



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Efecto del aislamiento social temprano sobre la evaluación de riesgo en peces cebra

Tesis de licenciatura

Valentin Azar

Directora: Violeta Medan

Laboratorio de Integración Multisensorial y Evaluación de Riesgo
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIBYNE- CONICET- UBA)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Diciembre 2024

Directora

Estudiante

Índice

1. Resumen.....	4
2. Título y resumen en inglés.....	5
3. Introducción.....	6
4. Objetivos e hipótesis.....	15
5. Materiales y métodos.....	16
5.1. Animales.....	16
5.2. Grupos experimentales.....	17
5.3.0 Ensayo de interacción social.....	19
5.3.1 Dispositivo experimental.....	19
5.3.2 Protocolo de interacción social.....	20
5.3.3 Análisis de la interacción social.....	21
5.4.0 Ensayo para evaluar el comportamiento de escape.....	22
5.4.1 Estímulos.....	22
5.4.2 Dispositivo experimental.....	24
5.4.3 Protocolo de evaluación de la respuesta de escape.....	26
5.4.4 Análisis de la evaluación de riesgo.....	27
5.5. Análisis estadísticos.....	29
6. Resultados.....	30
6.1.0 Efecto del aislamiento sobre la preferencia social visual.....	30
6.1.1 Actividad durante el período de aclimatación.....	31
6.1.2 Actividad durante el período de interacción social.....	34
6.2. Arena de escape.....	40
6.3. Aislamiento Parcial.....	51
7. Discusión y Conclusión.....	54
8. Bibliografía.....	60

Agradecimientos

A mi familia por bancarme tantos años y brindarme todo lo necesario para poder llegar hasta acá. A mi novia Victoria, y a su familia, porque fueron mi segundo apoyo durante el último tramo de la carrera.

A Viole por aceptarme como tesista y por ser un modelo a seguir. Desde la primera entrevista me hizo sentir muy cómodo, a lo largo de la licenciatura aprendí un montón de cosas gracias a ella e hizo del laboratorio un ambiente ameno. Recomiendo fuertemente estar bajo su tutela, se nota que le apasiona la investigación y que sabe donde quiere estar. A Nico y a Valen, porque sin ellos esta tesis no se hubiese podido hacer. Gracias a ellos hoy en día puedo “manejarme” con Python y entendí conceptos que para mí eran imposibles de explicar con claridad.

Al grupo Szczupak: Lidia, Martina, Grace, Fede, Ale, porque a través de los seminarios y los “social” pude amoldarme al grupo, y aprender cómo dar una presentación decente. Junto con el grupo Medan me hicieron sentir parte de una familia grande y académica.

A los mejores amigos que me pudo dar la facultad y con los que no se puede aguantar un segundo sin reírse: Juan, Tefa, Meli, Romi, Sany, Agos, Caro, Deni. Mención especial para Tomi que fue mi compañero de cursada en las últimas materias. A cualquier persona que me haya ayudado con un apunte, un consejo o lo que sea en la carrera, gracias.

A mis amigos del colegio y a las chicas del sur, porque a pesar de no poder estar en todas las juntadas siempre me hacen sentir bien y en un ambiente lindo.

A la Universidad de Buenos Aires por darme la oportunidad de estudiar y formarme en un área que me interesa mucho y que no se puede estudiar en cualquier lugar.

A mi gata Olivia porque fue la mayor inspiración que tuve para estudiar el comportamiento animal, así como también a Zoboomafoo, a Jeff Corwin y a Nick Baker. Y bueno, a todos los animales con los que me cruzo día por medio.

“Que la gente crea porque tiene con qué creer”
- Marcelo Gallardo

1. Resumen

Un aspecto fundamental de los comportamientos adaptativos es su capacidad de cambiar en base a la experiencia previa. En particular, la experiencia producto de la interacción social temprana tiene un papel central en el correcto establecimiento de patrones comportamentales. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la interacción social modela la conducta están lejos de estar totalmente comprendidos. Los peces cebra (*Danio rerio*) son animales sociales que se agregan en grupo tanto en la naturaleza como en el laboratorio y tienen un desarrollo relativamente rápido que no requiere cuidado parental. Esto último permite desacoplar el efecto de la interacción social durante el desarrollo temprano del cuidado parental. En el contexto de la evaluación de riesgo, los peces cebra pueden adoptar comportamientos antipredatorios que incluyen una variedad de respuestas de escape rápidas. Las respuestas de escape surgen a los pocos días de la eclosión. Sin embargo, el tipo de estímulos que las desencadenan y su modulación sufre maduración durante el desarrollo por lo que podrían ser afectadas por una situación de adversidad extrema como el aislamiento temprano. *Este trabajo se pregunta si el aislamiento temprano afecta la toma de decisiones durante un peligro inminente.* En primer lugar, evaluamos si el aislamiento social durante las primeras semanas de vida produce déficits en la interacción social visual. Observamos que a diferencia de los animales control, los animales aislados no muestran una preferencia visual por sus coespecíficos. Por otra parte, encontramos que el aislamiento social temprano incrementa la percepción del riesgo representado por estímulos acústicos, visuales o su combinación. Esto se evidencia como una mayor probabilidad de ejecutar un escape en los animales aislados que los animales control, especialmente luego de la tercera semana de aislamiento. En conjunto, los resultados señalan que en peces cebra, el aislamiento durante las primeras semanas de desarrollo no sólo altera la interacción social sino que impacta en la evaluación de peligro disminuyendo los umbrales de respuesta. La disminución en la tendencia a agregarse (menor preferencia visual por coespecíficos) sumada a una reactividad exacerbada frente a estímulos sensoriales podría determinar decisiones maladaptativas.

Palabras clave: Pez cebra, Aislamiento, Respuesta de Escape, Comportamiento Social, C-start.

2. Título y resumen en inglés

Effect of Early Social Isolation on Risk Assessment in Zebrafish

A fundamental aspect of adaptive behaviors is their ability to change based on prior experience. In particular, experience derived from early social interactions plays a central role in the proper establishment of behavioral patterns. However, the mechanisms through which social interaction shapes behavior are far from fully understood. Zebrafish (*Danio rerio*) are social animals that aggregate in groups both in the wild and in laboratory settings. They exhibit a relatively rapid development that does not require parental care, allowing the disentanglement of the effects of early social interaction from parental influence.

In the context of risk assessment, zebrafish can adopt antipredatory behaviors that include a variety of rapid escape responses. These escape responses emerge within a few days post-hatching. However, the types of stimuli that trigger these responses and their modulation undergo maturation during development, making them susceptible to extreme adverse conditions such as early isolation. This study investigates whether early isolation affects decision-making during imminent danger.

First, we evaluated whether social isolation during the first weeks of life results in deficits in visual social interaction. Unlike control animals, isolated individuals did not show a visual preference for their conspecifics. Additionally, we found that early social isolation increases risk perception represented by acoustic, visual, or combined stimuli. This was evidenced by a higher probability of executing escape responses in isolated animals compared to controls, particularly after the third week of isolation.

Together, the results indicate that in zebrafish, isolation during the early weeks of development not only disrupts social interactions but also impacts danger assessment by lowering response thresholds. The reduction in aggregation tendencies (lower visual preference for conspecifics) combined with heightened reactivity to sensory stimuli could lead to maladaptive decision-making.

Keywords: Zebrafish, Isolation, Escape, Social, C-start.

3. Introducción

Un aspecto central de los comportamientos adaptativos es su capacidad de cambiar en base a la experiencia previa. Durante el desarrollo temprano, mientras el sistema nervioso madura y establece sus circuitos, los animales somos particularmente sensibles a estímulos externos durante períodos críticos; la ausencia de estimulación adecuada en estos períodos puede potencialmente producir déficits que persisten en la adultez (Ismail et al. 2017; Yazaki-Sugiyama 2019; Hensch et al. 2005). En particular, la interacción social durante el desarrollo postnatal temprano tiene un papel central en el establecimiento de patrones conductuales adecuados. Los humanos exhiben comportamientos sociales desde el nacimiento (Xiao et al. 2014) y está bien establecido en la literatura que situaciones de adversidad extrema durante la infancia como el aislamiento social representan un factor de riesgo para diversas psicopatologías como depresión, desórdenes de ansiedad, de tipo autista y patologías relacionadas con el estrés excesivo (Banerjee et al. 2014; Teicher et al. 2003). Sin embargo, debido a que los circuitos neuronales que median el comportamiento social innato en humanos se establecen in utero, se conoce poco respecto a su desarrollo normal o patológico, su anatomía y su función.

El estudio de la interacción social durante el desarrollo temprano es complicado por el hecho de que, en la mayor parte de los mamíferos incluidos los roedores, es difícil disociar la interacción con conspecíficos del cuidado materno. En los roedores, por ejemplo, la madre no sólo proporciona leche, sino que también juega un papel crucial en el desarrollo sensorial y emocional de las crías a través de comportamientos como el licking (lamido), el acicalamiento y la creación de un ambiente olfativo adecuado. Estos cuidados ayudan a regular la temperatura corporal de las crías, pero también son fundamentales para la formación de vínculos materno-filiales, promovidos a través de señales olfativas y auditivas que las crías emiten para atraer la atención de la madre (Nagasawa et al. 2012). Por este motivo, no se puede disociar el efecto del aislamiento social de los efectos de la deprivación materna. En contraposición, vertebrados sociales como el pez cebra no requieren cuidado parental por lo que el aislamiento social puede estudiarse esencialmente desde el momento de la fecundación.

El pez cebra, *Danio rerio*

Los peces cebra son vertebrados sociales que tienden a agregarse en grupos tanto en la naturaleza como en el laboratorio (Spence et al. 2008), y a diferencia de los mamíferos, presentan desarrollo externo y no requieren de cuidado parental. Su mantenimiento y desarrollo en el laboratorio es económico en términos de tiempo y cantidad

de alimento respecto a otros modelos animales. Al tener un tamaño promedio de 3 cm cuando son adultos, los requerimientos de espacio para su alojamiento también son menores a los de otros modelos animales.

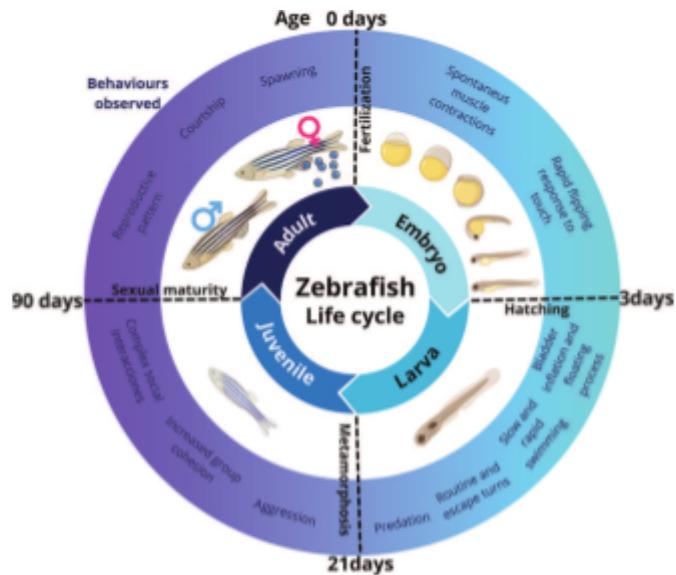


Figura 1: Ciclo de vida del pez cebra *Danio rerio* (tomado de Elizalde-Velázquez et al 2023).

Los peces cebra tienen un desarrollo relativamente rápido. Entre la fecundación y la eclosión del huevo pasan entre 48/72 hs, lo que es seguido por un período larval en el cual el animal comienza a nadar, se infla la vejiga natatoria, se comienzan a mover las mandíbulas, los opérculos, las aletas y los ojos (Kimmel et al. 1995). A partir de los 7 días post fecundación [dpf] los animales comienzan a alimentarse (antes lo hacen exclusivamente del vitelo). Luego del período larval postembrionario (aproximadamente hasta 21 dpf) prosigue un estadío juvenil donde se desarrollan todas las características de un individuo adulto a excepción de la madurez sexual, que se alcanza aproximadamente a los 90 dpf (Figura 1) (Parichy et al. 2009, Singleman et al. 2014). Las hembras de pez cebra realizan puestas que rondan los 100-200 huevos. Esto asegura la provisión de una gran cantidad de individuos que, al momento de realizar las series experimentales, permite controlar muy bien tanto la edad como el background genético de los individuos.

El genoma de los peces cebra está completamente secuenciado y presenta una homología relativamente alta con el genoma humano. Un 70% de los genes humanos poseen al menos un ortólogo en el genoma del pez cebra (Howe et al. 2013), lo que permite estudiar en peces cebra rasgos del comportamiento cuyas bases fisiológicas y genéticas están conservadas evolutivamente. Los peces cebra ofrecen una variedad de herramientas para estudios mecanísticos del sistema nervioso (Meshalkina et al. 2018; Rea & Van Raay 2020). Esto incluye herramientas genéticas, de biología molecular y la posibilidad de

register la actividad neuronal *in vivo* (utilizando electrofisiología o imaging de calcio) en simultáneo con el registro comportamental. Por todas estas razones, constituyen un modelo interesante para estudiar los efectos del aislamiento social en el desarrollo temprano a nivel comportamental y mecanístico.

Si bien en esta tesis analizamos únicamente efectos del aislamiento a nivel comportamental, este trabajo se encuadra en una línea de investigación del laboratorio que pretende relacionar cambios en el comportamiento producto del aislamiento social con cambios en la actividad del sistema nervioso y estructuras específicas del cerebro (como el tectum óptico y la habénula) usando imaging de calcio.

Conductas sociales en peces cebra

El repertorio de conductas sociales de los peces cebra incluye el establecimiento de jerarquías sociales, comportamientos agonísticos (Zabegalov et al. 2019), cortejos elaborados, el nado en cardúmenes (Buske and Gerlai 2011) (**Figura 2**) y la preferencia visual por conespecíficos (Dreosti et al. 2015). Los comportamientos sociales no aparecen todos simultáneamente sino que se van manifestando conforme el animal se va desarrollando. Por lo tanto, si bien el comportamiento agonístico o el comportamiento de cortejo aparecen en individuos juveniles o adultos, la preferencia visual por conespecíficos se manifiesta de manera mucho más temprana (Dreosti et al 2015; Busque and Gerlai 2011). En particular, si bien durante la primera semana de vida los animales no tienden a agregarse, luego del día 7 post fecundación disminuye la distancia entre individuos y comienza a organizarse el comportamiento de *shoaling* (Groneberg et al. 2020; Hinz and de Polavieja 2017). Dicha preferencia social depende de la visión y requiere que los peces observados sean de tamaño y patrón de pigmentación similar (Engeszer et al. 2004). A medida que las larvas crecen, no solo desarrollan una preferencia por la cercanía con otros peces de la misma especie, sino que también comienzan a coordinar sus comportamientos con los demás, lo que es un precursor de comportamientos sociales más complejos, como el nado en cardumen, presente a partir de los 10 dpf. Al igual que muchas otras especies, los peces cebra son susceptibles al aislamiento social, particularmente si esto ocurre durante el desarrollo temprano (Spence et al. 2008). Recientemente, se mostró que peces cebra adultos que vivieron desde la eclosión en aislamiento social muestran hiperreactividad, menor cohesión grupal, cambios en el sistema dopaminérgico (Shams et al. 2020; Scerbina et al. 2012; Saszik & Smith 2018) y serotoninérgico (Tunbak et al 2020; Varga et al 2020). También se mostró que presentan neurogénesis anómala en estructuras sensoriales primarias incluyendo el bulbo olfatorio y el tectum óptico (Lindsey & Tropepe 2014) lo que podría condicionar el procesamiento sensorial.

La cohesión social tiene múltiples ventajas que incluyen incrementar la posibilidad de hallar fuentes de alimento (Ward & Hart 2005) y las oportunidades de reproducción.



Figura 2: Imagen de peces cebra realizando “shoaling”, un tipo de comportamiento en donde los individuos permanecen juntos formando un cardumen (foto tomada de <https://www.expertoanimal.com/cuidados-del-pez-cebra-22532.html>).

Pero la ventaja más evidente es la disminución del riesgo de predación, ya que permanecer en un grupo aumenta las chances de detectar posibles predadores y disminuye la probabilidad de ser capturado (Magurran 1990).

Comportamientos evasivos en pez cebra

Los comportamientos evasivos, presentes en la enorme mayoría de los animales, constituyen estrategias antipredatorias críticas para la supervivencia que pueden consistir en camuflarse con el entorno, congelarse para evitar ser detectado (freezing) o ejecutar diversos tipos de escape en función de las características de los estímulos de peligro que se perciban. En muchos animales las redes neuronales que subyacen a estos comportamientos se hallan parcialmente descriptas y muestran rasgos conservados incluso entre invertebrados y vertebrados (Evans et al. 2019, Branco T. & Redgrave P. 2020).

En peces cebra existen una variedad de comportamientos evasivos. Los peces cebra pueden reaccionar frente al peligro realizando una variedad de respuestas de alarma, que incluyen congelamiento, nados rápidos en zig-zag, erizamiento de las aletas, etc. (Smith, R. J. F. 1992; Kalueff, A. V. et al. 2013) y en los casos en que se percibe un peligro inminente, escapes muy rápidos conocidos como C-start (Eaton et al. 1988, Korn, H. & Faber, D. S. 2005; Budick, S. A. & O’Malley, D. M. 2000).

La respuesta C-start

La respuesta de tipo C-start es una maniobra de escape de muy alta velocidad que se gatilla especialmente cuando el animal percibe un peligro abrupto e inminente. El C-start consiste en una primera fase en donde el cuerpo del pez asume un perfil en C debido a la contracción de la musculatura axial de uno de los lados del cuerpo (típicamente el contralateral a la dirección del estímulo de peligro) que dura alrededor de 8 ms rotando el cuerpo 30-100° con respecto al centro de masa y que se denomina C1 (**Figura 3**). Luego se observa una segunda fase (C2) en donde el individuo acelera sobre su eje axial, desplazando el centro de masa en una trayectoria de escape contraria al origen del estímulo aversivo (Eaton et al. 1988). Si bien ambas fases están muy conservadas en todos los peces teleósteos, pueden variar en términos de latencia, desplazamiento angular y distancia recorrida en función de la especie y el tamaño del individuo.

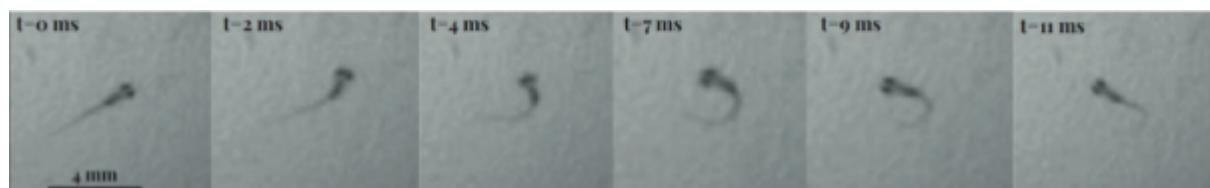


Figura 3: Fotogramas de la respuesta C-start rápida en larvas de peces cebra.

La respuesta tipo C-start es desencadenada por un circuito neuronal identificado y centrado en la actividad de un par de células reticuloespiniales conocidas como células Mauthner. Este circuito está presente a los 4 dpf y permanece a lo largo de toda la vida (Eaton, R. C. & Farley, R. D. 1975). En los últimos años, nuestro laboratorio ha estudiado diversos aspectos de la respuesta C-start y el circuito neuronal de la célula Mauthner en peces dorados adultos. Específicamente, ha realizado una caracterización detallada de la relación entre la saliencia de los estímulos de peligro y tipo y probabilidad de comportamientos evasivos (Otero Coronel et al. 2020; Martorell, N. & Medan, V. 2021), de las características del procesamiento de información sensorial que se lleva a cabo en la célula Mauthner (Medan et al. 2017; Otero-Coronel et al. 2024) y del efecto ejercido por neuromoduladores como la dopamina (Medan, V. & Preuss, T. 2011) y la serotonina (Curtin et al 2013; Medan, V. & Preuss, T. 2014) en el circuito del escape. Sin embargo, el tipo de estímulos que desencadenan la respuesta de escape parecen sufrir una maduración durante el desarrollo (Eaton et al, 1977) y no necesariamente ser los mismos en peces cebra que en peces dorados.

