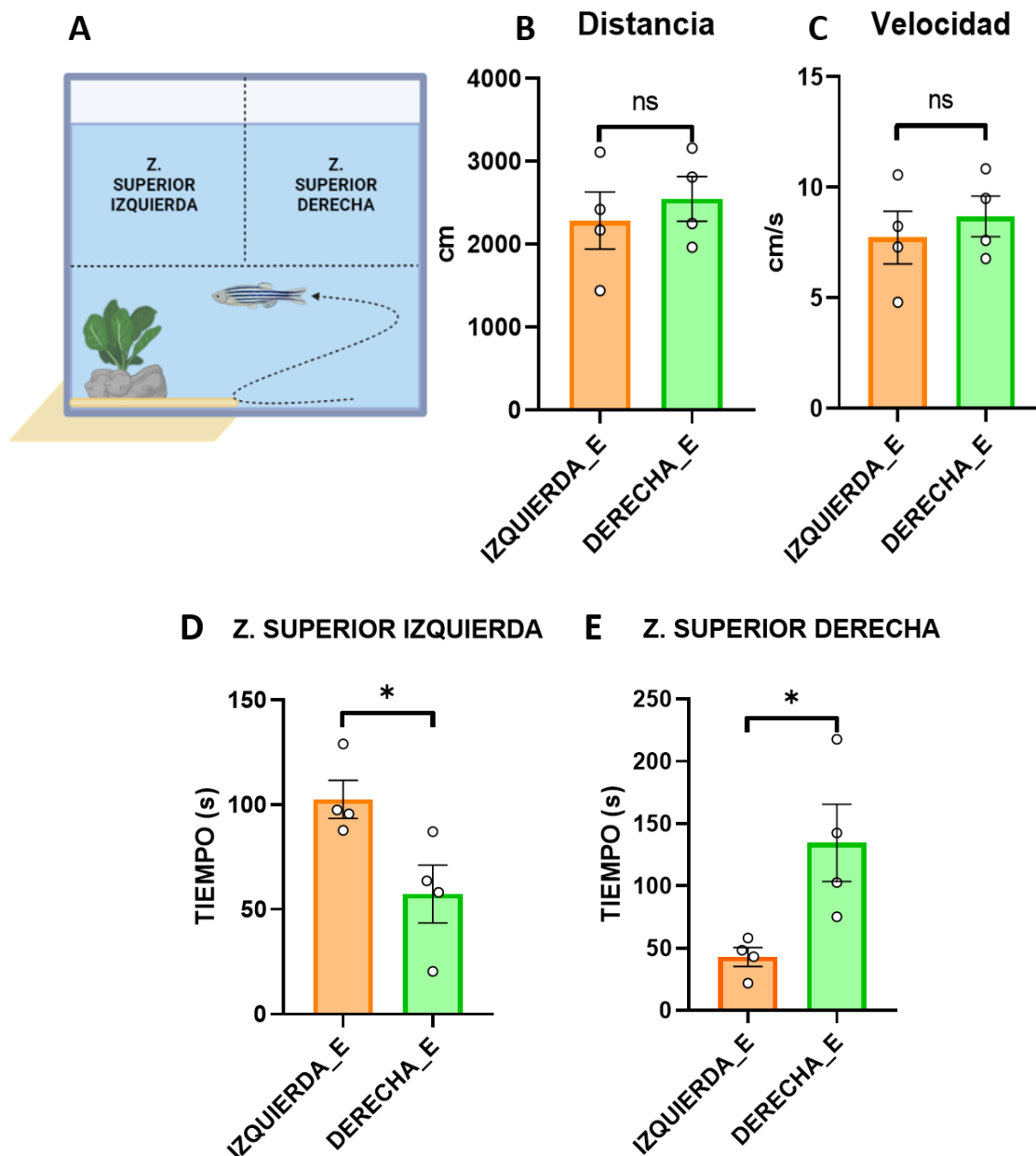
**Figura 6.** Representación de los mapas de calor al analizar en intervalos de 60 segundos el comportamiento del pez cebra cuando localizamos en el extremo izquierdo las estructuras de enriquecimiento. En la columna media observamos el comportamiento durante los 5 minutos completos de análisis. Posteriormente vemos el patrón de comportamientos a intervalos de un minuto.



**Figura 7.** Representación de los mapas de color globales obtenidos mediante el software EthoVision para el enriquecimiento en el extremo izquierdo y derecho.

El análisis estadístico no se registró diferencias significativas para la velocidad media de natación ( $p = 0,5488$ ;  $t = 0,6350$ ) (Figura 8 B), por lo que la localización del enriquecimiento físico en el tanque de estabulación no modifica la velocidad de natación de los peces cebrá dentro del tanque de estabulación. También se evaluó la distancia media recorrida (Figura 8 C) y no se observaron diferencias significativas ( $p = 0,5718$ ;  $t = 0,5978$ ), por lo que podemos concluir que la introducción diferencial de estructuras de enriquecimiento no altera la distancia media recorrida.

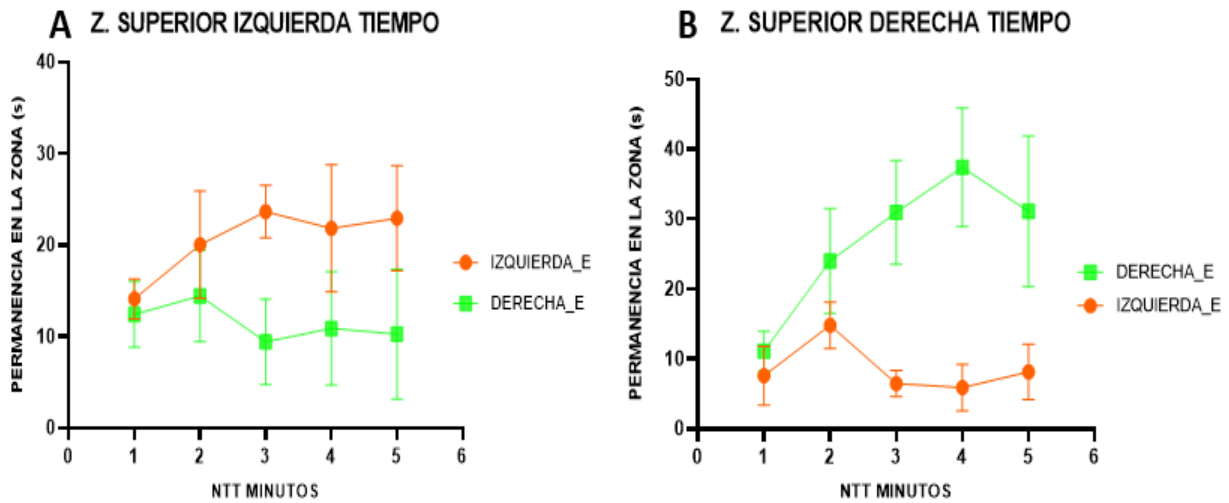
Posteriormente se estudió el tiempo de permanencia globales en la zona superior izquierda (Figura 8D) tanto con enriquecimiento en el lado izquierdo como en el derecho, donde se vio que existían diferencias significativas ( $p = 0,0344$ ;  $t = 2,226$ ), y por tanto una preferencia por parte del individuo por la zona inmediatamente superior a la zona de enriquecimiento. Al estudiar la permanencia global en la zona superior derecha (Figura 8E) tanto con enriquecimiento en el lado izquierdo como en el derecho, observamos también diferencias significativas ( $p = 0,0283$ ;  $t = 2,874$ ), por lo que se reafirma la preferencia de pez cebrá por la zona inmediatamente superior a la zona de enriquecimiento.



**Figura 8.** (A) Representación esquemática de la prueba NTT y las áreas de análisis establecidas (Elaborado con Biorender.com) (B) Distancia total recorrida (cm); (C) Velocidad media (cm/s); (D) Tiempo de permanencia de los animales en la zona superior derecha (%), con enriquecimiento en el extremo derecho, y con enriquecimiento en el extremo izquierdo; (E)Tiempo de permanencia de los animales en la zona superior izquierda (%), con enriquecimiento en el extremo derecho, y con enriquecimiento en el extremo izquierdo. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas \* ( $p < 0,05$ ).

Por último, se analizó el tiempo de permanencia de los individuos a 5 intervalos de tiempo (con una duración cada uno de ellos de 60 s), tanto en el análisis del cuadrante o zona superior izquierda (Figura 19A) como en la superior derecha (Figura 19B). Se observó un aumento del tiempo de permanencia en la zona superior a la estructura de enriquecimiento a mediada que aumentaba en tiempo de permanencia en el tanque, es decir, los mayores tiempos

de permanencia en la zona superior del enriquecimiento se encontraban en el intervalo 5 (4-5 min). Estadísticamente se muestran diferencias significativas tanto en los casos en los que se evaluó la zona superior derecha ( $p= 0,0049$ ;  $t = 3,846$ ), como para la zona superior izquierda ( $p= 0,0016$ ;  $t = 4,680$ ).



**Figura 9.** (A) Representación mediante gráfico de dispersión unido por puntos de tiempo de permanencia en el extremo superior izquierdo de los individuos en cada uno de los 5 intervalos de tiempo (60 s) tanto con enriquecimiento en el extremo derecha como izquierda; (B) Representación mediante gráfico de dispersión unido por puntos de tiempo de permanencia en el extremo superior derecho de los individuos en cada uno de los 5 intervalos de tiempo (60 s) tanto con enriquecimiento en el extremo derecha como izquierda.

## 5. DISCUSIÓN

Tradicionalmente en estudios de enriquecimiento ambiental se suelen utilizar medidas fisiológicas y comportamentales para evaluar los efectos de las alteraciones ambientales en los peces cebras. Habitualmente la mejor estrategia para un análisis completo suele ser una combinación de varios enfoques.