Respuestas rápidas y lentas

En larvas de pez cebra, se han descripto dos tipos de respuesta tipo C-start en función de la duración de la fase C1, es decir entre el inicio de escape y el momento en que el animal alcanza su máxima curvatura. Estos dos tipos de escape se denominan C-starts de corta latencia (SLC, short latency C-start) y C-starts de latencia larga (LLC, long latency C-start) (Burgess and Granato 2007, Troconis et al. 2017, Marquart et al. 2019).

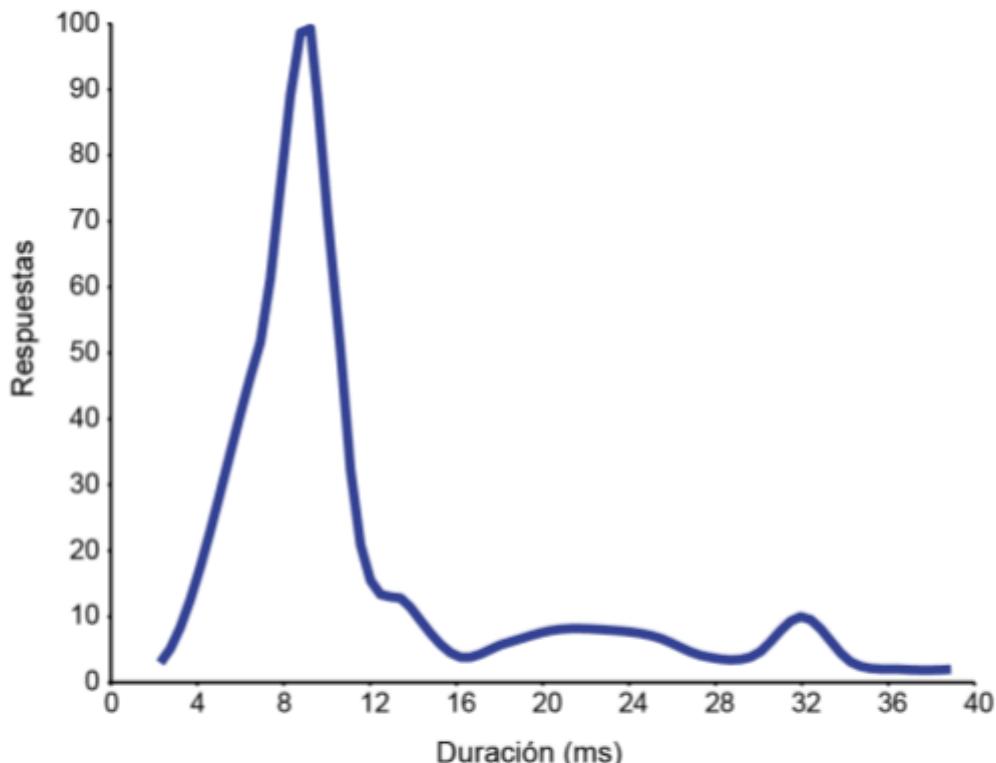


Figura 4: Histograma de duración de la fase C1 de las respuestas de escape. El número de respuestas totales es de n=247. Los fotogramas superpuestos representan imágenes de intervalo de tiempo de C1 para larvas que realizan un SLC o un LLC, codificadas por color según milisegundos posteriores al estímulo (Marquart et al. 2019).

En la **Figura 4** se observa la distribución de la duración de la fase C1 (en milisegundos) de 247 respuestas tipo C-start que registramos en peces cebra (N= 200) en respuesta a distintos tipos de estímulos auditivos y visuales. Como se observa de la distribución se puede destacar un pico a aproximadamente a 9 ms y una cola de distribución más amplia entre 16 y 36 ms de duración. Las dos partes de la distribución de duraciones corresponden a los dos tipos de C-start mencionados antes, los SLC (pico en 9 ms) y los LLC (de una distribución de duración mayor).

Larvas de peces cebra pueden ejecutar ambas respuestas de escape SLC y LLC en diferentes ensayos, incluso de estímulos de la misma intensidad, en donde las respuestas

SLC son del tipo “a todo o nada”, mientras que las respuestas LLC tienen un repertorio cinético de mayor varianza, son menos vigorosas, resultando en un desplazamiento menor (Marquart et al. 2019). Se ha reportado que al aumentar la intensidad de un dado estímulo aumenta la probabilidad de evocar una respuesta SLC y a su vez disminuir su latencia mientras que se reduce la probabilidad de que ocurra un LLC. Esto se debe a que los SLC son respuestas que sirven precisamente cuando la velocidad es crítica para la supervivencia (Troconis et al. 2017). En base a el criterio tomado en trabajos previos, en esta tesis definimos a los SLC como escapes de una duración del C1 menor o igual a 13 ms y a los LLC como escapes cuya duración del C1 fue mayor a 13 ms (Burgess & Granato 2007).

La existencia de diferentes tipos de escapes rápidos, más allá de ilustrar la variedad de respuestas motoras que presentan estas larvas incluso pocos días después de haber eclosionado, indican que la evaluación de riesgo no se resume en la decisión binaria de escapar/no escapar sino que existe un abanico de opciones comportamentales que son seleccionadas en base a factores tales como la presencia de refugios, la presencia de otros coespecíficos, la competencia entre la decisión de escapar o alimentarse o realizar un cortejo. Y una vez tomada la decisión de que, efectivamente, se realizará un escape el tipo de escape puede seleccionarse en base a la peligrosidad y urgencia percibida por el animal.

La integración multisensorial contribuye a la toma de decisiones disminuyendo la ambigüedad de la información del ambiente

Teniendo en cuenta que la decisión de escapar depende de la percepción de riesgo que realiza el animal, cabe entonces preguntarse cómo se detecta el peligro y qué estrategias existen para evaluar su magnitud. El ambiente está permanentemente emitiendo estímulos que nuestros sistemas sensoriales pueden captar. Pero sólo algunos de esos estímulos señalan peligro. Otros señalan fuentes de comida, refugios, coespecíficos y muchos simplemente deben ser filtrados e ignorados. Pero, por otra parte, los predadores suelen emplear estrategias para disminuir la “señal” de peligro que emiten y así no ser detectados y en muchos casos, las señales (de peligro o no) son ambiguas o ruidosas. Por ejemplo, si un pez cebra se vale únicamente de claves visuales para detectar a su predador, el agua podría estar turbia, o podría ser de noche, o podría no estar observando en la dirección adecuada. En esa situación, donde las claves ambientales son ambiguas o débiles o la información relevante está mezclada con otra que no lo es, es fundamental poder combinar las señales provenientes de diferentes sentidos, ya que son representaciones independientes del mismo estímulo. Un predador que se acerca podría minimizar el ruido

que produce, ocultarse para tratar de no ser visto y aproximarse en contra de la corriente (de agua o de aire) para no ser oido. Pero si la presa puede integrar una información acústica muy leve, con algunas señales visuales sospechosas y un leve olor a predador incrementa mucho sus chances de detectar a tiempo el predador y evitar ser comido.

En términos más formales, el sistema nervioso maximiza la detección de eventos externos mediante la integración multisensorial, donde la información de diferentes sentidos se sintetiza. Este proceso no está presente al nacer y se desarrolla a medida que el cerebro adquiere experiencia. La convergencia de información de múltiples sentidos en neuronas específicas permite mejorar la saliencia fisiológica, facilitar juicios sobre la identidad de un estímulo y acelerar respuestas. Los principios que guían la integración multisensorial se relacionan con la relación espacial y temporal entre estímulos, así como con la intensidad de las respuestas neuronales (Stein et al 2014; Stein et al 2008; Benjamin A. Rowland 2007). Estímulos con una asociación temporal y/o espacial más estrecha tendrán mayor probabilidad de ser asociados ya que el cerebro “infiere” que si dos señales coinciden en el espacio y/o el tiempo probablemente provengan de una misma fuente (Rohe & Noppeney, 2015). Respecto a la intensidad, la integración multisensorial muestra un efecto de *efectividad inversa* respecto a la saliencia de los estímulos (Stevenson 2009). Es decir que la ganancia (en términos de información) de combinar dos señales débiles será proporcionalmente mayor a la de combinar estímulos fuertes, que de por sí ya informan sin ambigüedades lo que está sucediendo.

La integración multisensorial también juega un papel crucial en cómo percibimos y respondemos a señales sociales, como el lenguaje verbal y no verbal. Por ejemplo, los gestos y expresiones faciales se combinan con el tono de voz para crear una comprensión más rica de la comunicación (Zhang et al. 2022) o facilitar interacciones sociales complejas, como el cortejo y la comunicación de peligro. Por ejemplo, muchas especies utilizan señales visuales y acústicas simultáneamente para aumentar la efectividad de sus mensajes, lo que puede influir en su éxito reproductivo y en la cohesión grupal (Briefer et al 2024). Consecuentemente, la incapacidad para integrar estas señales puede afectar las interacciones sociales y producir desventajas adaptativas. Dado que la integración multisensorial emerge durante el desarrollo y es críticamente dependiente de la interacción con el medio (Stein, Stanford, Rowland 2014; Senna et al. 2021), el aislamiento social temprano podría producir déficits en la integración multisensorial (Dionne-Dostie et al. 2015). De esta forma, un individuo aislado podría no procesar la información proveniente de diferentes fuentes sensoriales del mismo modo que un individuo que se desarrolló en un contexto social. Cuando un estímulo es percibido, el animal le asigna una *saliencia* al

estímulo, entendida como la relación entre la intensidad del estímulo y la probabilidad de evocar una respuesta. El aislamiento social podría alterar la saliencia de los estímulos, por ejemplo, el aislamiento podría llevar a un individuo a no darle importancia a señales o estímulos que en realidad conforman un peligro para el mismo (es decir atribuir una saliencia reducida respecto a la asignada por animales que se desarrollaron en condiciones sociales). Por el contrario, también podría ocurrir el caso en donde cualquier estímulo, por más pequeño que sea, tenga una saliencia muy alta conduciendo a una hiperreactividad maladaptativa. Se ha propuesto que alteraciones en procesos de filtrado sensorial podrían contribuir a los déficits observados en individuos con esquizofrenia o trastornos de espectro autista (Pérez P. 2012).

Mencionamos hasta aquí la importancia de la interacción social durante el desarrollo temprano, que la información recibida del ambiente participa en el establecimiento de los circuitos de integración multisensorial y de toma de decisiones y que la ausencia de interacción social durante el desarrollo temprano puede producir déficits en el procesamiento sensorial y toma de decisiones característicos de algunos trastornos neurológicos. Por otra parte, mencionamos algunas características del comportamiento social de los peces cebra, la riqueza de sus comportamientos evasivos y la particularidad de poder manipular su contexto social de desarrollo desde la fecundación. Estos antecedentes nos llevan a preguntar **cuál será el impacto del aislamiento social temprano de los peces cebra en su comportamiento social y en su evaluación del riesgo representado por estímulos visuales y acústicos, estudiando las características de sus respuestas evasivas.**

4. Hipótesis

El aislamiento durante el desarrollo temprano afecta el desarrollo normal de las áreas involucradas en el procesamiento e integración sensorial de los estímulos de peligro, desencadenando una alteración en la evaluación de la peligrosidad de un estímulo y por ende cambios en la probabilidad de realizar respuestas evasivas.

Objetivos

1. Establecer en nuestro laboratorio un paradigma de aislamiento social en larvas de pez cebra.
2. Determinar los efectos del aislamiento social utilizando un paradigma de preferencia social visual establecido.
3. Analizar si el aislamiento social durante el desarrollo temprano afecta el tipo y probabilidad de ejecución de comportamientos evasivos en respuesta a estímulos auditivos y/o visuales aversivos.
4. Determinar si el aislamiento social durante el desarrollo temprano afecta la integración multisensorial.
5. Analizar si una semana de aislamiento social es suficiente para afectar la probabilidad de respuesta y la preferencia visual social de peces que estuvieron anteriormente en contexto social.

5. Materiales y métodos

5.1 Animales

En esta tesis se utilizaron 405 peces cebra (*Danio rerio*) de ambos sexos de entre 7 y 33 dpf salvajes de la línea AB (ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7) provenientes del acuario del IFIBYNE. En el acuario los animales son mantenidos en peceras con un sistema de recirculación de agua mantenida a 26-28°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hs. El agua de red es filtrada mediante el pasaje por dos filtros de papel y uno filtro de carbón activado, es declorada y llevada a temperatura en un tanque de 500 L que luego es utilizada para alimentar el sistema de recirculación de agua. Los animales permanecen en grupos de ambos性es alojados en peceras de 12,5 x 33,5 x 20 cm (8.3 litros) en grupos que no excedan los 20 individuos. Los peces son alimentados tres veces por día. Dos alimentaciones consisten en escamas de una mezcla de Supervit:Espirulina:D-Allio (Tropical) en proporción 3:1:1. La tercera alimentación consiste en nauplios recién eclosionados de *Artemia salina* (Aquatics Foods, Inc.).

Para la obtención de los individuos utilizados en este trabajo se realizaron cruzas de entre uno y tres machos y tres a cinco hembras. En la tarde previa a la cría, los parentales son trasladados de su acuario comunal a peceras tipo “beach tank” (Techniplast), donde no se los alimenta. En las primeras horas de la mañana del día siguiente se produce el cortejo y luego cada hembra realiza una puesta de entre 100/200 huevos. Los huevos son recolectados, lavados y mantenidos en medio E3 (NaCl [0.05 M], KCl [0.00017 M], MgSO₄ [0.000675 M], CaCl₂ [0.000437 M], Hepes [0.01 M], Azul de Metileno [6.25×10⁻⁷ M], pH: 7.2) en placas de Petri de 10 cm, en una estufa a 28°C hasta los 6 dpf. Los animales eclosionan alrededor de los 3 dpf. Durante ese período diariamente se cambia el medio y se retiran los huevos que no eclosionan (menos del 10%). Luego se transfiere a las larvas recién eclosionadas a contenedores individuales o grupales, dependiendo del grupo experimental. Ambos grupos experimentales son mantenidos en el acuario y alimentados tres veces por día con alimento micronizado (Larval AP100, Pentair) hasta el día 15 dpf, cuando se incorporan a la dieta nauplios de *Artemia salina*.

Cabe aclarar que en esta especie la diferenciación de las gónadas en ovarios o testículos no ocurre hasta los 25-35 dpf (Trant et al. 2001) por lo que en nuestros experimentos no diferenciamos el sexo de los individuos.

Todos los protocolos experimentales descriptos contaron con la aprobación de la CICUAL-FCEN (Protocolo #152).

5.2 Grupos experimentales

En una primera etapa se trabajó con dos grupos experimentales en simultáneo: un grupo control sin aislamiento y un grupo con aislamiento. Luego se añadió un grupo experimental de aislamiento parcial donde se realizó una única semana de aislamiento entre la semana 2 y 3 de vida.

Grupo control social (S): peces cebra ($N=100$) criados en un contexto social desde su eclosión hasta el momento de realizar los ensayos experimentales (entre 8 y 33 dpf). Los animales se mantuvieron en recipientes comunales de plástico transparente de 1100 mL en grupos de no más de 50 individuos (**Figura 5a**).

Grupo con aislamiento (A): peces cebra ($N=100$) criados en aislamiento desde su eclosión hasta el momento de realizar los ensayos experimentales (entre 8 y 33 dpf). Cada animal fue mantenido en un contenedor individual de 50 ml con tapa y paredes translúcidas de manera de permitir el pasaje de luz pero impedir que los peces se vean entre sí (**Figura 5b**).

Grupo con aislamiento parcial (AP): peces cebra ($N=25$) criados en contexto social desde su eclosión hasta los 14 dpf, luego sometidos a una semana de aislamiento hasta el momento de comenzar a realizar los ensayos experimentales en la semana 4 (los animales fueron evaluados entre los 23 a 33 dpf).

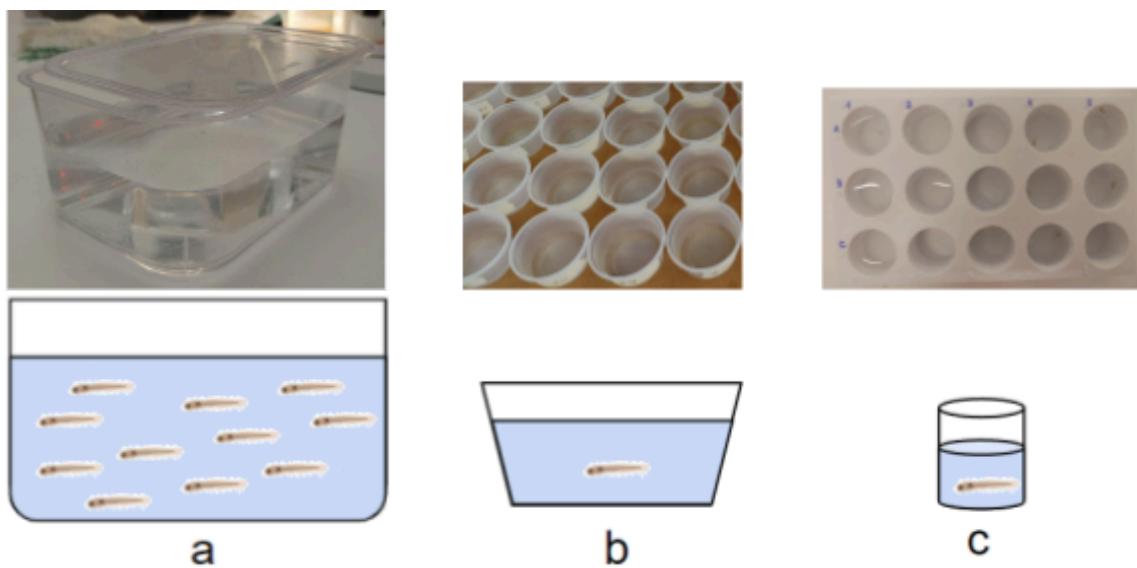


Figura 5: Recipientes utilizados para alojar a los peces. (a) recipiente comunal para peces control ($V=1100$ mL); (b) recipientes finales para peces aislados ($V=50$ mL); (c) placa con los pocillos utilizada en ensayos preliminares ($V=8$ mL). Las larvas no están a escala.

En experimentos preliminares se utilizó un recipiente impreso en PLA blanco (Ultimaker 2+) con 15 pocillos de una capacidad de 8 mL (**Figura 5c**) y en cada uno se colocó un individuo. Sin embargo, a lo largo de los días se observó una mortalidad superior a la de los peces alojados en el recipiente comunal y un desarrollo del tamaño menor al de los peces control, quizás producto del poco espacio que tenían los peces para nadar (Maierdiyali et al., 2020). Por estas razones se decidió cambiar el tipo de recipiente que contenía a los peces aislados, optando por uno de volumen 6 veces mayor (50 ml, **Figura 5b**). En los recipientes de 50 ml no se observó una mortalidad significativa y el desarrollo general de los animales fue indistinguible al de los animales control por lo que se optó por estos últimos para el resto de los ensayos.

Tanto los experimentos de interacción social como los de escape se realizaron el mismo día para el mismo individuo, en orden aleatorio y manteniendo un tiempo de descanso de 30 minutos entre ambos experimentos. Los experimentos se realizaron entre las 10 a.m. y las 6 p.m. Los peces que se iban a testear fueron trasladados en sus recipientes desde el acuario hasta el laboratorio donde se hacían los experimentos. El cuarto donde se realizaron los experimentos se mantuvo con las luces apagadas y los ruidos minimizados. Cada animal fue evaluado una única vez en el ensayo de interacción social y una única vez en el ensayo de comportamiento de escape. Luego de la finalización del ensayo los animales fueron sacrificados por shock hipotérmico.