La medición de las tasas de liberación de cortisol en todo el cuerpo o en el agua suele ser un enfoque común que se utiliza como indicador de estrés, ya sea examinando los niveles basales de cortisol o mediante la observación de la capacidad de respuesta a un estímulo estresante, comparando el alojamiento en zonas con enriquecimiento y zonas no enriquecidas (Egan *et al.*, 2009; Maximino, de Brito, *et al.*, 2010). Sin embargo, las variaciones en las tasas de liberación de cortisol pueden cambiar por varias razones, y estas pueden estar relacionadas con buenos o malos estados de bienestar, por lo que es un método menos preciso a la hora de evaluar el efecto del enriquecimiento ambiental en el bienestar animal. (Chloe H. Stevens *et al.*, 2021)

Otros enfoques que suelen usarse incluyen el análisis de la fertilidad y la fecundidad, como desempeño de desove, en la tasa de supervivencia o la calidad gonadal, ya que se sabe que los peces que experimentan estrés crónico disminuyen estas funciones fisiológicas. Pero estas pruebas son mucho más tediosas y requieren de procedimientos estandarizados con mayores tiempos de evaluación (Wendelaar Bonga, 1997).

Las pruebas de elección, donde a los animales se les presentan varias condiciones diferentes a la vez para ver qué condiciones prefieren (Depasquale *et al.*, 2020), es otra enfoque bastante habitual. Sin embargo, este enfoque de estudio no es el más adecuado para el análisis individualizado de los peces debido a que las pruebas de preferencia solo permiten elecciones relativas entre un número discreto de opciones, y no miden un indicador de bienestar específico. Normalmente se suele usar varias pruebas de comportamiento ya que cada una de ellas evocan diferentes comportamientos y pueden estimular diferentes vías neurológicas, por lo que un enfoque multiprueba captura de forma más precisa el bienestar animal (Blaser and Peñalosa, 2011; Maximino *et al.*, 2012). Actualmente para evaluar los niveles de ansiedad y estrés se suelen utilizar las pruebas de laboratorio estándar, el “novel tank diving task” (NTT) y la prueba de luz-oscuridad (LDT) (Chloe H Stevens *et al.*, 2021; Fontana *et al.*, 2022).

La prueba de luz-oscuridad (LDT) evalúa el alcance de la tendencia natural de los peces a la escototaxis, es decir, evasión de las áreas brillantes y preferencia natural por la oscuridad

en un entorno novedoso. Por lo que en esta prueba el estado de ansiedad se define operativamente por el tiempo pasado en la porción de luz (cuanto más tiempo menor ansiedad) o el tiempo pasado en el compartimiento oscuro (cuanto más tiempo mayor ansiedad) (Fontana *et al.*, 2022). Esta prueba de preferencia claro-oscuro se ha convertido en un estándar para la detección de compuestos que alteran la ansiedad y para el estudio de los mecanismos subyacentes a los trastornos de ansiedad (Blaser and Peñalosa, 2011). Pero su aplicación en el estudio del efecto de la introducción de enriquecimiento ambiental sobre el estado de bienestar no es el idóneo, debido a que evalúa los comportamientos ansiosos en función de las distintas zonas iluminadas no en función de la presencia de estructuras físicas de enriquecimiento (Facciol *et al.*, 2017).

La prueba de "Novel Tank Test" explora la tendencia natural del pez cebra a sumergirse en el fondo de un entorno novedoso, que tiende a una exploración gradual hacia la zona superior del tanque a medida que se habitúan al entorno (Fontana *et al.*, 2022). Al inicio de la prueba el comportamiento del pez se asocia con movimientos exploratorio inhibidos (localización en la parte inferior del tanque), velocidad reducida y aumento de la frecuencia de comportamientos erráticos similares a los de escape, que se asocian con niveles más altos de ansiedad, pero progresivamente los movimientos exploratorios aumentaran y gradualmente explorará la zona superior (Cachat *et al.*, 2011). Mediante esta prueba la ansiedad se puede definir operativamente en términos de tiempo de permanencia en la parte inferior o home base (cuanto más tiempo mayor nivel de ansiedad) y en la mitad superior (cuanto mayor tiempo menor nivel de ansiedad). Esta prueba es la más utilizada para la valoración del bienestar del pez cebra en estudios de enriquecimiento ambiental (Fontana *et al.*, 2022; Buenhombre *et al.*, 2021; Estes *et al.*, 2021; Collymore *et al.*, 2015), debido a su gran sensibilidad en los estudios de ambientales y farmacológicos. Además, puede ser usado en un amplio espectro de estudios que implican manipulaciones experimentales y, por lo tanto, puede ser beneficioso para el estudio de la ansiedad del pez cebra gracias a ser una prueba novedosa y tremendamente integrativa (Fontana *et al.*, 2022). Alguno de los programas más habituales para la realización de esta prueba comportamental es la realización de videograbaciones y la evaluación por un software de seguimiento de video como el EthoVision XT, Noldus (Hawkey *et al.*, 2021; Mathur *et al.*, 2011; Nema *et al.*, 2016).

Los estudios sobre enriquecimiento ambiental apuntan que los peces cebra presentan una preferencia por ambientes enriquecidos, que se asemejan a entornos naturales frente a tanques estériles (Reed & Jennings, 2011; Lawrence, 2015; Krueger *et al.*, 2020).

A pesar de que existe evidencias previas sobre el beneficio de los métodos de enriquecimiento físico sobre los estados de estrés y ansiedad, estas evidencias están basadas en estudios bioquímicos que presentan una serie de limitaciones como la correlación directa entre los datos bioquímicos (niveles de cortisol y ROS) y el comportamiento animal. Además, la realización de los análisis se realiza en un único momento tras las pruebas de comportamiento (Marcon *et al.*, 2018). El uso de otras metodologías más novedosas e integrativas como el NTT presentan un rendimiento relativamente alto ya que aprovecha la tendencia natural de los peces a sumergirse cuando están estresados y/o ansiosos, además permite cuantificar el perfil exploratorio mediante la utilización de varios parámetros como la velocidad media, la distancia acumulada o el tiempo de latencia en cada zona (Alzualde *et al.*, 2021).

En el presente estudio se puede observar como la adición de estructuras físicas como plantas artificiales y grava ha demostrado disminuir los comportamientos de estrés y ansiedad proporcionando un enriquecimiento beneficioso durante períodos breves de aislamiento individual (Figura 8C, 8D, 9A y 9B). Se puede observar una preferencia hacia las zonas superiores de las estructuras de enriquecimiento tanto en tiempos de preferencia globales (Figura 8C y 8D) como por intervalos de tiempo (Figura 9A Y 9B). Estas diferentes preferencias son especialmente notorias cuando observamos las gráficas de tiempos de permanencia a distintos intervalos de 60s. En los primeros intervalos de tiempo el pez aún se encuentra alterado, con un estado ansioso expresado por comportamientos erráticos y preferencia por la zona inferior del tanque estéril o “home base”, pero en los intervalos finales (3, 4 y 5 minutos) vemos como los individuos presentan el 50% de su tiempo de permanencia (30 s) en la zona inmediatamente superior a las estructuras de enriquecimiento en el extremo derecha (Figura 9B). En el caso del enriquecimiento en el extremo izquierdo (Figura 9A) y su análisis a intervalos de tiempo también podemos observar esta tendencia, pero de forma menos marcada, en los intervalos finales (3, 4 y 5 minutos) vemos un tiempo de permanencia de alrededor de 20 s (33% de tiempo de análisis en el intervalo).

Respecto a la localización del individuo en el tanque las investigaciones realizadas con anterioridad han demostrado una preferencia por áreas cubiertas del tanque con refugio provisto por la sombra, grava adherida a la base o el uso de una imagen en el fondo del tanque, y plantas artificiales, frente las áreas abiertas del tanque (Hamilton and Dill, 2002). Este efecto podríamos describirlo si analizáramos los tiempos de permanencia en las zonas inferiores del tanque, pero los datos podrían no ser concluyentes ya que las estructuras de enriquecimiento podrían actuar



como barreras estimulando las zonas contrarias en el fondo del tanque o el ascenso hacia zonas inmediatamente superiores.

La evaluación de la distancia (Figura 8B) y velocidad (Figura 8C) media no muestra grandes diferencias debido a que todos los individuos presentan patrones de exploración similares frente a estados de estrés.

Las preferencias en el enriquecimiento de tanques estériles con *Danio rerio* pueden orientar sobre las preferencias de los animales piscícolas en grandes explotaciones. Por ello, a pesar de que el pez cebra es un animal modelo tremendamente útil para guiar a los piscicultores, las distintas formas de enriquecimiento son específicas de cada especie piscícola. Por ejemplo los estudios con bagres (*Clarias gariepinus*, *Heterobranchus longifilis*, *Silurus glanis*, *S. asotus*) demostraron que las estructuras simples en el entorno de crianza, como tiras de plástico, triturados o tubos, pueden proporcionar escondites, inhibir el canibalismo y los ataques agresivos y aumentaron el crecimiento y la supervivencia (Hecht & Appelbaum, 1988; Arsin et al., 2018). También el pargo rojo de manglar (*Lutjanus argentimaculatus*) fue estudiado y demostró que los juveniles crecen más rápido cuando se les proporcionan estructuras duras y complejas, como montones de rocas y raíces de manglares (Mellen and MacPhee, 2001).

En varios estudios con salmónidos se vio que las estructuras de enriquecimiento como los tubos de plástico y la trituración, no sólo pueden mejorar el crecimiento y la supervivencia, sino también la agilidad de natación y la respuesta fisiológica al estrés (niveles reducidos de cortisol en plasma) cuando se presentan factores estresantes (exposición al aire, manipulación, apiñamiento), así como la disminución del daño de las aletas y las infecciones de las aletas relacionadas (Näslund et al., 2014). Un estudio en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) demostró que agregar complejidad en el entorno de crianza no solo promueve las habilidades cognitivas y mejora la plasticidad cerebral, sino que también disminuye la aparición de parásitos y mejora la resistencia a la infección y la supervivencia (Salvanes et al., 2013; Hyvärinen & Rodewald, 2013). Los sustratos de suelo como arena, guijarros, grava, piedras, también puede suponer una mejora como estructura de enriquecimiento, especialmente para aquellas especies que interactúan regularmente con el fondo o viven estrechamente asociadas durante toda su vida (por ejemplo, peces bentónicos). Por ejemplo, la platija verde oliva (*Paralichthys olivaceus*) después de agregar grava al fondo del tanque de crianza donde los peces pueden enterrarse o esconderse mostró un aumento en el comportamiento de reposo, una reducción de la tasa metabólica y una disminución del canibalismo (Dou et al., 2000).