5.3 Ensayo de interacción social

Los peces cebra tienen una preferencia innata por conespecíficos. A medida que las larvas crecen, no solo desarrollan una preferencia por la cercanía con otros peces, sino que también comienzan a coordinar sus comportamientos (como nadar en cardumen), lo que es un precursor de comportamientos sociales más complejos (Buske and Gerlai 2011). Una manera de estudiar los primeros signos de interacción social es evaluar la preferencia social visual (PSV). Este paradigma desarrollado por Dreosti et al. (2015) consiste en un laberinto con dos brazos, en el que el animal puede nadar libremente pero en uno de los brazos el animal puede observar a un grupo de coespecíficos a través de un divisor transparente. En el otro brazo puede observar una cámara vacía (**Figura 6**, diagrama de la derecha). La PSV se evalúa comparando el tiempo que los animales pasan en la cámara social (CS) y en la cámara no social (CNS).

Si bien en el trabajo de Dreosti et al. (2015) las larvas de 1 semana de edad no muestran una preferencia social, a las 2 semanas comienza a manifestarse una preferencia que se consolida a las tres semanas de vida. Dicha preferencia social depende de la visión y requiere que los peces observados sean de tamaño similar. En un segundo trabajo, el mismo grupo estudió la PSV en animales de 3 semanas que se desarrollaron en aislamiento social y observaron una menor PSV que en los controles (Tunbak et al. 2020). Sin embargo, en ese trabajo no se estudió qué ocurría con los animales antes de las 3 semanas post fecundación. Para estudiar los efectos del aislamiento social en una ventana más amplia (de 8 al 33 dpf), decidimos reproducir el paradigma diseñado por el grupo de Dreosti.

5.3.1 Dispositivo experimental

El dispositivo consiste en dos arenas experimentales idénticas de 3.4 cm de largo, 4.3 cm de ancho y 1 cm de alto, impresas en PLA blanco (Ultimaker 2+, UltiMaker). Cada arena tiene una sección central (que denominaremos “pasillo”, P) que conecta dos cámaras distintas separadas de la sección central por barreras transparentes (placas de acrílico) como se muestra en la **Figura 6a**. La conexión entre los dos brazos por el pasillo hace que el animal no pueda observar nunca ambas cámaras simultáneamente.

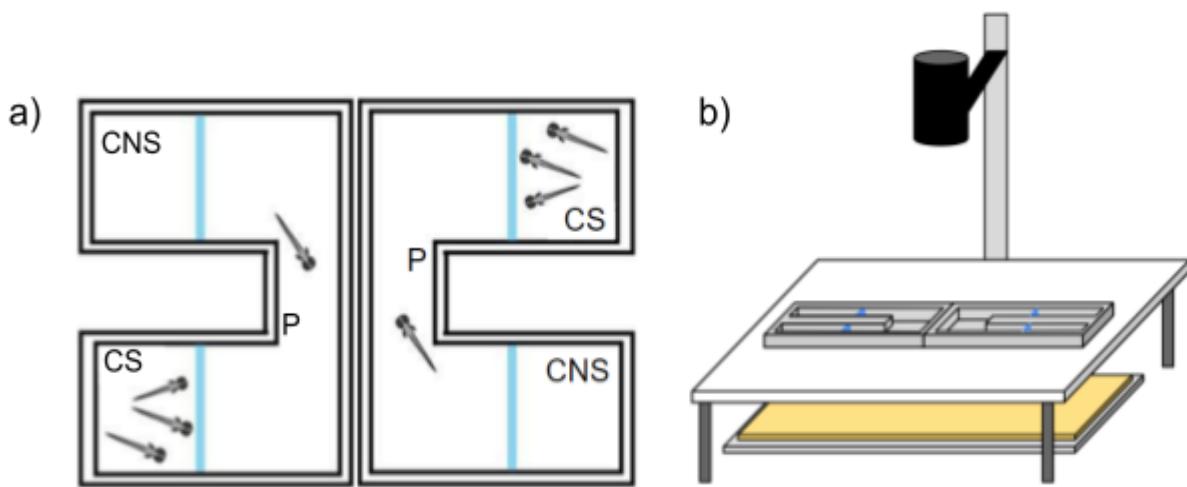


Figura 6: Arena experimental de interacción social. (a) Esquema de la cámara de registro (adaptado de Dreosti et al. 2015). En celeste se observan las placas de acrílico que separan el pez focal del estímulo social. (b) Esquema del dispositivo experimental para registrar la interacción social.

La sección central de cada arena contiene al pez focal, en una de las cámaras se colocan tres individuos control de la misma camada del pez focal (cámara social, CS), y la otra permanecerá vacía (cámara no social, CNS). La arena experimental se apoya sobre una placa semitransparente retroiluminada con luz blanca y se filma a los animales a 30 marcos por segundo con una cámara web montada por encima (Brio 4k IS 616/IEC 60065, Logitech). Los videos se almacenan en una computadora para su análisis posterior. Se adquirió simultáneamente la actividad en las dos arenas, donde en una se evaluó el comportamiento de un animal control y en la otra de un animal aislado.

Durante todos los experimentos de interacción social, el observador se mantuvo alejado del set-up, con la luz apagada y minimizando el ruido en el cuarto para evitar alteraciones no controladas en el comportamiento de los animales.

5.3.2 Protocolo de interacción social

Para la realización de los experimentos de interacción social, los animales fueron trasladados desde el acuario al cuarto experimental donde permanecieron al menos 10 minutos en sus recipientes de traslado hasta dar comienzo al experimento. En cada experimento se introdujo un pez focal (aislado o control) de forma aleatoria en la sección central (pasillo) y se filmó su comportamiento por 5 minutos. Este período de 5 minutos permite la adaptación del animal al dispositivo y determinar (a posteriori) si hubiera una preferencia inicial por una sección de la arena experimental. Los animales que realizaron freezing permanentemente o que no exploraron la arena durante estos primeros 5 minutos

fueron descartados del análisis. Finalizados los 5 minutos de adaptación, se introdujeron con una pipeta Pasteur 3 peces dentro de la Cámara Social (CS). Los animales “estímulo” fueron peces de la misma camada (del mismo genotipo, coloración, edad) criados en contexto social. Se filmó el comportamiento del pez focal durante 10 minutos adicionales. Luego de la finalización del ensayo el agua de la arena experimental fue descartada y reemplazada por agua de acuario fresca.

5.3.3 Análisis de la interacción social

1. Determinación de la trayectoria

Para estudiar el comportamiento social, se analizó la trayectoria de los animales a lo largo de los 15 minutos de filmación. La posición del animal marco a marco fue determinada utilizando el software de trackeo DeepLabCut (DLC) (Mathis et al. 2018). Para ello, en primer lugar debimos entrenar un modelo computacional de DLC con los videos de interacción social. El proceso comienza con la selección de un conjunto de distintas imágenes (aprox. 40), provenientes de diferentes videos, que representan bien las variaciones en el comportamiento y las posiciones del animal (por ejemplo cuando el pez hace freezing, cuando cambia de dirección, cuando está lejos o cerca de las paredes del recipiente) en donde se etiquetará la posición del animal. En este caso, para seleccionar las imágenes a etiquetar se utilizó el algoritmo de extracción de frames k-means (automático).

En cada una de las imágenes seleccionadas para entrenar el modelo se etiquetaron 8 puntos a lo largo del animal (ambos ojos, el extremo anterior y posterior de la vejiga natatoria, y 4 puntos a lo largo de la cola). Después de completar el etiquetado, se utilizaron los valores predeterminados para entrenar el modelo utilizando el 95% de las imágenes para entrenar el modelo y el 5% restante para validarla. El modelo se entrenó por 100.000 iteraciones y se evaluó el rendimiento del mismo en un conjunto de videos de prueba para corroborar que el trackeo fuera preciso. Finalmente, se utilizó el modelo entrenado para obtener las coordenadas x e y de los distintos segmentos del pez focal en todos los marcos de todos los videos adquiridos. El modelo calcula para cada punto un índice de confianza de la estimación de la posición. Para los análisis se consideraron únicamente puntos cuya confianza fuera de más del 90%.

2. Determinación de la preferencia social visual (PVS)

Para determinar la PVS se calculó un Índice de Preferencia Visual (IPV, Dreosti et al. 2015):

$$IPV = \frac{(Tiempo\ CS - Tiempo\ CNS)}{(Tiempo\ CS + Tiempo\ CNS)}$$
 Ecuación (1)

Donde “Tiempo CS” es el tiempo que el individuo focal permanece en la Cámara Social, y “Tiempo CNS” el tiempo que permanece en la Cámara No Social (**Figura 10**). Para determinar el tiempo en segundos que el animal focal permaneció en la CS o la CNS, se determinó en cada video las coordenadas que definían a CS, la CNS y P. Luego se contaron el número de marcos en los que la posición de la cabeza se encontraba dentro de cada compartimento y se lo dividió por la frecuencia de adquisición (30 Hz). También se midió la distancia de la cabeza del animal a la barrera de la cámara social (CS), la distancia total recorrida y el promedio de tiempo que permaneció cada grupo experimental en cada cámara.

5.4 Ensayo para evaluar el comportamiento de escape

Para determinar si el aislamiento social durante el desarrollo temprano modifica la evaluación de riesgo en los peces cebra, caracterizamos el comportamiento de escape de animales control y sometidos a aislamiento, cuando fueron estimulados con una batería de estímulos visuales, acústicos y su combinación. En peces, la respuesta de escape puede ser evocada por estímulos visuales y/o auditivos fuertes y abruptos.

5.4.1 Estímulos

Para evocar la respuesta de escape con estímulos visuales, se utiliza típicamente la expansión gradual de un disco oscuro sobre un fondo claro (Dunn et al., 2016; Preuss, 2006; Temizer et al., 2015). La probabilidad de respuesta se ve reducida si el disco es blanco sobre fondo negro, o si no existe una expansión gradual del mismo (Temizer et al., 2015). Por otro lado, se conoce que la dinámica de expansión del disco, es decir, el tamaño, velocidad y tiempo de expansión exactos del estímulo visual, tienen un efecto sobre la probabilidad y la latencia de la respuesta de escape (Preuss 2006; Bhattacharyya et al. 2017). En este trabajo de tesis, se utilizó una expansión a velocidad constante, que subtendía inicialmente un ángulo de aproximadamente 4,25° y se expandía hasta 42° en el término de 10 segundos cuyo $L/V=1$. El parámetro L/V es indicativo de la expansión del tamaño angular del objeto en la retina y relaciona el tamaño del objeto (L) con la velocidad de aproximación (V). Esta expresión, permite la comparación de las dinámicas de los loomings utilizados en otros trabajos en peces cebra u otros animales (Gabbiani, Krap, Laurent, 1999; Gabbiani, Preuss, Dewell 2023).

Como uno de los objetivos de esta tesis fue el de determinar si la evaluación de riesgo era distinta en animales aislados y controles, se diseñaron estímulos que representaran diferentes niveles de riesgo o saliencia. Para variar la saliencia del estímulo

visual, se modificó el contraste del disco utilizando diferentes tonos de gris sobre un fondo blanco. Para ello se midió la irradiancia (en mWh/m²), entendida como la cantidad de luz que es proyectada sobre la pantalla dentro de un área determinada, utilizando un fotómetro (Tektronix J17, sensor J1812). El contraste entre disco y fondo se definió como $(I_{\text{fondo}} - I_{\text{disco}})/(I_{\text{fondo}} + I_{\text{disco}})$. Este coeficiente se denomina contraste de Michelson, que es una manera de medir el contraste entre dos intensidades de luz. El valor del contraste siempre es positivo, dado que I_{fondo} siempre es mayor que I_{disco} . Trabajos previos del laboratorio utilizando peces dorados mostraron que la saliencia de un estímulo looming es función del contraste del disco sobre el fondo (Otero Coronel et al. 2020; Martorell y Medan 2022). Sin embargo, debido a que en este trabajo se utilizó otra especie, se realizó un experimento piloto donde se varió sistemáticamente el contraste del disco con el objetivo de diseñar un estímulo de baja saliencia y otro de alta saliencia (reflejado en probabilidades de escape baja y alta respectivamente). Los estímulos elegidos se presentan en la **Figura 7**. Se utilizó un looming de bajo contraste (valor de RGB de 230/255) con un contraste de Michelson de 0.09 y otro de alto contraste (valor de RGB de 160/255) con un contraste de Michelson de 0.36.

El estímulo auditivo consistió en la presentación de un único ciclo seno de 200 Hz (duración aproximada de 5-10 ms considerando la reverberación en el recipiente) cuya saliencia se varió cambiando la amplitud del estímulo (Martorell y Medan 2022). Se midió la amplitud de los estímulos auditivos con un hidrófono (Sensor SQ34) expresada en dB en agua, relativos a 1 µPa. Se eligieron dos estímulos en base a experimentos preliminares donde se determinó que evocaban respuestas de escape en animales controles con una probabilidad del 26% y 38% respectivamente. Utilizamos un estímulo de baja amplitud (136.6 dB rel.1 µPa) y otro de amplitud mayor (140.9 dB rel.1 µPa).

Finalmente, combinando los dos estímulos visuales y los dos estímulos auditivos se diseñaron cuatro estímulos multimodales que se utilizaron para determinar si la integración multisensorial en los peces aislados era distinta a la de los peces control.

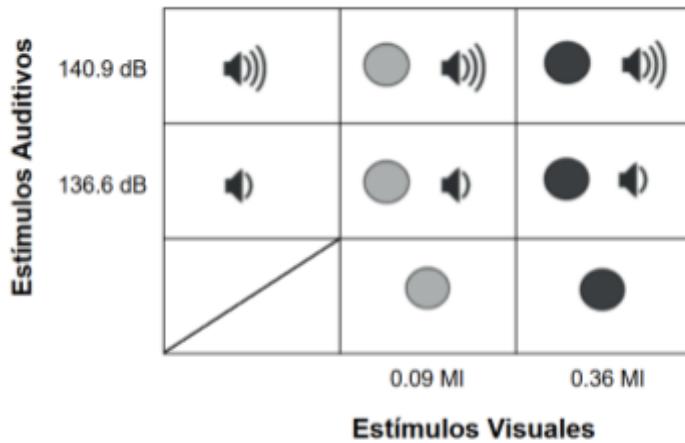


Figura 7: Esquema de los diferentes estímulos utilizados y su combinación.

5.4.2 Dispositivo experimental

Para evaluar la respuesta de escape frente a diferentes estímulos visuales, auditivos o su combinación se construyó el dispositivo ilustrado en la **Figura 8a**. Los peces fueron evaluados individualmente en una semiesfera de acrílico transparente de 7 cm de diámetro llena de agua del acuario. Dicha esfera se encontraba sumergida en un recipiente rectangular de acrílico transparente de 8 x 8 x 4.1 cm también lleno de agua. Sobre una de las paredes de la cámara externa se montó un parlante sumergible de 2.5 cm de diámetro (Visaton) que se utilizó para la administración de los estímulos acústicos. Un monitor de PC (LG monitor-TV 24MN42A-PMN, 60 Hz) se ubicó a 10 cm de la pecera y se utilizó para administrar los estímulos visuales.

La cámara de registro se apoyó sobre una lámina difusora retroiluminada con luz infrarroja (**Figura 8**) a la cual los peces cebra no son sensibles. Una cámara con filtro permisivo para el infrarrojo (BFS-U3-04S2M, Blackfly) montada sobre un objetivo de 35 mm (59872, Edmund Optics) filmó a los animales a 437 marcos por segundo. Los archivos fueron adquiridos con el software SpinView (versión 1.29.0.5).

En una esquina de la arena experimental se colocó un LED infrarrojo que se encendía cuando se producían el inicio del estímulo auditivo (en los ensayos únicamente auditivos) o al inicio y finalización de la expansión visual (en los ensayos visuales o los multimodales). Esto permitía determinar con gran precisión el momento exacto de la estimulación y por ende la duración de la respuesta del pez ya que ambas cosas eran registradas simultáneamente por la cámara. La sincronización entre el comienzo de la filmación y la administración de los estímulos se realizó con el software *Processing* que además activaba una placa Arduino encargada de gatillar el LED. Todo el dispositivo fue montado dentro de una estructura rodeada de cortinas opacas para evitar la estimulación no

controlada durante el experimento y sobre una mesa montada sobre estructuras antivibratorias.

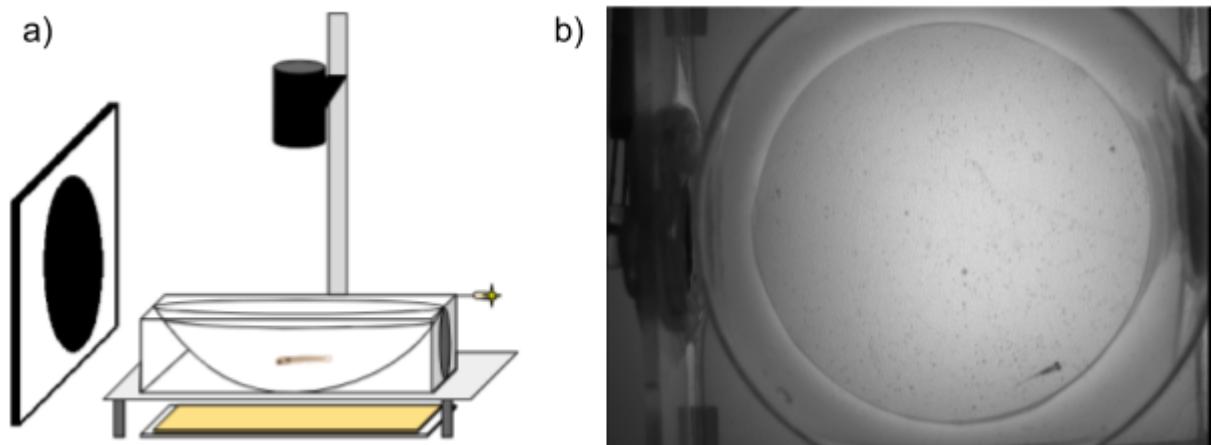


Figura 8: Dispositivo de evaluación del comportamiento de escape. (a) Esquema del dispositivo (no a escala), y (b) fotograma ejemplo de la imagen captada por la cámara. (c) Dinámica de los estímulos (visual y auditivo (señalar la ventana de análisis).

Antes del comienzo de la expansión, el ángulo subtendido por el disco (calculado a la altura de la cabeza del pez, asumiendo que se encuentra en el centro de la pecera, es decir a 16.5 cm de la pantalla) es de $4,25^\circ$. Cuando finaliza el looming, el disco alcanza un ángulo subtendido máximo de 42° y se mantiene constante hasta que finaliza el trial (**Figura 9**).

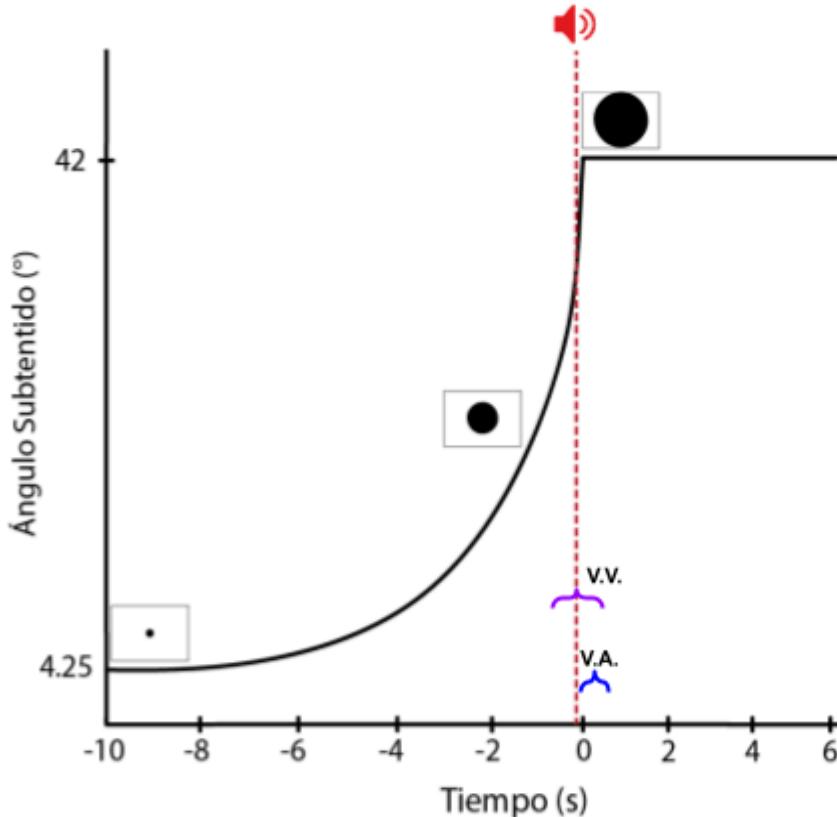


Figura 9: Dinámica de los estímulos utilizados. En negro se grafica el tamaño angular subtendido por el estímulo en la retina (considerando al pez en el centro de la arena experimental) en función del tiempo. La línea roja discontinua indica el momento en que se presenta el estímulo auditivo, en los ensayos multimodales se presenta 80 ms antes de la expansión máxima del disco. La llave violeta representa la ventana de análisis visual/multisensorial, mientras que la llave azul representa la ventana de análisis auditiva.