Las estructuras físicas de enriquecimiento también han demostrado proporcionar refugio, sustrato y complejidad en un entorno de cohabitación de diferentes especies. Este es el caso de las estructuras de enriquecimiento para peces limpiadores en la acuicultura del salmón. El lumpo (*Cyclopterus lumpus*) y varias especies de lábridos (*Labrus bergylta*, *Ctenolabrus rupestris*, *Centrolabrus exoletus*) son los peces limpiadores utilizados actualmente como control biológico de los piojos de mar en el salmón de piscifactoría. La búsqueda y el mantenimiento de la salud de los peces limpiadores también tiene gran importancia para favorecer su eficacia como método de control de piojos (Haugland et al., 2020).

En el presente estudio se observó que la introducción de estructuras físicas como plantas de plástico, y sensoriales como fotos de rocas y grava ha tenido un impacto sobre el patrón de natación de los peces estudiados. Los datos muestran como los individuos apuestan por zonas del tanque enriquecidas tras superar los estados iniciales de ansiedad y aumentando los movimientos exploratorios en la zona inmediatamente superior a las estructuras físicas de enriquecimiento. Estos resultados proporcionan una mayor comprensión del enriquecimiento ambiental, que puede ayudar a la mejora de las condiciones de alojamiento tanto de los peces en laboratorio como las grandes explotaciones piscícolas.

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio fueron:

1. La prueba del “Novel tank test” resulta adecuada para analizar preferencias de conducta y la reducción de ansiedad en el pez cebra cuando lo sometemos a distintos tipos de enriquecimiento ambiental.
2. La introducción en el tanque de estabulación de peces cebra de plantas artificiales y fotos que asemejen sustratos naturales como elementos de enriquecimiento ambiental, no altera la velocidad de natación de los mismos ni la distancia recorrida.
3. Los peces cebra introducidos en un tanque de estabulación con enriquecimiento gradual hacia uno de los extremos, aumentan los movimientos exploratorios y el tiempo de permanencia en la zona inmediatamente superior a las estructuras físicas de enriquecimiento, tras superar los estados iniciales de ansiedad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arsin, N. E., Estim, A. and Mustafa, S. (2018) "Behavior and response of japanese catfish (*Silurus asotus*) in captivity provided with an artificial micro-habitat mosaic", *Aquatic Research*, 1(3), pp. 136–139. doi:10.3153/AR18015.
- Adams, M. M. and Kafaligonul, H. (2018) "Zebrafish-A model organism for studying the neurobiological mechanisms underlying cognitive brain aging and use of potential interventions", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. p. 135. doi:10.3389/FCELL.2018.00135
- Alzualde, A., Jaka, O., Latino, D. A. R. S., Alijevic, O., Iturria, I., Hurtado de Mendoza, J., Pospisil, P., Frentzel, S., Peitsch, M. C. Peitsch, Hoeng, J. and Koshibu, K. (2021) "Effects of nicotinic acetylcholine receptor-activating alkaloids on anxiety-like behavior in zebrafish", *Journal of Natural Medicines*. Springer, 75(4), p. 926–941. doi:10.1007/S11418-021-01544-8.
- Arechavala-Lopez, P., Cabrera-Álvarez, M. J., Maia, C. M. and Saraiva, J. L. (2021) "Environmental enrichment in fish aquaculture: A review of fundamental and practical aspects", *Reviews in Aquaculture*. John Wiley & Sons, Ltd, 14(2), pp. 704–728. doi:10.1111/RAQ.12620.
- Ashley, P. J. (2007) "Fish welfare: Current issues in aquaculture", *Applied animal behaviour science*. Elsevier, 104(3–4), pp. 199–235. doi:10.1016/J.APPLANIM.2006.09.001.
- Astone, M., Dankert, E. N., Alam, S. K. and Hoepfner, L. H. (2017) "Fishing for cures: The aLLURE of using zebrafish to develop precision oncology therapies", *npj Precision Oncology 2017 1:1*. Nature Publishing Group, 1(1), pp. 1–14. doi:10.1038/s41698-017-0043-9.
- Dametto, F. S., Fior, D., Idalencio, R., Rosa, J., Fagundes, M., Marqueze, A., Barreto, R. E., Piato, A., & Barcellos, L. (2018). Feeding regimen modulates zebrafish behavior. *PeerJ*, 6, e5343. <https://doi.org/10.7717/peerj.5343>
- Barton, B. A. (2002) "Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids", *Integrative and comparative Biology*, 42 (3), pp. 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Blaser, R. E. and Peñalosa, Y. M. (2011) "Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test", *Physiology & Behavior*. Elsevier, 104(5), pp. 831–837. doi:10.1016/J.PHYSBEH.2011.07.029.
- BioRender. com (2022) BioRender. Disponible <https://app.biorender.com> (Accedido: 1 de julio de 2022)
- Bloomsmith, M. A. and Schapiro, S. J. (1991) "Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman primates", *Laboratory animal science*, 41(4), pp. 372–377
- Braithwaite, V. A. and Salvanes, A. G. V. (2005) "Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild populations", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society, 272(1568), p. 1107. doi:10.1098/RSPB.2005.3062.
- Buenhombre, J., Daza-Cardona, E. A., Sousa, P. and Gouveia, A. (2021) "Different influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: A systematic review", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. Pergamon, 131, pp. 765–791. doi:10.1016/J.NEUBIOREV.2021.09.047.
- Cachat, J. M., Canavella, P. R., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Hart, P. C., Elegante, M. F., Beeson, E. C., Laffoon, A. L., Haymore, W. A. M., Tien, D. H., Tien, A. K., Mohnot, S. and Kalueff, A. V. (2011) "Video-aided analysis of zebrafish locomotion and anxiety-related behavioral responses", *Neuromethods*. Humana Press, 51, pp. 1–14. doi:10.1007/978-1-60761-953-6\_1.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G. and Lee, S. S. (2016) "Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity", *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central, 14(1), p. 65. doi:10.1186/S12951-016-0217-6.
- Chávez, M. N., Aedo, G., Fierro, F. A., Allende, M. L. and Egaña, J. T. (2016) "Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration", *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A., 7, p. 56. doi:10.3389/FPHYS.2016.00056
- Chrousos, G. P. (1998) "Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Ann N Y Acad Sci, 851, pp. 311–335. doi:10.1111/J.1749-6632.1998.TB09006.X.

- Collymore, C., Tolwani, R. J. and Rasmussen, S. (2015) "The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*)", *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. American Association for Laboratory Animal Science, 54(3), pp. 280 -285.
- DePasquale, C. and Leri, J. (2018) "The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*)", *Behavioural processes*. Behav Processes, 157, pp. 638–644. doi:10.1016/J.BEPROC.2018.04.006.
- DePasquale, C., Sturgill, J. and Braithwaite, V. A. (2020) "A Standardized Protocol for Preference Testing to Assess Fish Welfare", *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. Journal of Visualized Experiments, 156 , p. e60674. doi:10.3791/60674.
- Dou, S., Seikai, T. and Tsukamoto, K. (2000) "Cannibalism in Japanese flounder juveniles, *Paralichthys olivaceus*, reared under controlled conditions", *Aquaculture*. Elsevier, 182(1–2), pp. 149–159. doi:10.1016/S0044-8486(99)00256-2.
- 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. and Kalueff, A. V (2009) "Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish". *Behavioural brain research*, 205(1), pp. 38–44. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.022.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A. and Parichy, D. M. (2007) "Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field", <https://home.liebertpub.com/zeb>. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA , 4(1), pp. 21–40. doi:10.1089/ZEB.2006.9997.
- Estes, J. M., Altemara, M. L., Crim, M. J., Fletcher, C. A. and Whitaker, J. W. (2021) "Behavioral and reproductive effects of environmental enrichment and pseudoloma neurophilia infection on adult zebrafish (*Danio rerio*)", *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. American Association for Laboratory Animal Science, 60(3), pp. 249- 258. doi:10.30802/AALAS-JAALAS-20-000113.
- Facciol, A., Tran, S. and Gerlai, R. (2017) "Re-examining the factors affecting choice in the light–dark preference test in zebrafish", *Behavioural Brain Research*, 327, pp. 21–28. doi:10.1016/J.BBR.2017.03.040.
- Fernandes Silva, P., Garcia de Leaniz, C. and Luchiari, A. C. (2019) "Corrigendum to “Fear contagion in zebrafish: a behaviour affected by familiarity” [Animal Behaviour 153 (2019) 95–103]", *Animal Behaviour*. Academic Press, 156, p. 153. doi:10.1016/J.ANBEHAV.2019.07.010.
- Fontana, B. D., Alnassar, N. and Parker, M. O. (2022) "The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light–dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds", *Psychopharmacology*. Springer, 239(1), pp. 287 -296. doi:10.1007/S00213-021-05990-W.
- Forsatkar, M. N., Safari, O. and Boiti, C. (2017) "Effects of social isolation on growth, stress response, and immunity of zebrafish", *Acta Ethologica*. Springer Verlag, 20(3), pp. 255–261. doi:10.1007/S10211-017-0270-7
- Franks, B., Sebo, J. and Horowitz, A. (2018) "Fish are smart and feel pain: What about joy?". *Animal Sentience*, 21(16). doi:10.51291/2377-7478.1368.
- Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R. and Poss, K. D. (2013) "The zebrafish as a model for complex tissue regeneration", *Trends in Genetics*. Elsevier Current Trends, 29(11), pp. 611–620. doi:10.1016/J.TIG.2013.07.003.
- 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. and Barcellos, L. J. G. (2015) "My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish", *Physiology & Behavior*. Elsevier, 139, pp. 182–187. doi:10.1016/J.PHYSBEH.2014.11.035.
- Prism (2018) GraphPad Prism (*Version 8.0.1*) [*Programa de ordenador*]. Disponible en: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) (Accedido: 10 de 03 de 2022).
- Gutiérrez-Lovera, C., Vázquez-Ríos, A. J., Guerra-Varela, J., Sánchez, L. and de la Fuente, M. (2017) "The potential of zebrafish as a model organism for improving the translation of genetic anticancer nanomedicines" , *Genes 2017, Vol. 8, Page 349*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Genes, 8(12), p. 349. doi:10.3390/GENES8120349.
- Hamilton, I. M. and Dill, L. M. (2002) "Monopolization of food by zebrafish (*Danio rerio*) increases in risky habitats". *NRC Research Press Ottawa, Canadian Journal of Zoology*, 80(12), pp. 2164–2169. doi:10.1139/Z02-