5.4.3 Protocolo de evaluación de la respuesta de escape

El individuo (social o aislado) se introdujo en la arena experimental de escape y permaneció 5 minutos sin estimulación. Finalizado este período de aclimatación, se lo estimuló con una batería de 8 estímulos presentados en forma aleatorizada: 4 estímulos unisensoriales (2 contrastes visuales y 2 intensidades auditivas) y sus 4 combinaciones. Cada período de estimulación duró 18 segundos, y se otorgó un intervalo de 2 minutos de descanso entre ensayos. En los casos en los que se administraron estímulos multimodales, la presentación del sonido ocurrió en conjunción con el fin de la expansión visual.

Durante todos los experimentos de evaluación de escape, el set-up se mantuvo cubierto por las cortinas opacas y en un cuarto con la luz apagada, con el fin de evitar cualquier estimulación visual ajena a los estímulos presentados.

5.4.4 Análisis de la evaluación de riesgo

Categorización de comportamientos evasivos

Para la categorización de las respuestas a los estímulos presentados, se inspeccionaron los videos manualmente y, en cada video, se determinó si los estímulos evocaban algún tipo de respuesta evasiva. Para ello, se consideró una ventana temporal de 460 ms posterior al estímulo auditivo (unisensorial, llave azul, V.A en **Figura 9**) o, para el caso de los estímulos con un componente visual una ventana 460ms antes y 460 ms después de la finalización del estímulo auditivo. En caso de que hubiera una respuesta en la ventana temporal de análisis se diferenció entre escapes y freezing y se determinó la duración de la fase C1. Los eventos de freezing fueron definidos como eventos en donde el individuo permanecía inmóvil durante al menos 5 s, observándose sólo el movimiento de sus ojos. En función de la duración de la fase C1, los eventos de C-start se diferenciaron entre rápidos (SLC) o lentos (LLC), considerando C-start rápidos las respuestas que duraban entre 0-13 ms y C-start lentos las respuestas que duraban 14-25 ms (Burgess and Granato 2007; Marquart 2019).

Probabilidad de escape e índice de Integración Multisensorial

Con los datos obtenidos se calculó la probabilidad de escape para ambos grupos experimentales (aislados y sociales) como la razón entre el número de respuestas de escape observadas y los ensayos totales.

Dado que para todos los estímulos multimodales conocemos las probabilidades de respuesta para los componentes unimodales que los componen por separado (V =Probabilidad del componente visual y A = Probabilidad del componente auditivo), es posible calcular la probabilidad esperada (PE) para un estímulo multimodal si las respuestas a los componentes unimodales fueran eventos independientes (sin integración). De esta manera podemos comparar la probabilidad de respuesta de escape observada para ese estímulo multimodal con la que esperaríamos de un sistema que no integre las claves unimodales.

$$PE = V + A - V * A \quad \text{Ecuación (2)}$$

Así, podemos testear estadísticamente la diferencia entre ambos valores para hacernos la pregunta de si, para esa condición de estimulación, existe integración multimodal. Además, se calculó un índice de Integración Multisensorial (IM) para determinar si la respuesta evocada por estímulos multimodales difería de la esperada para los

estímulos unisensoriales. Esta última se calcula en base a la combinación de estímulos, y a las frecuencias de escape observadas para cada estímulo multisensorial según la fórmula:

$$IM = \frac{PO - PE}{PO + PE} \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde PO es la probabilidad de respuesta observada para un dado estímulo multimodal y PE es su probabilidad esperada. Cuando IM=0 quiere decir que la probabilidad observada y la esperada son iguales, en este caso no podemos detectar ningún tipo de integración. Cuando IM>0 quiere decir que las probabilidades observadas son mayores a las probabilidades esperadas, por lo que podríamos hablar de una integración positiva, facilitadora de la respuesta. Cuando IM<0 quiere decir que las probabilidades observadas son menores a las probabilidades esperadas, por lo que podríamos hablar de una integración negativa, inhibidora de la respuesta.

Determinación de la trayectoria y cálculo de variables cinéticas

Además de la categorización directa por inspección visual, la posición marco a marco del animal fue determinada utilizando DLC entrenando un modelo con imágenes y videos de escape. Para el etiquetado de las imágenes se definieron 10 puntos a lo largo del animal (ambos ojos, extremos anterior y posterior la vejiga natatoria, y 6 puntos de la cola). El entrenamiento del modelo se hizo como en el caso anterior.

Luego de entrenado el modelo se analizaron automáticamente las trayectorias de 1800 ensayos para obtener las posiciones x e y de cada punto definido, para cada animal en cada ensayo. Esto permite reconstruir la trayectoria marco a marco y calcular diferentes variables que caracterizan la conducta motora de los peces.

Para estudiar si las respuestas de escape de los peces difieren respecto a su condición de desarrollo, analizamos una ventana de 50 marcos alrededor del tiempo de inicio de cada evento de escape. En ese período se calculó: la máxima velocidad lineal de la cabeza, la máxima velocidad angular desarrollada por la cabeza y la máxima curvatura desarrollada entre la cabeza y la cola.

La máxima velocidad lineal de la cabeza se calculó como la diferencia entre las posiciones de la cabeza (punto medio de los ojos) en cada cuadro consecutivo, empleando la fórmula de la distancia euclíadiana:

$$v = \sqrt{(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2}$$

Por otro lado, la máxima velocidad angular se calculó utilizando los vectores entre la vejiga posterior y el punto medio entre los ojos, midiendo el ángulo entre los vectores de cuadros consecutivos usando la fórmula del coseno. Esta variable mide cuánto cambia la orientación de la cabeza del pez en cada cuadro, lo que da una idea de la rapidez con la que el pez gira o ajusta su dirección.

5.5 Análisis estadísticos

Para evaluar si existían diferencias entre los parámetros obtenidos para animales control y animales aislados se utilizaron dos test estadísticos: Test t de Student (para variables continuas) y prueba Z para dos proporciones. Se denotó el número de animales Aislados utilizados en cada ensayo con n_A y el de animales Sociales con n_S .

Para el caso de la arena social se utilizó el Test de t de Student a dos colas para muestras no pareadas, siguiendo la ecuación:

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{\sqrt{\frac{(s_1)^2}{n_1} + \frac{(s_2)^2}{n_2}}}$$

Donde X es la media de cada muestra, S su desvío estándar y n es el tamaño de la muestra. Esta prueba se utilizó para determinar si existían diferencias en las variables continuas.

Para el caso de la arena de escape, específicamente para los análisis de las probabilidades de respuesta se realizó una prueba Z, cuya ecuación podemos observar debajo.

$$z = \frac{(p_1 - p_2)}{\sqrt{\frac{p_1(1-p_1)}{n_1} + \frac{p_2(1-p_2)}{n_2}}}$$

Donde p_1 es la proporción de respuestas positivas, p_2 la proporción de respuestas negativas, y n es el tamaño de la muestra.

En el caso en el que la variable a analizar esté condicionada por la “condición” y la “semana de aislamiento”, se realizó un anova de 2 factores para determinar si dichas variables afectaban el comportamiento de la variable respuesta. Este análisis se utilizó para la distancia recorrida, para el IPV y para la distancia a la barrera.

En todos los casos se consideró un p valor < 0.05 como valor crítico para inferir diferencias significativas. Las distintas pruebas estadísticas y los gráficos obtenidos se realizaron mediante el software RStudio (Version 4.3.1).

6. Resultados

6.1.0 Efecto del aislamiento sobre la preferencia social visual

El primer objetivo de esta tesis involucró el establecimiento, en nuestro laboratorio, de un paradigma de aislamiento social temprano en peces cebra para luego determinar si el aislamiento social producía un efecto en la evaluación de riesgo. Debido a que el laboratorio no tenía ningún tipo de experiencia previa en el estudio de conductas sociales el primer paso fue encontrar las condiciones adecuadas de aislamiento y luego corroborar que dichas condiciones replicaban déficit sociales que ya estuvieran reportados en la literatura.

Como se mencionó en la sección de métodos, decidimos implementar el test de Preferencia Social Visual desarrollado por Dreosti et al. (2015). Para construir la cámara de interacción social, primero tuve que aprender a diseñar objetos en 3D, luego aprender a utilizar la impresora 3D (generosamente compartida por el Dr. Esteban Beckwit) e iterar en los diseños hasta que obtuvimos uno que nos pareció suficientemente bueno. Esto implicó pruebas utilizando diferentes tipos de barreras (cubreobjetos, distintos grosores de acrílico o plástico transparente, etc. Luego debimos construir el setup comportamental para filmar la actividad de los animales, lo que incluyó un sistema de iluminación intensa pero difusa y homogénea (crítica para luego poder hacer un trackeo eficiente con DLC), un sistema de fijación de la cámara y un protocolo robusto de manipulación de los animales.

Respecto a la implementación del aislamiento, siguiendo el paper de Dreosti et al. (2015), aislamos inicialmente a los peces en placas de 15 wells (**Figura 5**). Sin embargo, probablemente debido a dificultades en la limpieza diaria de los wells, menor aireación y especialmente menor volumen de agua para nadar libremente, encontramos que los peces tenían una tasa de mortalidad mucho mayor que los animales alojados en tanques comunales y un menor desarrollo de tamaño que el resto de la camada mantenida en condiciones sociales. Esto nos hizo repensar la estrategia de aislamiento y realizar una búsqueda de opciones económicas y prácticas de alojamiento individual en recipientes de mayor volumen. Así fue como optamos por utilizar los recipientes de plástico opalescente típicamente utilizados para enviar salsas en los pedidos de delivery de comida china. Estos envases resultaron adecuados ya que no volvimos a observar una mortalidad distinta a la de los animales controles. Mientras que la mortalidad acumulada hasta los 33 dpf en los wells fue del 70%, la mortalidad en los recipientes individuales de 50 ml bajó a 32%, el mismo nivel que en el tanque comunal (34%). De esta manera cumplimos el **Objetivo 1** de esta tesis.

Una vez construido el setup y sorteadas las dificultades iniciales de aislamiento comenzamos con la adquisición de los videos de interacción social para determinar si, en

nuestras manos, el aislamiento social producía déficits en la preferencia social visual tal como había sido reportado por Dreosti et al. (2015) (**Objetivo 2**).

Como se detalló en métodos los videos consistieron en 5 minutos de aclimatación, con el pez focal solo, y 10 minutos en donde se introducían a conespecíficos en la cámara social. Para el análisis, definimos tres áreas virtuales que se ilustran en la **Figura 10**.

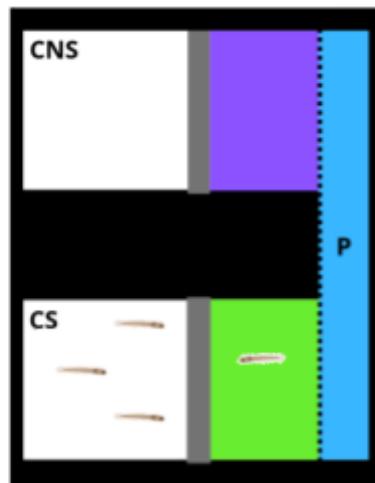


Figura 10: Secciones de la arena experimental social. CNS: Cámara No Social (1.5 cm^2); CS: Cámara Social (1.5 cm^2); P: Pasillo (2.4 cm^2).

Cuando el pez focal se ubicaba en la franja celeste, se consideraba que el individuo estaba en la sección del Pasillo (P), si su posición coincidía con el cuadrado verde se consideraba que estaba en la Cámara Social (CS) y si estaba en el cuadrado violeta se consideraba que estaba en la Cámara No Social (CNS). Entonces, en base a la posición del animal marco a marco se determinó el IPV (**Ecuación 1**) durante el período de aclimatación y durante el período de interacción social propiamente dicho.

6.1.1 Actividad durante el período de aclimatación

Diferencias iniciales durante el período de aclimatación podrían confundir la interpretación de los resultados. Si bien las arenas experimentales son perfectamente simétricas y se extremaron los cuidados para obtener una iluminación uniforme podría haber persistido algún aspecto que sesgaría espuriamente la preferencia espacial de los animales. En particular, para intentar minimizar el efecto de cualquier heterogeneidad en la arena experimental, se aleatorizó la asignación de los individuos focales A o S a la arena de la derecha o la izquierda (ver **Figura 6**). Pese a estos cuidados, podría ocurrir que los animales tuvieran una preferencia innata por uno de los dos brazos de la arena experimental previo a la introducción de los estímulos sociales. Esto introduciría un sesgo en la cuantificación del IPV posterior no relacionada con la interacción social. Para estudiar si había una preferencia inicial sobre algún sector específico, se calculó el IPV para los A y

para los S en base a los sectores establecidos en la **Figura 10**. Se excluyó de este análisis a los animales que no exploraron todos los sectores. Resultó que de los 90 animales A, sólo 29 cumplieron esa condición mientras que en los animales S, 47/90 visitaron ambas cámaras y el pasillo.

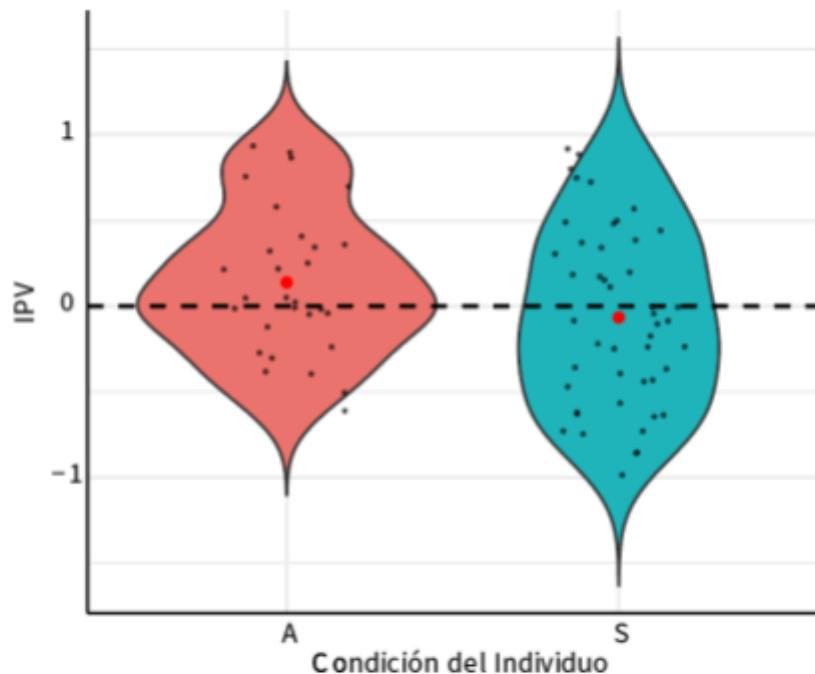


Figura 11: IPV en función de la condición para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan). El punto rojo indica la media de la distribución. $n_A=29$, $n_S=47$. No se observaron diferencias significativas.

En la **Figura 11** se muestra el IPV en función de la condición de desarrollo durante el período de aclimatación. Para el grupo A se obtuvo un IPV (media \pm EE) = 0.138 ± 0.079 mientras que para el grupo de los sociales S = -0.066 ± 0.075 . Si bien pareciera que los A muestran una preferencia por la CS, no hay una preferencia estadísticamente significativa por alguna de las cámaras en ambos grupos (t-test de una muestra contra 0: A $t= 1.74$, $p= 0.09$; S $t= -0.88$, $p= 0.38$). Por otra parte tampoco se encontró una diferencia en el IPV en función de la condición social (t-test, $t= 1.86$, $p=0.065$). De esta manera, pudimos descartar que hubiera una preferencia innata en alguno de los grupos por alguna de las cámaras previo a la introducción de los estímulos sociales.

Distancia recorrida

Dado que el espacio disponible para nadar en los recipientes de mantenimiento fue muy distinto entre animales criados en contexto social o aislado (**Figura 5a-b**), surgió el

interrogante de si existirían diferencias en la actividad locomotora espontánea dentro de la arena de interacción social. Una diferencia general en los niveles de actividad locomotora entre animales A y S también podría introducir un sesgo indeseado en el cálculo del IPV. Por lo tanto, se analizó la trayectoria total recorrida por pez focal en ambos grupos de animales durante los primeros 5 minutos de aclimatación utilizando las coordenadas de sus ojos, obtenidas a través del seguimiento mediante DLC. La **Figura 12** muestra gráficos de violín de la distancia recorrida (en mm) durante los 5 minutos de aclimatación.

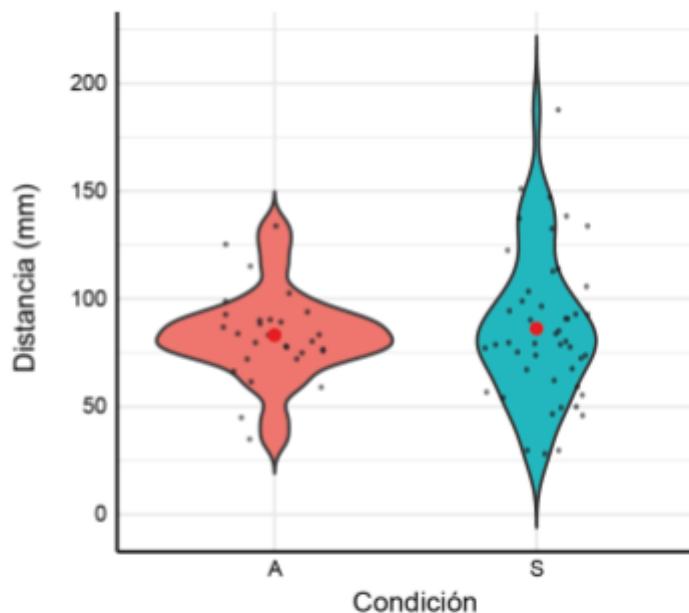


Figura 12: Distancia recorrida (mm) durante la aclimatación para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan). $n_A=29$. $n_S=47$.

No se observaron diferencias significativas entre peces aislados y el grupo control respecto a la distancia recorrida. El grupo de animales aislados recorrió un promedio (\pm EE) de 83.2 ± 3.84 mm mientras que los animales controles recorrieron 86.2 ± 4.97 mm (t-test con corrección de Welch, $t=-0.48$, $p=0.63$). Estos resultados sugieren que el aislamiento no produce un efecto evidente en la actividad exploratoria de los animales. Sin embargo, como se explicita en los métodos, el tiempo de aislamiento previo al ensayo experimental varió entre 8 y 33 días. Por lo tanto, podría ocurrir que el aislamiento produjera diferencias en una ventana temporal específica. Se decidió comparar a ambos grupos pero analizando por separado los animales que habían sido sometidos a una, dos o tres semanas de aislamiento (comparadas con animales controles que se habían desarrollado en contexto social por el mismo período de tiempo).