- Hasumura, T. and Meguro, S. (2016) "Exercise quantity-dependent muscle hypertrophy in adult zebrafish (*Danio rerio*)", *J Comp Physiol B*, 186, pp. 603–614. doi:10.1007/s00360-016-0977-1.
- Hecht, T. and Appelbaum, S. (1988) "Observations on intraspecific aggression and coeval sibling cannibalism by larval and juvenile *Clarias gariepinus* (Clariidae: Pisces) under controlled conditions", *Journal of Zoology*. John Wiley & Sons, Ltd, 214(1), pp. 21–44. doi:10.1111/J.1469-7998.1988.TB04984.X.
- Hyvärinen, P. and Rodewald, P. (2013) "Enriched rearing improves survival of hatchery-reared Atlantic salmon smolts during migration in the River Tornionjoki", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. NRC Research Press, 70(9), pp. 1386–1395. doi:10.1139/CJFAS-2013-0147.
- Jeevanandam, J., Chan, Y. S. and Danquah, M. K. (2019) "Zebrafish as a Model Organism to Study Nanomaterial Toxicity", *Emerging Science Journal*. Ital Publication, 3(3), pp. 195–208. doi:10.28991/ESJ-2019-01182.
- Juell, J.-E. (1995) "The behaviour of Atlantic salmon in relation to efficient cage-rearing". *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5, pp. 320-335. <https://doi.org/10.1007/BF00043005>
- Kalueff, A. V., Echevarria, D. J. and Stewart, A. M. (2014) "Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research", *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, pp. 1-6. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.01.022.
- Kareklas, K., Elwood, Robert W. and Holland, R. A. (2018) "Grouping promotes risk-taking in unfamiliar settings", *Behavioural Processes*. Elsevier, 148, pp. 41–45. doi:10.1016/J.BEPROC.2018.01.003.
- Krueger, L. D., Thurston, S. E., Kirk, J., Elsaedi, F., Freeman, Z. T., Goldman, D., Lofgren, J. L. and Keller, J. M. (2020) "Enrichment preferences of singly housed zebrafish (*Danio rerio*)", *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. American Association for Laboratory Animal Science, 59(2), p. 148. doi:10.30802/AALAS-JAALAS-19-000078.
- Kurtzman, M. S., Craig, M. P., Grizzle, B. K. and Hove, J. R. (2010) "Sexually segregated housing results in improved early larval survival in zebrafish", *Lab Animal* 2010 39:6. Nature Publishing Group, 39(6), pp. 183–189. doi:10.1038/labon0610-183.
- Lee, C. J., Paull, G. C. and Tyler, C. R. (2019) "Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*". *Journal of fish biology*, 94(1), pp. 86–95. doi:10.1111/JFB.13865.
- Levina, A. D., Mikhailova, E. S. and Kasumyan, A. O. (2021) "Taste preferences and feeding behaviour in the facultative herbivorous fish, *Nile tilapia Oreochromis niloticus*", *Journal of Fish Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 98(5), pp. 1385–1400. doi:10.1111/JFB.14675.
- Lidster, K., Readman, G. D., Prescott, M. J. and Owen, S. F. (2017) "International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research", *Journal of Fish Biology*, 90 (5), pp. 1891–1905. doi:10.1111/jfb.13278.
- Luchiari, A. C. and Chacon, D. M. M. (2013) "Physical exercise improves learning in zebrafish, *Danio rerio*", *Behavioural Processes*. Elsevier, 100, pp. 44–47. doi:10.1016/J.BEPROC.2013.07.020.
- Marcon, M., Mocelin, R., Benvenuti, R., Costa, T., Herrmann, A. P., De Oliveira, D. L., Koakoski, G., Barcellos, L. J. G. and Piato, A. (2018) "Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish", *The Journal of Experimental Biology*, 221(4). doi: 10.1242/jeb.176735
- Maximino, C., Benzecry, R., Matos Oliveira, K. R., De Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A. M., Broock Rosemberg, D., De Oliveira, D. L. and Blaser, R. (2012) "A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish", *Behaviour*. Brill, 149(10–12), pp. 1099–1123. doi:10.1163/1568539X-00003029.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S. and Gouveia, A. (2010) "Measuring anxiety in zebrafish: A critical review", *Behavioural Brain Research*. Elsevier, 214(2), pp. 157–171. doi:10.1016/J.BBR.2010.05.031.
- Maximino, C., Marques De Brito, T., De Mattos Dias, C. A. G., Gouveia, A. and Morato, S. (2010) "Scototaxis as anxiety-like behavior in fish", *Nature Protocols* 2010 5:2. Nature Publishing Group, 5(2), pp. 209–216. doi:10.1038/nprot.2009.225.

- Mellen, J. and MacPhee, M. S. (2001) "Philosophy of environmental enrichment: Past, present, and future", *Zoo Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 20(3), pp. 211–226. doi:10.1002/ZOO.1021.
- Mellor, D. J. (2016) "Updating animal welfare thinking: Moving beyond the "Five Freedoms" towards "A Life Worth Living", *Animals* 2016, Vol. 6, Page 21. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 6(3), p. 21. doi:10.3390/ANI6030021.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. and Moon, T. W. (1999) "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation". *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, pp. 211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Näslund, J., Orgen, J. and Johnsson, I. (2014) "Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates", *Fish and Fisheries*, 17, pp. 1-30. doi:10.1111/faf.12088.
- Noldus (2021) Ethovision XT (*Versión 16*) [*Programa de ordenador*] Wageningen: Noldus.
- Reed, B. and Jennings, M. (2011) "Guidance on the housing and care of Zebrafish, *Danio rerio*", *Barney Reed and Maggy Jennings, Research Animal Department, Science Group, RSPCA*
- Reid, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F. (1998) "The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. Pergamon, 120(1), pp. 1–27. doi:10.1016/S0742-8413(98)00037-1.
- Salvanes, A. G., Moberg, O., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Jensen, K. H. and Braithwaite, V. A. (2013) "Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish", *Proceedings. Biological sciences*, 280 (1767), 20131331. doi:10.1098/rspb.2013.1331.
- Schroeder, P., Jones, S., Young, I. S. and Sneddon, L. U. (2014) "What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment", *Laboratory animals*, 48(4), pp. 328–337.. doi:10.1177/0023677214538239.
- Selye, H. (1976) "Stress without Distress". Le stress sans detresse. *Bruxelles medical*, 56(5), pp. 205–210. doi:10.1007/978-1-4684-2238-2\_9.
- Shao, T., Shi, W., Zheng, J. Y., Xu, X. X., Lin, A. F., Xiang, L. X. and Shao, J. Z. (2018) "Costimulatory function of Cd58/Cd2 interaction in adaptive humoral immunity in a zebrafish model". *Frontiers in immunology*, 9, p. 1204. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01204>
- Spagnoli, S., Xue, L. and Kent, M. L. (2015) "The common neural parasite *Pseudoloma neurophilia* is associated with altered startle response habituation in adult zebrafish (*Danio rerio*): Implications for the zebrafish as a model organism", *Behavioural Brain Research*. Elsevier, 291, pp. 351–360. doi:10.1016/J.BBR.2015.05.046.
- Spence, R. (2011) "Zebrafish Ecology and Behaviour", *Neuromethods*. Humana Press, Totowa, NJ, 52, pp. 1–46. doi:10.1007/978-1-60761-922-2\_1.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C. (2008) "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*", *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(13), pp. 13–34. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
- Stevens, Chloe H., Reed, B. T. and Hawkins, P. (2021) "Enrichment for laboratory zebrafish—A review of the evidence and the challenges", *Animals : an Open Access Journal from MDPI*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 11(3), pp. 698. doi:10.3390/ANI11030698.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A. and Kalueff, A. V. (2012) "Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review", *Neuropharmacology*. NIH Public Access, 62(1), p. 135. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2011.07.037.
- Sundin, J., Morgan, R., Finnøen, M. H., Dey, A., Sarkar, K. and Jutfelt, F. (2019) "On the observation of wild zebrafish (*Danio rerio*) in India", *Zebrafish*, 16(6), pp. 546–553. doi:10.1089/ZEB.2019.1778.
- Suriyampola, P. S., Shelton, D. S., Shukla, R., Roy, T., Bhat, A. and Martins, E. P. (2016) "Zebrafish social behavior in the wild", *Zebrafish*, 13(1), pp. 1–8. doi:10.1089/ZEB.2015.1159.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997) "The stress response in fish", *Physiological reviews*, 77(3), pp. 591–625. doi:10.1152/PHYSREV.1997.77.3.591.

White, L. J., Thomson, J. S., Pounder, K. C., Coleman, R. C. and Sneddon, L. U. (2017) "The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*". *Animal Behaviour*, 132, pp. 189-199. doi:10.1016/j.anbehav.2017.08.017.

Williams, T. D., Readman, G. D., Owen, S. F. and Williams, T. (2009) "Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species". *Laboratory animals*, 43(2), pp. 107-120. doi:10.1258/la.2007.007023.