Se realizó un anova de 2 factores para analizar el efecto de las semanas de aislamiento y de la condición en la distancia recorrida (mm) durante el período de aclimatación. Mediante este test se observó que no había ninguna interacción significativa

entre ambas variables y no se observaron diferencias entre aislados y sociales con respecto a la distancia recorrida en ninguno de los intervalos de aislamiento utilizados (**Figura 13**, ANOVA de 2F, condición social x tiempo de aislamiento, NS).

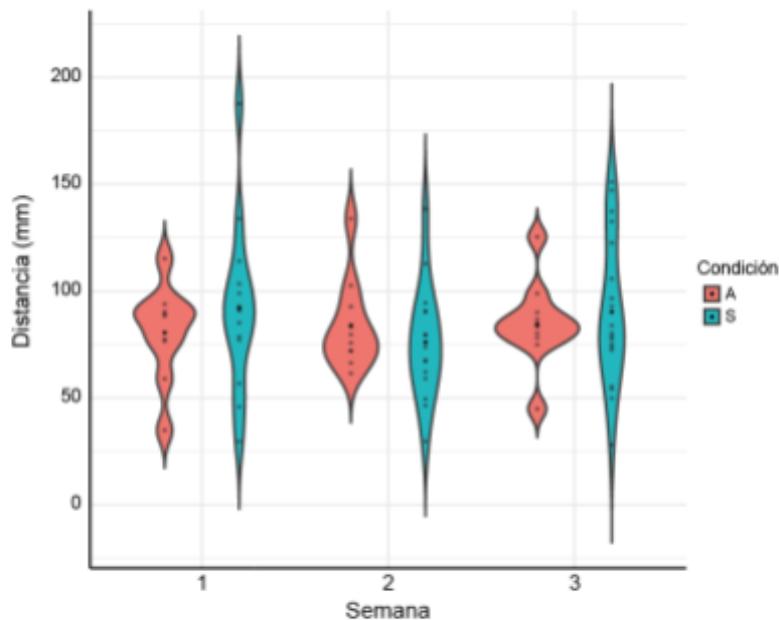


Figura 13: Distancia recorrida (mm) en función de la condición y el número de semanas de aislamiento social para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan). S1: $n_A=9$, $n_S=13$; S2: $n_A=10$, $n_S=15$; S3: $n_A=10$, $n_S=19$.

6.1.2 Actividad durante el período de interacción social

Luego del análisis de la actividad durante el período de aclimatación, estudiamos específicamente la preferencia visual social de animales aislados y sociales para evaluar nuestro **Objetivo 2**.

Durante los 10 minutos de interacción social el pez focal tenía la opción de observar una cámara que contiene 3 conespecíficos de su misma edad (CS), y una cámara vacía (CNS). En la **Figura 14** se muestran cuatro ejemplos de la trayectoria del pez focal durante la interacción social. En cada gráfico, el color representa la proporción de tiempo que pasó el animal en cada punto de la arena (donde rojo representa más tiempo y azul menos tiempo). Notar que si bien en los experimentos se aleatorizó el comportamiento que se utilizó como CS (en el esquema el compartimento inferior), las imágenes fueron espejadas y rotadas para que en todos los mapas de calor el CS estuviera abajo, el CNS arriba y el sector separado por barreras transparentes estuviera a la izquierda.

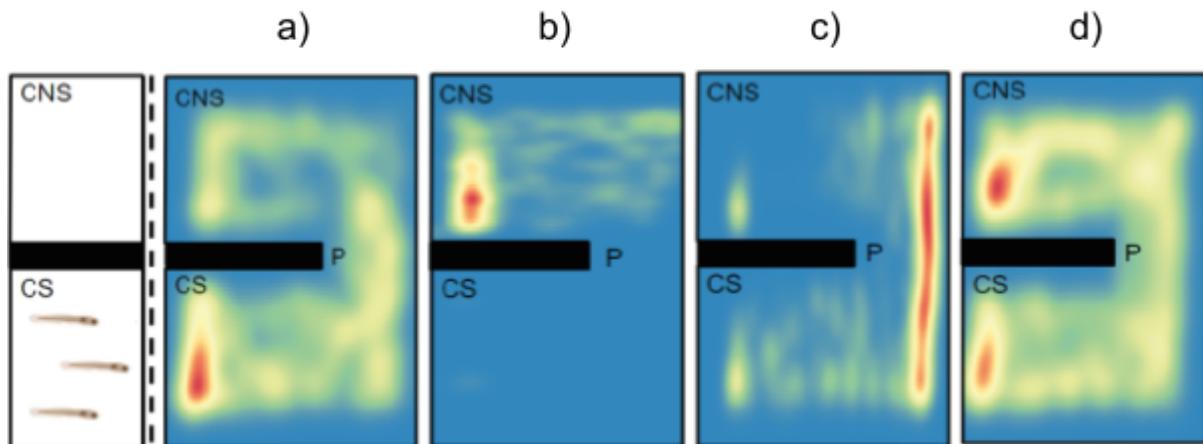


Figura 14: Mapas de calor de la trayectoria individual durante la interacción social. En el diagrama de la izquierda se representa, la posición de la CNS y la CS. a-d. Ejemplos de trayectorias durante el ensayo de interacción social, donde se representa en rojo las áreas en donde el pez estuvo más tiempo y en azul donde menos. CS: cámara social, CNS: cámara no social, P: pasillo.

En base a la posición de la cabeza del pez en cada marco del período de interacción social obtenido con DLC se realizaron los mapas de calor de la **Figura 14**, donde el color de cada punto de la arena es proporcional al tiempo que el animal pasó allí. Así, las zonas de color rojo indican más tiempo de permanencia, las amarillo y verde menos y las azules representan áreas que el animal no visitó. El mapa de calor de la **Figura 14a** muestra un ejemplo representativo de peces que recorren toda la arena durante los 10 minutos pero permanecen más tiempo en la CS, probablemente por la preferencia visual por otros individuos. También hubo individuos que permanecieron exclusivamente en una de las cámaras (**Figura 14b**) y que por lo tanto fueron excluidos del análisis. Finalmente, hubo peces que se mantuvieron en la región del pasillo y sólo ingresaron esporádicamente a la CS y CNS (**Figura 14c**) o que recorrieron ambas cámaras CS y CNS sin preferencia alguna (**Figura 14d**).

Índice de Preferencia Visual (IPV)

Para calcular el IPV se registró el tiempo que transcurre el individuo focal en la CS y en la CNS, realizando el cálculo de la **Ecuación (1)**. Se excluyeron de este análisis los animales que nunca ingresaron a alguna de las dos cámaras. De un total de 90 animales aislados y 90 animales sociales, debieron descartarse 38 animales sociales y 38 animales aislados (la coincidencia es casual) que, como no visitaron ambas cámaras en el período de interacción social, nunca observaron el estímulo visual en la CS o nunca recorrieron la CNS a modo de exploración.

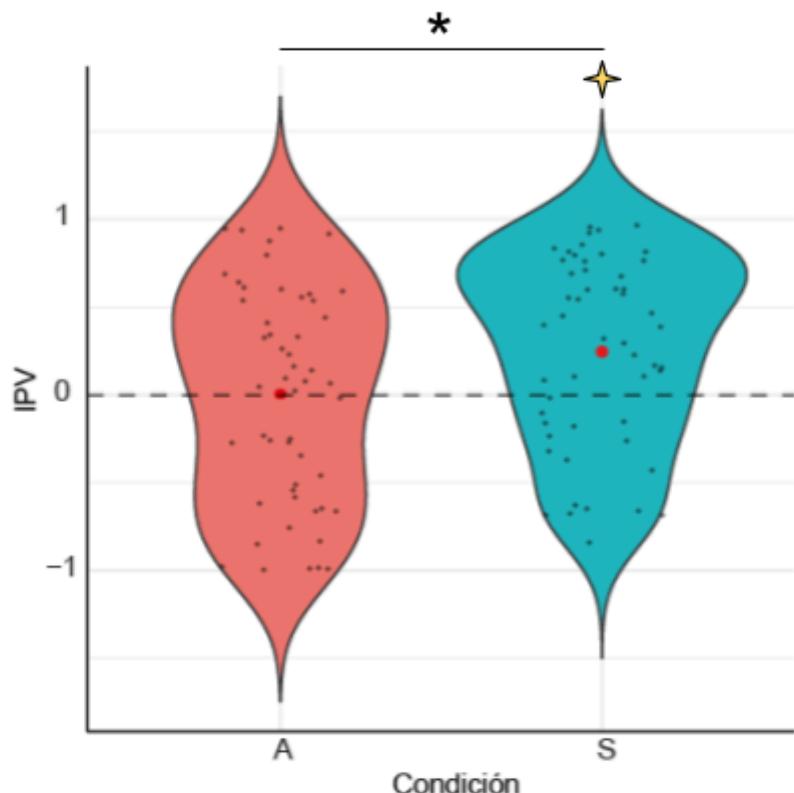


Figura 15: IPV en función de la condición para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan). El punto rojo indica la media de la distribución. $n_A=52$. $n_S=52$. * $p<0.05$. El asterisco negro indica las diferencias significativas entre A y S; la cruz amarilla indica la diferencia respecto a cero.

Para el grupo A se obtuvo un IPV (media \pm EE)= 0.001 ± 0.085 mientras que para el grupo S= 0.248 ± 0.075 . En otras palabras, mientras que para los animales aislados no hay ninguna preferencia por una de las cámaras (t-test de una muestra contra 0: $t= 0.02$, $p= 0.99$), los animales sociales permanecen, en promedio un 25% más de tiempo en la CS que en la CNS (t-test de una muestra contra 0: $t= 3.32$, $p= 0.002$. **Figura 15**, cruz amarilla). En línea con lo reportado por el grupo de Dreosti et al. (2015), encontramos que los animales A tienen un IPV significativamente menor al del grupo S (t-test, $t= -2.17$, $p=0.032$). De esta manera, corroboramos que el aislamiento de entre 1 y 3 semanas no afecta la conducta locomotora pero sí disminuye el tiempo que los animales deciden observar a sus coespecíficos en relación a una cámara vacía. Cabe destacar que durante el período de aclimatación los animales aislados tendían a mostrar una preferencia por la cámara que luego sería la CS (preferencia que no fue significativa). Sin embargo, dado que durante el

período de interacción esa preferencia desaparece, se podría interpretar que los animales “evitan” su preferencia innata de estar en la CS y pasan más tiempo en la CNS.

Índice de Preferencia Visual por semana

Tal como se hizo para el período de aclimatación, se realizó el mismo análisis pero observando lo que ocurría a lo largo de las semanas. Para ello realizamos un anova de 2 factores considerando el IPV como la variable respuesta, las semanas de aislamiento y la condición como variables explicativas. Si bien el análisis global no reveló un efecto significativo ni de la condición social ni del período de aislamiento (ANOVA 2f, (Cond. Social $F= 2.47$, $p=0.089$ / Semanas $F= 0.58$, $p=0.56$, Interacción: $F= 1.21$, $p=0.30$)) puede observarse que, a excepción de la ventana entre los 16-22 dpf (correspondientes a la segunda semana de aislamiento), los animales S tienden a mostrar un incremento en el IPV (**Figura 16**).

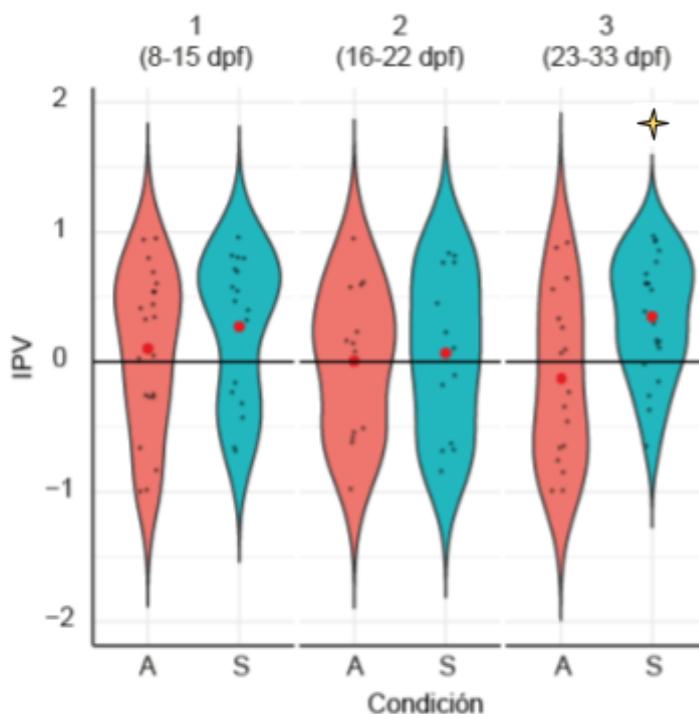


Figura 16: Gráfico de violín del IPV en función de la condición a lo largo de las semanas 1, 2 y 3 para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan). S1: $n_A=21$, $n_S=17$; S2: $n_A=14$, $n_S=14$; S3: $n_A=17$, $n_S=21$. La cruz amarilla indica la diferencia respecto a cero.

En contraposición, podemos advertir que a medida que se prolonga el tiempo de aislamiento el IPV de los animales A muestra una leve, pero consistente disminución. Su IPV pasa de 0.102 ± 0.135 para la semana 1 (luego de una semana de aislamiento) a 0.0071 ± 0.15 durante la semana 2 (2 semanas de aislamiento) y su IPV disminuye al punto de tener un valor negativo en la semana 3 (tercer semana de aislamiento, IPV= - 0.128

± 0.158) (**Figura 16**). Por el contrario, los peces S tienen un IPV positivo a lo largo de las 3 semanas en las que son evaluados: semana 1: IPV= 0.271 ± 0.135 ; semana 2: IPV= 0.0674 ± 0.163 ; semana 3: IPV= 0.348 ± 0.101 . Dichos valores están en línea con lo reportado por Dreosti et al. (2015). Cuando analizamos si dichos valores eran distintos a cero, sólo los animales S de 23 a 33 dpf mostraron IPVs significativamente distintos a cero (t-test de una muestra contra 0: $t=3.45$, $p=0.003$).

Distancia promedio a la barrera de la Cámara Social

Si bien el IPV nos permitió establecer que, efectivamente el aislamiento disminuye el “interés” por los coespecíficos dado que los animales A no prefirieron estar en la CS, para tener una estimación adicional de la conducta social, estudiamos cuál era la distancia promedio del animal focal a la barrera que lo separaba de la CS, donde estaban los tres coespecíficos. Con el mismo procedimiento con el que se calculó la distancia recorrida, al saber la posición en la que se ubicaba la barrera de acrílico de la CS se calculó la diferencia entre la posición de la cabeza del individuo focal en dicha cámara marco a marco y la posición de la barrera y luego se calculó la media de esa distancia a lo largo del período de interacción social (**Figura 17**). Mientras que los peces A se mantuvieron en promedio a 0.52 ± 0.02 mm los peces S estuvieron significativamente más cerca de la barrera, a 0.42 ± 0.02 mm (Welch t-test, $t=3.35$, $p=0.001$).

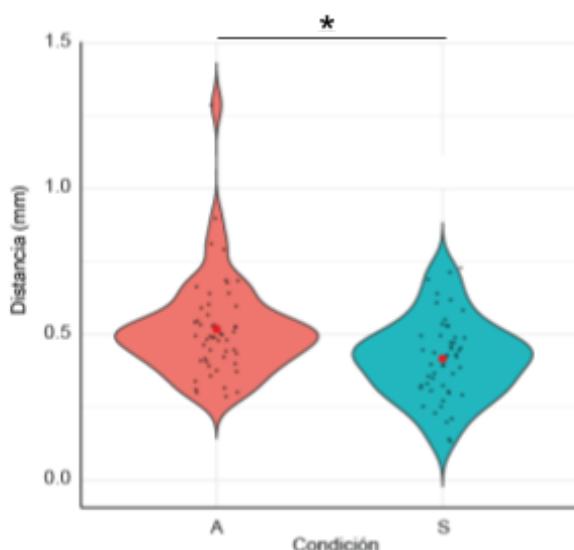


Figura 17: Gráfico de violín de la distancia a la barrera (mm) para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan). $n_A=52$, $n_S=52$, $*p<0.05$.

Cuando se analizó este parámetro a lo largo de las semanas (**Figura 18**) con un ANOVA de 2 vías con la condición de desarrollo y la semana como factores sólo arrojó diferencias significativas para la condición social (ANOVA 2F (Cond. Social $F= 10.42$, $p=0.002$ /

Semanas $F= 1.77$, $p=0.186$, Interacción: NS)). Esto indicaría que, para todo el período analizado los animales S están más cerca de la barrera.

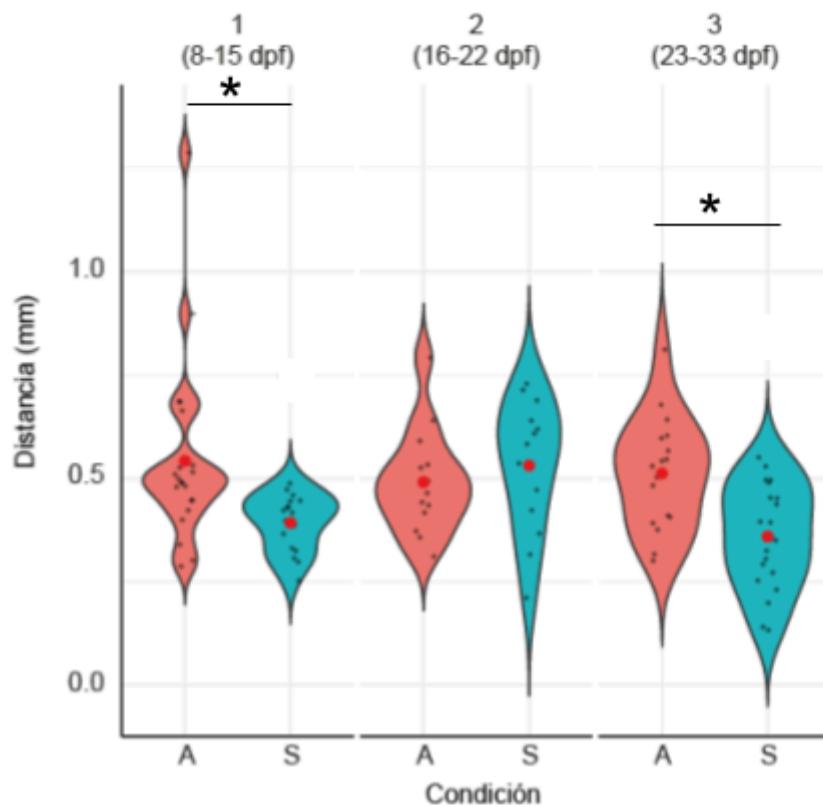


Figura 18: Distancia a la barrera (mm) en función de la condición y de la semana de aislamiento para animales aislados (A, rojo) y sociales (S, cyan).
 S1: $n_A=21$, $n_S=17$; S2: $n_A=14$, $n_S=14$; S3: $n_A=17$, $n_S=21$. * $p<0.05$.

Cuando se hicieron comparaciones de Tukey para cada semana, se puede observar que en la semana 2 y en la semana 4, el grupo de peces aislados se mantuvo más alejado de la barrera de la CS que los peces S. Es interesante notar que tanto en este parámetro como en el IPV, durante el período de 16 a 22 dpf las diferencias entre los grupos desaparecen.

Como síntesis de los resultados obtenidos en esta sección, logramos establecer un paradigma de aislamiento que produce déficits en la preferencia social visual de los peces cebra, reproduciendo los resultados de Dreosti et al (2015). Por otra parte, al analizar si existía un efecto fuerte del tiempo de aislamiento (que osciló entre 7 y 33 días de aislamiento), no encontramos un efecto estadísticamente significativo. Esto es decir, que los cambios que induce el aislamiento serían rápidos y persistentes. Sin embargo, sí observamos una leve tendencia (no significativa, pero el número de animales por grupo fue reducido) a la reducción del IPV para los animales aislados a medida que transcurre el

tiempo de aislamiento (**Figura 16**). Sin embargo, son necesarios más experimentos para poder concluir fehacientemente si esta tendencia es real.

6.2 Arena de escape

El tercer objetivo planteado en esta tesis propone analizar si el aislamiento social temprano afecta la evaluación de riesgo que representan estímulos auditivos, visuales o su combinación de diferentes intensidades (**Objetivo 3**). Establecido que nuestro protocolo de aislamiento producía, al menos, cambios en la preferencia social visual, pasamos a estudiar si el aislamiento también afectaba la evaluación de riesgo.

Se analizó el comportamiento de escape de 100 individuos sociales y 100 individuos aislados. Como se mencionó en los métodos, cada pez (S o A) se introdujo en la arena experimental de escape y tuvo 5 minutos de aclimatación. Luego recibió una batería aleatorizada de 4 estímulos unisensoriales (2 contrastes visuales y 2 intensidades auditivas) y sus 4 combinaciones. Durante todos los experimentos de evaluación de escape, el set-up se mantuvo cubierto por las cortinas opacas y en un cuarto con la luz apagada, con el fin de evitar cualquier estimulación visual ajena a los estímulos presentados. Los videos adquiridos fueron inicialmente inspeccionados de manera manual para identificar la ocurrencia o no de comportamientos de escape (SLC, LLC) o freezing, en respuesta a cada tipo de estímulo.

En la **Figura 19**, se presenta un diagrama aluvial de cómo se distribuyeron los tipos de respuesta dado que podría ocurrir que hubiera una diferencia en la proporción de los diferentes tipos de respuesta que ejecutan animales A y S.

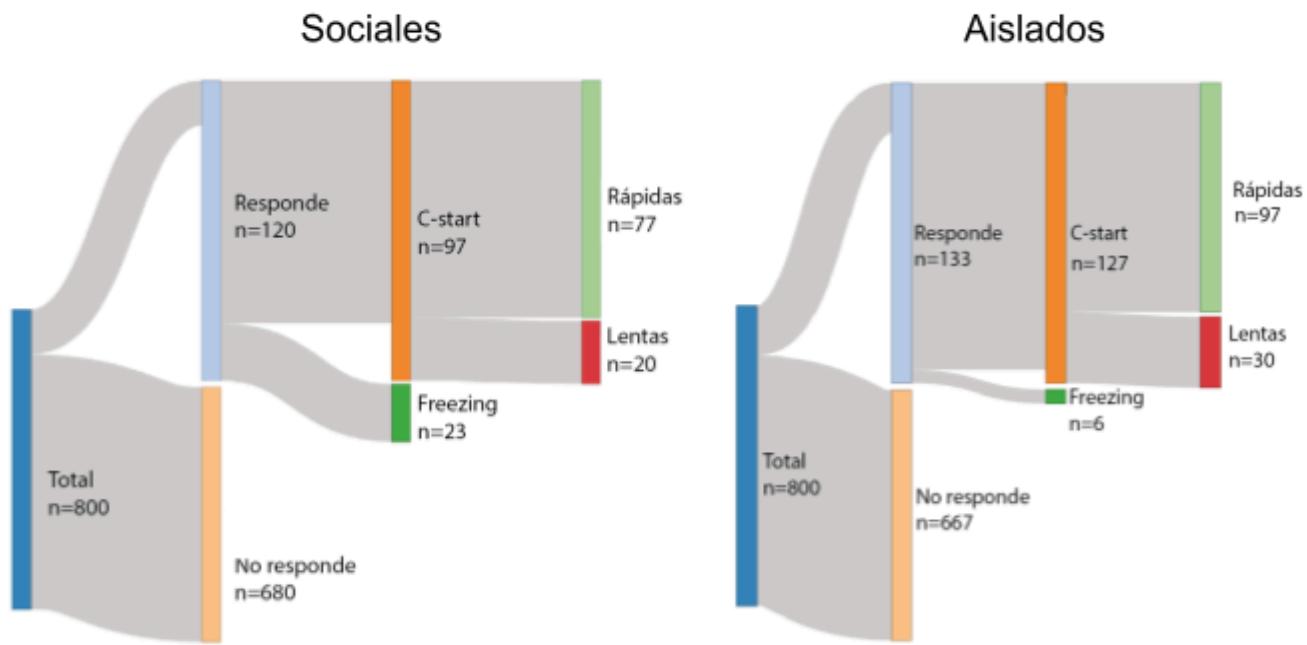


Figura 19: Diagrama aluvial mostrando el repertorio motor de peces cebra que se desarrollaron en un contexto social (izquierda) y en un contexto de aislamiento (derecha), ante estímulos auditivos y visuales.

De los 800 ensayos de cada grupo (100 animales con 8 ensayos cada uno, considerando todos los tipos de estímulos y agrupando todo el período de experimentación) se observa una distribución similar en los tipos de escape (Chi-Cuadrado: Rápidas (SLC) ($\chi^2=0.26$, p-valor=0.61), Lentas (LLC) ($\chi^2=0.26$, p-valor=0.61)), mientras que los animales S hacen proporcionalmente más respuestas de freezing (Chi-Cuadrado: Freezing ($\chi^2=9.28$, p-valor=0.002)). Sin embargo esto puede deberse a un pequeño grupo de individuos de los animales S que realizaron freezing en la mayoría de los ensayos.

En paralelo, se entrenó un modelo de DLC para determinar la trayectoria de los animales durante todo el ensayo y extraer diferentes variables de la conducta locomotora. En primer lugar, analizamos la conducta locomotora de los animales en ausencia de estimulación. Para ello, utilizamos los 2 ensayos unisensoriales auditivos únicamente en el período previo a la presentación del estímulo auditivo (8 s) donde no hay ningún tipo de estimulación. En base a los datos de la posición de cada animal obtenida con DLC, se calculó la distancia total recorrida en el período previo a la estimulación, que se muestra en la **Figura 20**. Encontramos que ambos grupos de animales recorren distancias similares durante el período previo a la estimulación ($S=149\pm3.75$ mm vs. $A=141\pm2.82$ mm, Welch t-test, $t=-1.7$, $p=0.08$).

Luego analizamos si existían diferencias en algún momento específico del aislamiento (es decir si había un efecto significativo de la semana) mediante un ANOVA 2f (con condición social y semanas de aislamiento como variables explicativas, **Figura 21**). El

análisis no mostró un efecto significativo de las variables (ANOVA 2f (Cond. Social $F= 2.97$, $p=0.086$ / Semanas $F= 0.70$, $p=0.49$, Interacción: NS)).

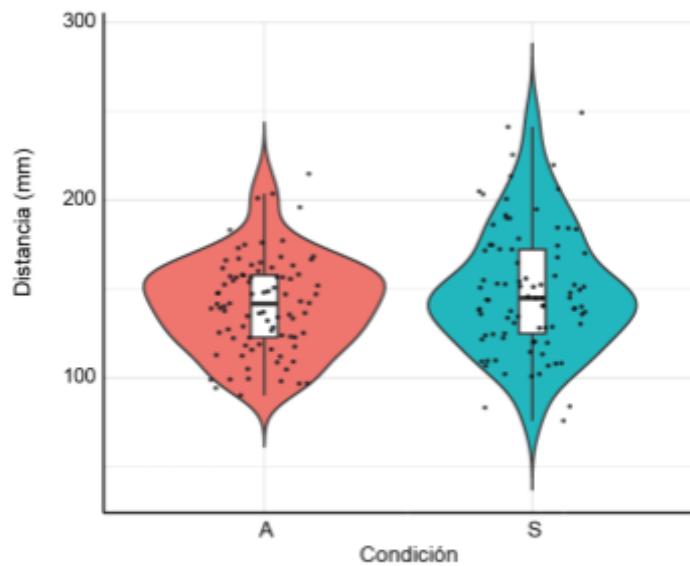


Figura 20: Distancia (mm) recorrida en el período previo a la estimulación en función de la condición de desarrollo. $n_A=88$; $n_S=88$.

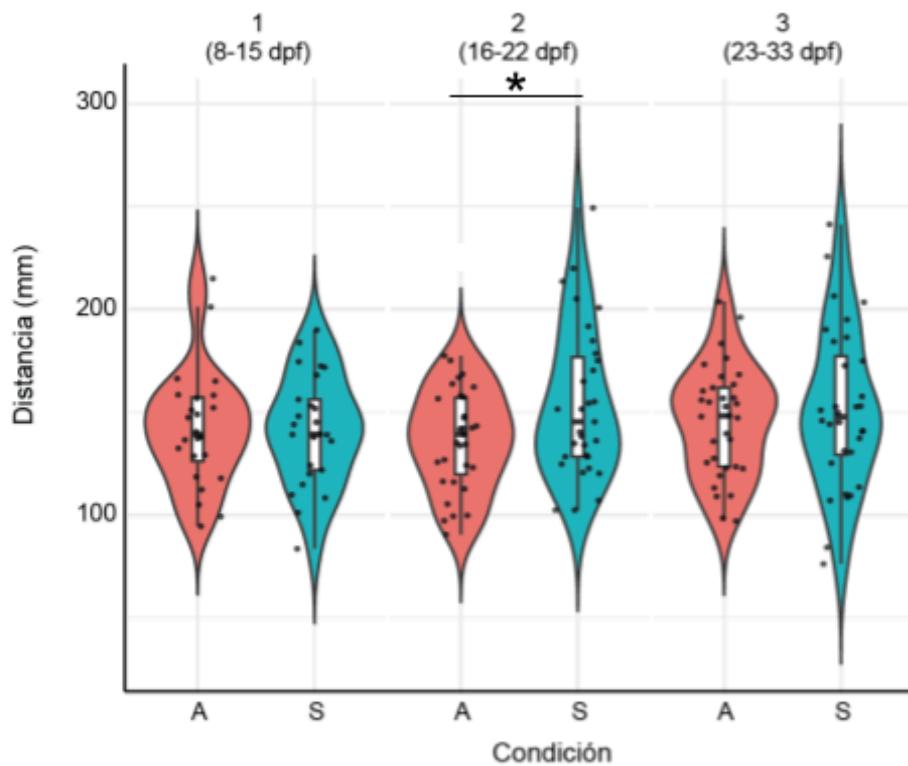


Figura 21: Distancia (mm) recorrida en el período previo a la estimulación en función de la condición de desarrollo y del período de aislamiento. S1: $n_A=24$, $n_S=25$; S2: $n_A=31$, $n_S=31$; S3: $n_A=33$, $n_S=32$.

En conclusión, el análisis de la actividad locomotora previa a la estimulación indica que ambos grupos de animales se comportan de manera similar para las semanas 1 y 3

pero no para la semana 2, es probable que esa diferencia se deba a datos outliers por lo que esta diferencia desaparecería si se realizaran más experimentos en el futuro. Es importante mencionar, que, quizás en una decisión desacertada en nuestro diseño experimental, no grabamos la actividad exploratoria durante el período de aclimatación que habría sido una medida menos sesgada de la respuesta “basal”. Al tomar los períodos previos a la estimulación auditiva unisensorial, en la mayoría de los casos, los animales ya recibieron otros estímulos diseñados para evocar escapes, por lo que los animales podrían estar más o menos “sensibilizados”.

Probabilidad de escape por períodos de aislamiento social

Para evaluar específicamente el **Objetivo 3** de esta tesis, se realizó inicialmente un análisis de la probabilidad general de escape entre el grupo de individuos aislados y el grupo social sin distinguir entre estímulos. Para ello, para cada individuo se contabilizaron el número total de ensayos en los que produjo algún tipo de escape sobre el número de ensayos totales (8). La **Figura 22** muestra que no hubo una diferencia significativa general entre ambos grupos y que cuando se combinan todos los tipos de estímulos y todos los períodos de aislamiento hay una probabilidad de respuesta general de alrededor del 20% para ambos grupos de animales. Por esto se decidió profundizar el análisis, enfatizando en primer lugar en la diferencia en base a los períodos de aislamiento.

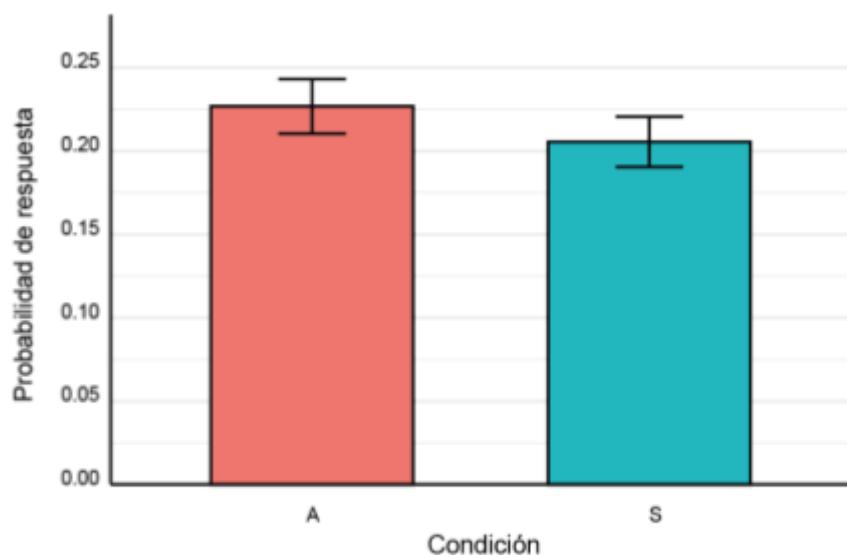


Figura 22: Probabilidad de respuesta en función de la condición de desarrollo. La barra roja representa el grupo de peces aislados $n_A=70$, y la barra cyan el grupo de peces sociales $n_S=59$.

Se realizó un anova de 2 factores con el fin de determinar si la condición del individuo y el período de aislamiento afectan la probabilidad de gatillar una respuesta C-start

y evaluar específicamente si había diferencias en los grupos en alguna de las semanas. Encontramos que la interacción entre ambas variables es significativa (**Figura 23**, Condición: $F=0.92$ p-valor=0.33; Semana: $F=0.009$ p-valor=0.99; Interacción Semana-Condición: $F=3.11$ p-valor=0.048).

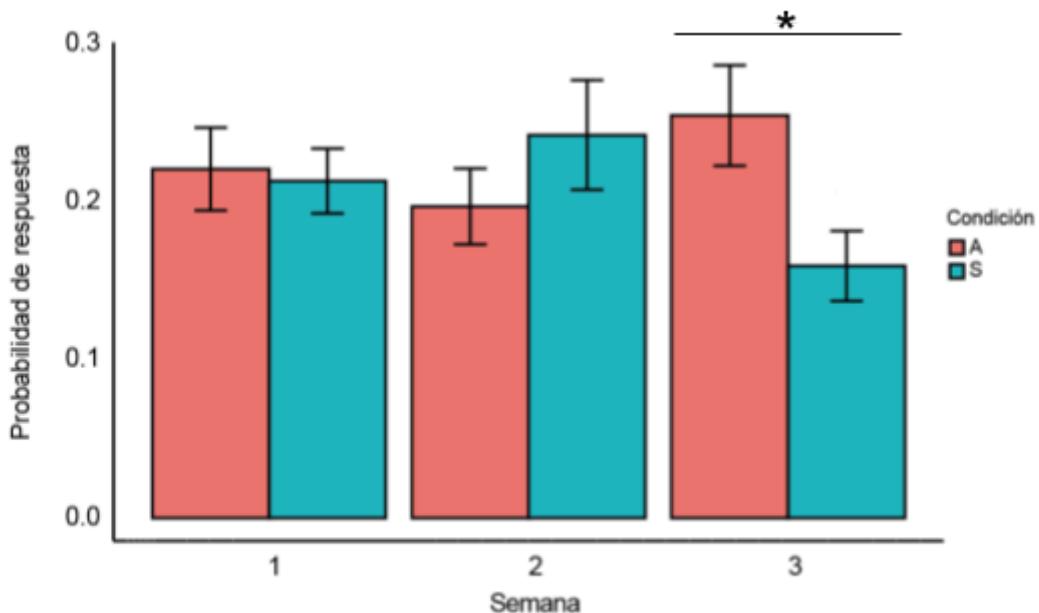


Figura 23: Probabilidad de respuesta en función de los períodos de aislamiento y de la condición. Las barras rojas representan el grupo de peces aislados y las barras cyan el grupo de peces control. S1: $n_A=26$, $n_S=24$; S2: $n_A=19$, $n_S=17$; S3: $n_A=25$, $n_S=18$. * $p<0.05$.

Debido a que la interacción resultó (marginalmente) significativa, realizamos contrastes de Tukey para comparar la evolución de la probabilidad de respuesta a lo largo de las semanas. En particular, dado que habíamos encontrado que las diferencias producidas por el aislamiento social se evidenciaban especialmente durante la tercera semana de aislamiento (**Figura 16**) nos interesaba determinar si la disminución en el IPV durante la semana 3 correlacionaba con un cambio en la probabilidad de escape en ese mismo período. Efectivamente, si bien durante la primera y segunda semanas de aislamiento (semanas 2 y 3 de vida) no se observaron diferencias significativas en la probabilidad de respuesta entre animales aislados y sociales (**Figura 23**) en la semana 3 se puede evidenciar que los peces aislados tienen una probabilidad de evocar una respuesta de tipo C-start mayor a la de los peces aislados. Durante esta semana los peces aislados tuvieron una probabilidad de escape media= 0.25 ± 0.032 mientras que el grupo control tenía una media= 0.16 ± 0.022 .

En síntesis, el análisis de la probabilidad de respuesta cuando se analiza el efecto de la condición de desarrollo teniendo en cuenta el tiempo de aislamiento, sugiere que, a

partir de la tercera semana de aislamiento (cuando los animales tienen entre 23-33 dpf) los animales aislados muestran una probabilidad de respuesta ligeramente mayor mientras que la reactividad de los animales sociales disminuye. Sin embargo, este primer análisis donde se combinan diferentes estímulos y diferentes modalidades de respuesta podría estar enmascarando diferencias más sutiles en el comportamiento de escape de los dos grupos, que se analiza a continuación.

Cinética de la respuesta de escape

Debido a que teníamos identificados los momentos exactos de ocurrencia de cada uno de los eventos de escape, analizamos características cinéticas de cada evento de escape en base a las trayectorias reconstruidas con DLC. Para cada evento se analizaron desde 40 ms antes (18 marcos) antes del comienzo de la respuesta hasta 40 ms después. A partir de las coordenadas x e y correspondientes a los puntos de los ojos (**Figura 24b**) se calculó la máxima velocidad lineal de la cabeza (**Figura 24c**) y la máxima velocidad angular (**Figura 24d**) del animal durante el C-start.

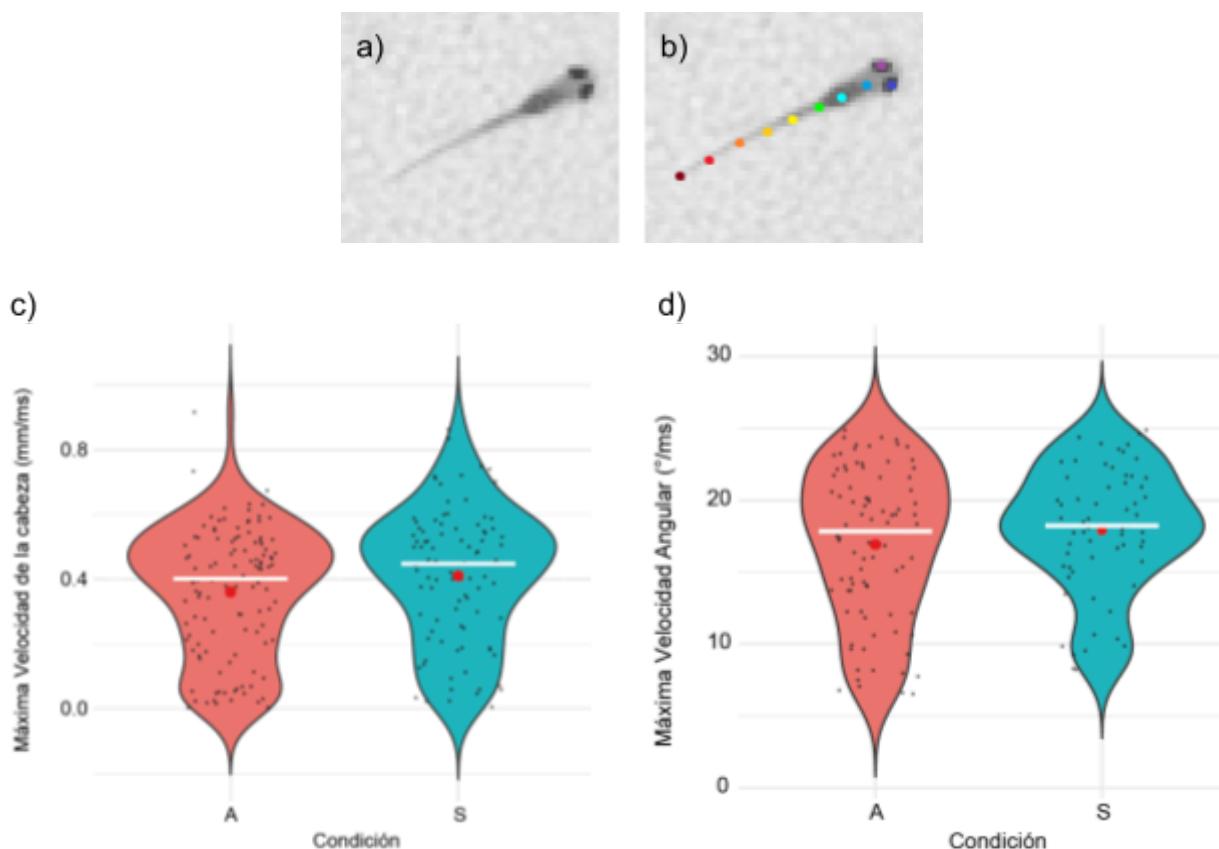


Figura 24: (a) y (b) Fotogramas del pez cebra indicando los segmentos corporales que se trackearon durante los experimentos de escape. (c) Gráficos de la Máxima velocidad de la cabeza [$n_A=116, n_S=93$] y (d) Máxima velocidad angular [$n_A=88, n_S=65$] en función de la condición.

Considerando una ventana de 80 ms alrededor del inicio de la respuesta de escape, encontramos que no hubo diferencias significativas entre animales A y S con respecto a la velocidad máxima de la cabeza (A: 0.36 ± 0.018 mm/ms, S: 0.411 ± 0.021 mm/ms; test de t: $t = -1.7604$, p-valor=0.079) ni con respecto a la máxima velocidad angular (A: 6.98 ± 0.56 °/ms, S: 17.91 ± 0.54 °/ms; test de t: $t = -1.2028$, p-valor=0.231).

Pese a que a partir de la tercera semana de aislamiento observamos una diferencia en la evaluación de peligro por parte de animales aislados y animales criados en contexto social, no parecería haber, a priori, una diferencia importante en la cinética de las respuestas de escape. Es decir que parecería modificarse la probabilidad de tomar la decisión de escapar, pero una vez tomada, el patrón motor que se ejecuta es igual.

Sin embargo, como se comentó en la **Introducción**, los peces cebra pueden hacer, al menos, dos tipos de respuesta de escape, las SLC y las LLC (Burgess and Granato 2007, Troconis et al. 2017, Marquart et al. 2019). Podría ser, por lo tanto que si bien en términos generales no se observaron diferencias entre los grupos sí hubiera una diferencia en la proporción de SLC y LLC que ejecutan.

Caracterización de la respuesta motora utilizando un análisis de reducción de dimensionalidad

Como mencionamos arriba, los peces cebra pueden ejecutar SLC y LLC. Sin embargo, además de la duración del C1, estos dos tipos de respuestas se diferencian en otras variables del escape, las SLC son en términos generales más “vigorosas” que las LLC, pero no hay un único parámetro cinético (como la velocidad angular o la velocidad lineal) que las permitan distinguir claramente. Por lo tanto, recurrimos a una estrategia que había sido previamente utilizada en el laboratorio (Agulló et al. 2023) que consiste en tomar muchas variables cinéticas de cada evento de escape de cada individuo y luego realizar un análisis de reducción de dimensionalidad para poder estudiar el espacio n-dimensional en el que se inscribe cada escape en una representación 2-dimensional y de esta manera determinar si: 1) efectivamente estos animales estaban realizando tanto SLC como LLC (si surgieran al menos dos *clusters* de datos), y 2) determinar si individuos aislados y sociales estaban representados homogéneamente en ambos grupos.

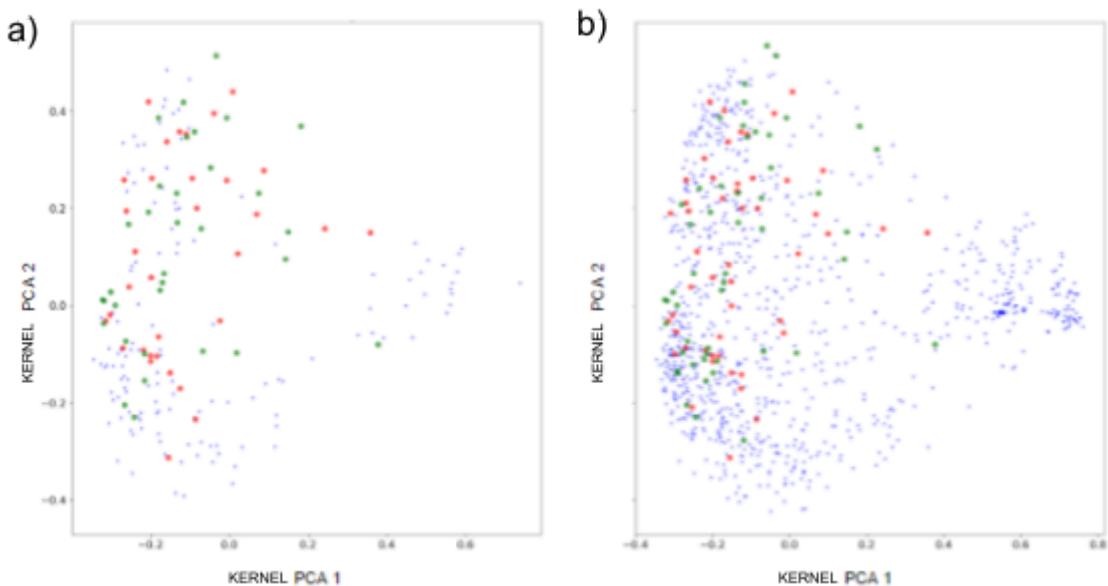


Figura 25: En estos gráficos, el eje X y el eje Y representan las dos primeras componentes principales obtenidas después de aplicar la descomposición Kernel PCA. En este caso los puntos verdes son C-start de los individuos aislados, y los rojos son respuestas reportadas de los peces control; los puntos azules son eventos no reportados. El gráfico (a) muestra los eventos ocurridos en una ventana temporal inmediata al estímulo auditivo y al final del looming, mientras que el gráfico (b) abarca los eventos evocados a lo largo de todo el video.

Para realizar este tipo de análisis se tomaron en cuenta distintas variables cinéticas que se calcularon mediante las coordenadas de los segmentos (**Figura 24b**) obtenidas por DLC. Dichas variables son: velocidad lineal de la cabeza, velocidad lineal de la cola, velocidad angular de la cabeza, aceleración lineal de la cabeza, aceleración angular de la cabeza, suma de los ángulos de la cola, suma de la curvatura, tasa de cambio de la curvatura, distancia cabeza-cola, variación de la aceleración de la cabeza, variación de la aceleración de la cola (estas últimas dos son la derivada de la aceleración de la cabeza y de la cola respectivamente, representan cambios rápidos o movimientos bruscos de estos segmentos).

Luego a través de un algoritmo automático se detectan eventos que superan un umbral de velocidad lineal instantánea de la cabeza de 0.093 mm/ms, que incluyen los eventos reportados por el observador. En la **Figura 25** se muestra el resultado del análisis de reducción de dimensionalidad realizado con Kernel PCA. En ambas figuras los escapes reportados provenientes de animales A se colorearon de verde, los de animales S de rojo y los puntos azules son eventos rápidos que superaron el umbral pero que no fueron reportados como escapes. Debido a lo estereotipado de los escapes tipo C-start, es sencillo para un ojo entrenado determinar su ocurrencia. Los eventos efectivamente reportados por escape fueron primero categorizados por un observador entrenado y un subset fue reevaluado por otro observador, por lo que tenemos una alta confianza en que no se sobre-

ni sub-reportaron escapes. Sin embargo en la **Figura 25** hay una gran cantidad de puntos azules que, al superar el umbral establecido para detectar eventos rápidos, fueron incorporados al análisis. Sin embargo, es probable que la mayoría de esos puntos azules sean o eventos de nado rápido (pero escapes), respuestas rápidas tipo zig-zag o en una pequeña proporción, artefactos del tracking. Si bien en esta tesis no refinamos el proceso lo suficiente como para descartar completamente estos eventos de no-escape, al comparar la **Figura 25a** y la **b**, (donde se grafican los eventos ocurridos exclusivamente dentro de la ventana de estimulación en **a** y en todo el video en **b**) se observa que la mayoría de estos eventos “espurios” ocurren fuera de la ventana de análisis y no fueron evocados por los estímulos aplicados.

En cualquier caso, con esta estrategia de reducción de dimensionalidad se obtuvo una representación 2-dimensional que sugiere la existencia de tres grupos de eventos con los escapes reportados (nuestro *ground truth*) presentes en sólo dos de ellos, que se concentran en valores negativos del primer componente del Kernel PCA. Sin embargo, en este trabajo no dispusimos de tiempo suficiente para poder asignar una categoría comportamental a estas tres nubes de puntos (que por ejemplo podrían ser SLC, LLC y eventos de nado rápido) por lo que no ahondaremos en su interpretación. En cualquier caso, la distribución de escapes de animales A y S no “clusterizan” en grupos distintos sino que se distribuyen homogéneamente en las dos nubes principales. Estos resultados, si bien preliminares, sugieren nuevamente que no hay diferencia en la cinética de los escapes entre animales A y S sino en la probabilidad de evocarlos.

Cabe mencionar que se utilizaron otras técnicas de reducción de dimensionalidad como análisis de los componentes principales (PCA) y T-SNE, sin embargo ninguna de ellas logró realizar una mejor separación de las nubes de puntos.

Análisis de la respuesta de escape frente a distintos tipos de estímulos uni y multisensoriales

El **Objetivo 4** de esta tesis propuso evaluar si la integración de claves visuales y acústicas difería entre animales A y S. Como se mencionó en la Introducción, la integración multisensorial se establece durante el desarrollo, a medida que maduran los sistemas sensoriales y el “cableado” neuronal que distribuye la información sensorial a distintas áreas del cerebro. Además, el establecimiento de la correcta codificación sensorial es dependiente de información del medio externo y de la presencia de dicha estimulación sensorial durante períodos críticos de la maduración del sistema nervioso. El aislamiento por lo tanto podría producir alteraciones en la integración sensorial tanto por falta de estimulación en dichos períodos críticos (porque por ejemplo la estimulación visual será menor al no haber

coespecíficos) o porque, producto del aislamiento, la saliencia de los estímulos se vea alterada.

Para determinar si el aislamiento producía un cambio en la integración multisensorial analizamos la probabilidad de respuesta a cada una de las combinaciones multisensoriales utilizadas (que en los análisis anteriores fueron agrupadas). En la **Figura 26**, se presentan las frecuencias observadas (FO) de respuesta para cada uno de los dos estímulos auditivos unisensoriales, los dos estímulos visuales multisensoriales y sus cuatro combinaciones en forma de cuadrícula o matriz donde la intensidad del color azul representa la probabilidad de respuesta. Además, se informan las probabilidades de respuesta de escape (SLC y LLC) únicamente durante la ventana de análisis (en negro) o durante todo el ensayo (en rojo).

Considerando únicamente los estímulos auditivos (para animales A y S), se puede observar que casi no existen escapes fuera de la ventana de análisis (460 ms posteriores a la presentación del estímulo auditivo). En cambio, para los estímulos unisensoriales visuales se observa que, de hecho, la mayor parte de los escapes ocurren fuera de la ventana de análisis. Esto no significa que sean respuestas “espontáneas” si no que representan respuestas que ocurren en las primeras etapas de expansión del estímulo looming o muy posteriores a su finalización (**Figura 9**).

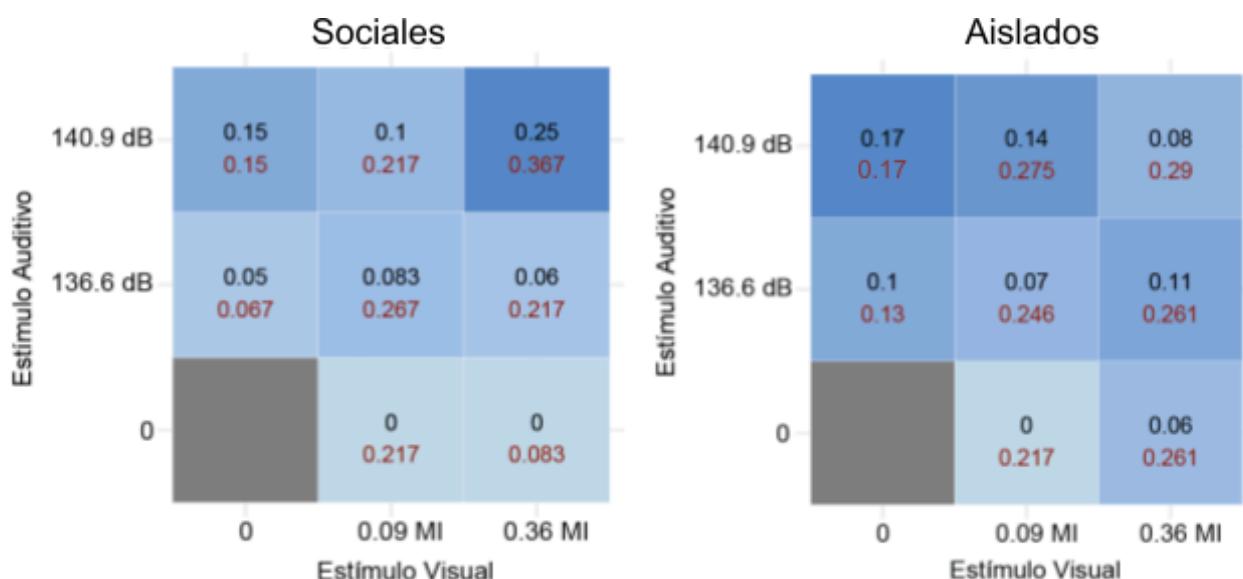


Figura 26: Matriz de frecuencias observadas para la batería de estímulos en función de las respuestas totales. A la izquierda se ubica la matriz de F.O. para el grupo control. A la derecha se observa la matriz de F.O. para los peces aislados. Los números en negro representan la probabilidad de evocar una respuesta durante la ventana de estimulación, mientras que los números rojos representan la probabilidad de evocar una respuesta a lo largo de todo el video. $n_S=60$, $n_A=69$.

En la **Figura 26** se aprecia que en ambos grupos experimentales pero especialmente para los animales S, la diagonal, es decir la combinación de los estímulos

multisensoriales de baja saliencia y la combinación de estímulos de alta saliencia, aumenta a medida que los componentes unimodales de los estímulos son más fuertes. En particular, si bien animales A y S no difieren en la probabilidad de respuesta para el estímulo multimodal de menor intensidad (0.09MI-136.6dB), los animales sociales tienen una respuesta significativamente mayor para la combinación multimodal de mayor intensidad (0.36MI+140.9dB, z-score: $z=-3.24$, $p=0.012$).

Como se discutió en la sección de **Métodos**, en base a las frecuencias observadas para los estímulos unimodales y asumiendo que no hubiera integración (es decir que la probabilidad de responder a un estímulo multisensorial resultara de las probabilidades de responder o al estímulo auditivo o al estímulo visual) se puede calcular una probabilidad esperada en ausencia de integración (PE) y a partir de la probabilidad observada (PO) calcular un índice de Integración Multisensorial (**Ecuación 3**).

La **Figura 27** muestra el resultado de calcular el IM para animales A y S de cada una de las cuatro combinaciones de estímulos multimodales. En estos gráficos cuanto más amarillo es el cuadrante, más cerca de 1 estará el valor del IM, indicando una mejora multisensorial máxima y cuanto más morado, más cerca de -1, indicando una supresión multisensorial. El color gris del cuadrante indica que el valor del índice es cercano a 0 y por ende donde no se pudo comprobar que haya integración multisensorial.

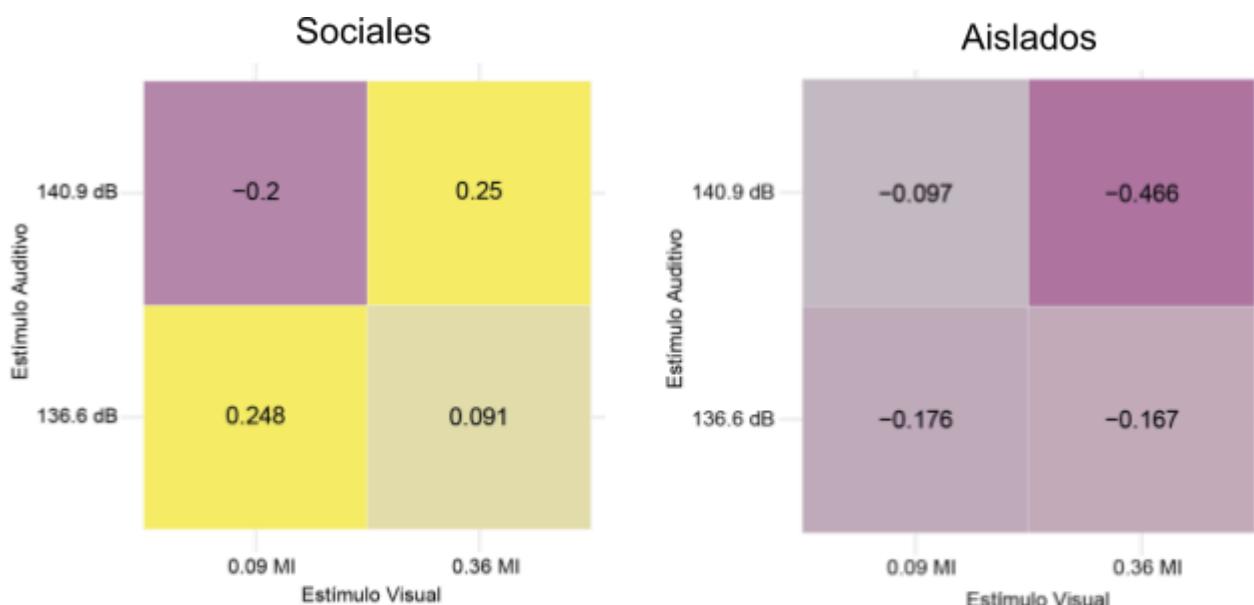


Figura 27: Matriz de integración multisensorial. A la izquierda la matriz de los peces control, y a la derecha la matriz de los peces aislados. $n_S=60$, $n_A=69$.

En la **Figura 27** se puede observar que en los individuos A en ningún caso se obtienen IM con valores positivos, lo que sugiere que la probabilidad de escapar no aumenta cuando se combinan un estímulo auditivo y uno visual. Más aún, en el caso del

estímulo multimodal de mayor intensidad, parecería haber una integración inhibitoria, es decir que los animales estarían respondiendo *menos* de lo que se espera si no hubiera integración. Al contrario, cuando los peces S son estimulados con una combinación de estímulo visual y auditivo de alta saliencia, se observa que el índice de integración multisensorial es positivo y alto en comparación con los valores obtenidos por el grupo de peces A. Para la combinación de menor saliencia, también se observa un IM positivo aunque de menor magnitud.

En resumen, cuando estudiamos las respuestas de escape SLC y LLC en conjunto, se ve que los animales A tienen probabilidades de respuesta unisensoriales iguales o mayores a los individuos S (especialmente en lo referido a las respuestas visuales) pero que realizan una integración multisensorial inhibitoria o nula. En contraposición, para los animales S se observa una mejora multisensorial en las respuestas para las combinaciones de baja y alta intensidad de estímulos multimodales.

6.3 Aislamiento parcial

El último objetivo de esta tesis (**Objetivo 5**) consistió en analizar si una semana de aislamiento social es suficiente para afectar la probabilidad de respuesta y la preferencia visual social de peces que estuvieron anteriormente en contexto social. Para ello un grupo de 25 animales se mantuvo en condiciones sociales desde 1 hasta 15 dpf y luego fueron aislados en contenedores individuales desde el 16 dpf y se los mantuvo aislados hasta el testeo (ocurrido entre 23 y 33 dpf), es decir que estos animales se desarrollaron en condiciones control las dos primeras semanas de vida y luego fueron aislados por al menos una semana. En estos animales se evaluaron los mismos parámetros que en las secciones anteriores y se los comparó con animales A y S de la misma edad (de entre 23 y 33 dpf). De nuevo, para este análisis se partió de un grupo de 25 animales pero no se incluyeron en el análisis de interacción social los individuos que nunca entraron a la CS y a la CNS (10/25), o que no respondieron a ningún estímulo en el paradigma de escape (11/25).

Los resultados obtenidos durante el ensayo de interacción social se indican en la

Figura 28.

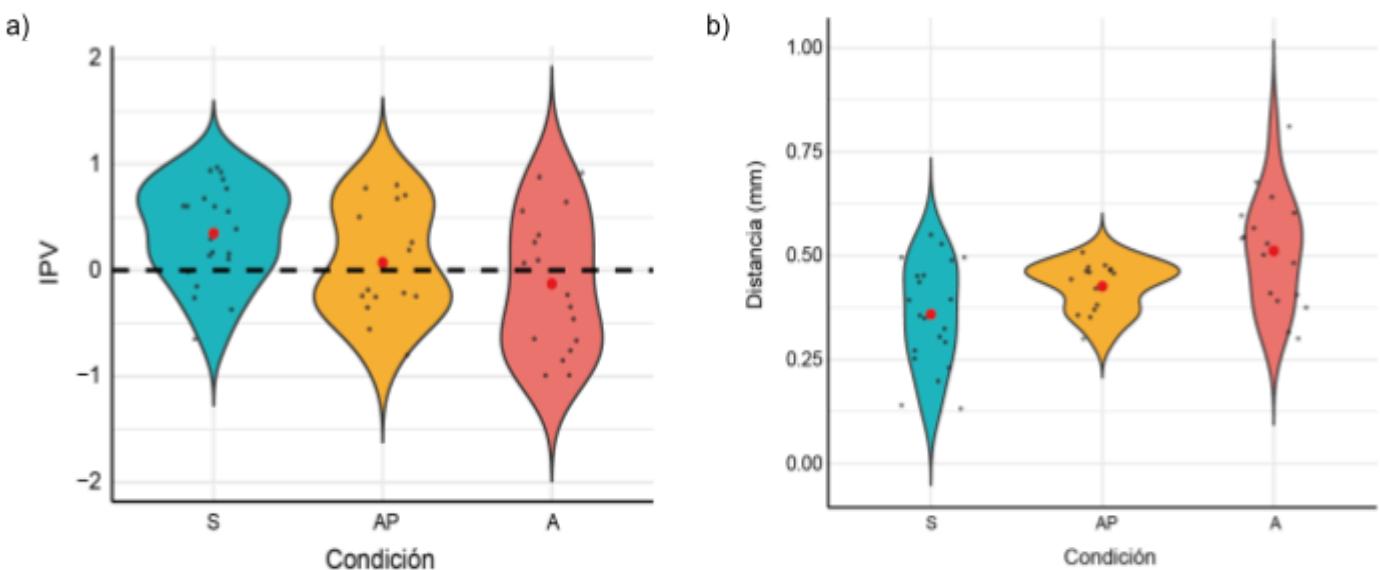


Figura 28: Índice de Preferencia Visual (IPV) (a) y Distancia (mm) a la barrera (b) en función de la condición. La barra roja representa el grupo de peces aislados ($n_A=17$), la barra cyan el grupo de peces sociales ($n_S=21$) y la barra amarilla el grupo de peces aislados parcialmente ($n_{AP}=15$).

Se puede observar que peces de tres semanas de vida que fueron aislados a partir del día 15 dpf y por lo tanto experimentaron un aislamiento parcial (AP), en amarillo, tienen valores intermedios de IPV y de Distancia a la barrera de la cámara social, ubicándose entre los peces S y los A (IPV: S=0.35 ± 0.10; AP=0.072 ± 0.13; A= -0.13 ± 0.16). Estos resultados están en línea con lo observado por Tunbak y colaboradores (2020) donde animales de 3 semanas de edad sometidos a 48 hs de aislamiento previo al testeo también muestran una reducción intermedia de su IPV. Se realizaron análisis de anova de 1 factor con el fin de determinar si la condición del individuo afecta el IPV o la distancia a la barrera. Encontramos que la condición de desarrollo es significativa para ambas variables (Anova 1F: IPV Condición Social: $F=3.65$, p-valor=0.033; Distancia a la barrera (mm): Condición: $F=6.75$, p-valor=0.002). Las comparaciones de Tukey solo mostraron diferencias entre los A y los S como vimos en la **Figura 16** (p-valor=0.02) y en la **Figura 18** (p-valor=0.002) respectivamente, mientras que los animales AP al tener un valor intermedio no difieren de ninguno de los otros dos grupos.

Probabilidad de escape

Se realizó un análisis de la probabilidad general de escape entre los tres grupos de individuos (**Figura 29**).

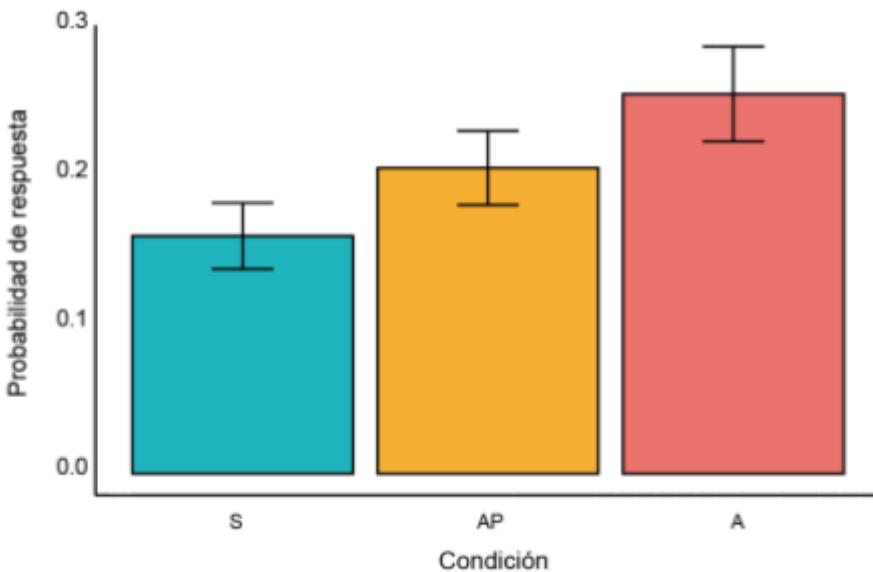


Figura 29: Probabilidad de respuesta en función de la condición de desarrollo para peces. La barra roja representa el grupo de peces aislados ($n_A=25$), la barra cyan el grupo de peces sociales ($n_S=18$) y la barra amarilla el grupo de peces aislados parcialmente ($n_{AP}=14$).

Se realizó un anova de 1 factor con el fin de determinar si la condición del individuo afecta la probabilidad de escape, y evaluar específicamente si había diferencias entre los grupos. Encontramos que la condición de desarrollo no es significativa (Anova 1f, Condición: NS, $F=2.97$, p-valor=0.059*). Como en los ensayos anteriores, los animales AP obtuvieron una probabilidad de escape intermedia entre el grupo A y el S ($AP=0.2\pm0.03$).

Debido a que solo 14 de 25 animales respondieron alguna vez, sólo analizamos la probabilidad general de escape y no realizamos un análisis de integración multisensorial debido al bajo n.

Esto sugiere la posibilidad de que aún habiéndose desarrollado en un contexto social, plagado de estímulos visuales y auditivos, bastaría con aislar larvas de peces cebra al menos una semana para observar un cambio en la preferencia visual social (IPV) y en la probabilidad de evocar una respuesta. Sin embargo para corroborar estos resultados en la integración multisensorial sería necesario repetir este experimento con un mayor número de individuos.

7. Discusión y conclusiones

La hipótesis de este trabajo se centra en que el aislamiento durante el desarrollo temprano impacta el desarrollo normal de las áreas responsables del procesamiento e integración sensorial de estímulos de peligro en larvas de peces cebra (*Danio rerio*). A su vez, esto alteraría la evaluación de la peligrosidad de los estímulos y, en consecuencia, modificaría la probabilidad de ejecutar respuestas evasivas. Nuestros hallazgos destacan la importancia de la interacción social en el desarrollo de las larvas de pez cebra, revelando que el aislamiento social durante las etapas tempranas tiene un impacto significativo en la evaluación de peligro y en la ejecución de comportamientos evasivos, especialmente a partir de la tercera semana de vida.

En primer lugar, validamos el paradigma desarrollado por Dreosti et al. 2015 y Tunbak et al. (2020) incorporando al laboratorio una nueva herramienta de análisis de la conducta que no había sido utilizada antes (**Objetivo 1**). Esto representó un desafío en sí, tanto metodológicamente como con respecto al análisis de los resultados. Si bien los métodos de los trabajos citados eran detallados, encontramos que la utilización de contenedores muy pequeños comprometía la supervivencia de los animales, quizás por dificultades para la limpieza y cambio de agua que hay que realizar diariamente, quizás porque representaba poca superficie de nado o poca superficie para intercambio gaseoso. En todo caso, resuelta esa cuestión al cambiar a recipientes de 50 ml, hubo que en primer lugar aprender a usar herramientas de diseño en 3D para producir la cámara de interacción social, luego debimos optimizar, iterando el proceso varias veces, el material utilizado como barrera transparente. Esto se debe a que, por el pequeño tamaño de las larvas (alrededor de 1-2 mm) las sombras proyectadas por las paredes de la cámara o de las barreras eran suficientemente importantes como para ocultar completamente a los animales (y “perderlos” de la filmación). Finalmente, debimos desarrollar un dispositivo para la adquisición de la preferencia visual social que asegurara una iluminación intensa pero homogénea para obtener un buen contraste entre las larvas y su fondo que permitiera su *tracking* eficiente con DLC. Por último, debimos ajustar la distancia entre la cámara de adquisición de videos y la arena experimental de manera de tener llegar al compromiso óptimo donde se maximice el tamaño de la imagen (para aprovechar al máximo la resolución espacial de la cámara) minimizando la aberración esférica que tiene la lente de la cámara (que distorsiona y desenfoca las imágenes en la periferia del campo de registro de la cámara). Superados todos estos desafíos, queda hoy en el acervo del grupo un setup que permite estudiar de manera muy precisa un tipo de conducta social que podrá ser utilizado en el futuro para ampliar y refinar los resultados de esta tesis.

En relación específicamente a la conducta social visual (**Objetivo 2**), en este trabajo se corroboró en nuestra mano que mientras que los peces criados en condiciones sociales prefieren permanecer en contacto visual con sus coespecíficos, nuestras condiciones de aislamiento producen que esa preferencia visual desaparezca. Sin embargo, y en concordancia con estudios previos, el efecto del aislamiento se hace más evidente a medida que los animales crecen, encontrando diferencias significativas entre los grupos a partir de las tres semanas de vida (Tunbak et al. 2020). Aumentando el tamaño muestral de individuos por semana se podría determinar con mayor grado de confianza si efectivamente las diferencias no aparecen antes, como algunos experimentos parecen sugerir (semana 1 en las **Figuras 16 y 18**).

En relación a las causas que explican la falta de preferencia visual en los animales aislados, podemos mencionar que éstos se desarrollan en un contexto donde no hay estimulación de coespecíficos pero toda la estimulación visual es menor, así como de otras modalidades sensoriales (señales químicas o mecanosensoriales provenientes de otros individuos). Por otra parte, no se puede soslayar que estos animales viven en compartimentos de paredes opacas en vez de transparentes, que cuando reciben comida no deben competir por ella y que por más que disponen de un volumen por individuo mayor (50 ml vs. 20 ml para los animales sociales, ya que se alojan unos 50 animales en un contenedor de 1 litro) las distancias totales que pueden recorrer hasta encontrarse con una pared son menores. Todos estos factores, podrían estar afectando la preferencia social visual y otros comportamientos no evaluados en esta tesis.

La pregunta central de esta tesis es si condiciones adversas durante el desarrollo temprano, como son el aislamiento y la falta de interacción con coespecíficos, pueden generar cambios en la evaluación del riesgo tomando como proxy de esa evaluación la probabilidad de ejecutar una respuesta de escape tipo C-start (**Objetivo 3**). Observamos que, efectivamente, larvas de 3 semanas de edad que experimentaron períodos prolongados de aislamiento social mostraron alteraciones en la evaluación de la peligrosidad de los estímulos. Específicamente, la probabilidad de realizar un escape aumenta significativamente respecto a animales sociales a partir de las 3 semanas de aislamiento (**Figura 23**). Esto puede estar vinculado al hecho de que los peces que se desarrollan en un contexto social desde el nacimiento están continuamente viviendo en competencia con sus pares y expuestos a una multiplicidad de estímulos visuales y acústicos que aprenden a ignorar dado que no representan un peligro. Por el contrario, los peces aislados, al desarrollarse en un contexto sin esos estímulos visuales o auditivos, podrían tener umbrales de respuesta menores, de tal forma que escapan ante estímulos

que sus pares sociales deciden ignorar. Que dichas diferencias emergen a partir de la tercera semana de vida coinciden con la edad a la que se empiezan a manifestar diferencias importantes en el IPV. Esto podría deberse tanto a que es necesario ese período de aislamiento o que sean comportamientos que dependen del desarrollo del sistema nervioso y de mecanismos de aprendizaje y memoria que se establecen más tarde. En cualquier caso, si bien observamos que el aislamiento produce una diferencia en la *decisión* de escapar o no (es decir en la probabilidad de escape) no logramos encontrar ninguna diferencia en la *cinética* de dichos escapes. Animales sociales y aislados no difieren ni en la proporción de tipos de C-start que ejecutan (SLC y LLC, **Figura 19**), ni en la distancia recorrida en períodos sin estimulación (**Figuras 20 y 21**) o en la velocidad lineal o angular de su cabeza durante los eventos de escape (**Figura 24**). Incluso, cuando intentamos hacer un análisis más integral de la cinética de las respuestas de escape de animales aislados y sociales utilizando técnicas de reducción de dimensionalidad, en ningún caso encontramos que los escapes se separaran (**Figura 25**). Esto sugiere que el aislamiento no afecta las redes motoras encargadas de ejecutar el escape si no que afectaría áreas involucradas en el paso previo, que es tomar la decisión de si el nivel de riesgo representado por el estímulo justifica la evocación o no un escape (que de por sí es una conducta muy disruptiva del resto de las actividades).

Esto último, señala la importancia del valor subjetivo de peligrosidad que le atribuyen los animales a estímulos que desde el punto de vista del investigador son idénticos. De esta manera, estímulos “débiles” y por ende poco salientes en términos de evocar una respuesta de escape para un grupo de animales podrían ser “fuertes” y muy salientes para otro grupo. Por otro lado, como se mencionó en la **Introducción**, la integración multisensorial mejora la posibilidad de detección de un estímulo integrando claves sensoriales de modalidades independientes como la vista y el oído. De esta manera, estímulos “débiles” o ambiguos que de por sí no generan una respuesta, al ser integrados con otro similarmente débil podrían combinarse para que el animal sí decida tomar una decisión respecto a ellos y realizar (o inhibir) una cierta respuesta motora. En el **Objetivo 4** de este trabajo, nos propusimos indagar más en profundidad tanto la saliencia atribuida a estímulos auditivos y visuales de diferentes intensidad (y por ende de saliencia potencialmente distinta) por animales sociales y aislados como a la integración multisensorial que hacían ambos grupos de peces.

Si se analizan detalladamente las probabilidades de respuesta unisensoriales de la **Figura 26**, considerando las probabilidades observadas durante todo el período de estimulación (números rojos), al comparar animales sociales y aislados, puede observarse que si bien ambos grupos aumentan su probabilidad de respuesta cuando aumenta la

intensidad del estímulo auditivo unisensorial, los animales aislados tienen una mayor reactividad que los sociales frente al estímulo auditivo de menor intensidad (0.13 vs. 0.067, 136 dB). Respecto a los estímulos visuales unisensoriales, si bien para los animales aislados se observa una tasa de respuesta que aumenta con el contraste del estímulo, para los animales sociales se observa que responden menos para el estímulo de mayor contraste. Este resultado inesperado podría deberse a, o bien ser producto de una mala estimación de la probabilidad real debido a un bajo número muestral o bien, podría relacionarse con el hecho de que los animales sociales realizan más freezing que los animales aislados (**Figura 19**) y podría ocurrir que algunos animales sociales optan por este tipo de respuesta (freezing) en vez de un escape. En total, exceptuando esa única condición, los animales aislados tienden a mostrar una mayor reactividad tanto a los estímulos auditivos como a los estímulos visuales unisensoriales. Sin embargo, cuando nos concentramos en los estímulos multisensoriales, considerando la ventana específica de análisis de la integración multisensorial (**Figura 9** y números negros en **Figura 26**), vemos que los animales aislados presentan probabilidades de respuesta menores que los sociales, donde efectivamente, la combinación de claves visuales y auditivas independientes incrementa la probabilidad de escape. Esto se traduce en índices de integración multisensorial mayoritariamente positivos para los animales sociales (**Figura 27**) mientras que en los animales aislados se observan índices de integración multisensorial cercanos a cero (es decir no integración) o negativos (indicando una supresión de la mejora multisensorial). La explicación más parsimoniosa a este resultado, es que los animales aislados están respondiendo a los estímulos visuales en forma anticipada (es decir antes de que se produzca el estímulo auditivo, ver probabilidades de respuesta a estímulos multisensoriales en números rojos, **Figura 26**) y por ello su probabilidad de respuesta dentro de la ventana de análisis multisensorial (números negros) es menor. Considerando la combinación multisensorial de mayor intensidad (140.9 dB y 0.36 MI, **Figura 26**), los animales sociales realizan casi el 70% de las respuestas dentro de la ventana de análisis multisensorial (0.25/0.367) mientras que los animales aislados no alcanzan a realizar el 30% de las respuestas dentro de la ventana multisensorial (0.08/0.29), la mayor proporción de sus respuestas son anticipadas (es decir que ocurren antes de la presentación del componente acústico del estímulo multisensorial).

Estos resultados, en conjunto con las probabilidades de respuesta para estímulos unisensoriales, sugieren que los animales aislados tienen umbrales de respuesta menores y por ende le asignan una mayor saliencia a los estímulos que los animales sociales. De esta manera, como su reactividad general es mayor, observamos menores índices de integración multisensorial (**Figura 27**), porque responden directamente a los estímulos unisensoriales.

débiles y por lo tanto agregar un componente adicional no cambia la probabilidad de respuesta.

Considerando que las principales diferencias entre animales aislados y sociales surgían a partir de la tercera semana de vida (tanto respecto al IPV como a la respuesta de escape), nos preguntamos si lo que contribuía a esa diferencia era la edad de los animales o el tiempo de aislamiento. Como una primera aproximación a intentar diferenciar esas dos fuentes de variación, decidimos acortar el período de aislamiento de tres a una semana previa al testeo. De esta manera, pudimos analizar si una única semana de aislamiento social es suficiente para afectar la probabilidad de respuesta y la preferencia visual social (IPV) de peces de 3 semanas de edad que estuvieron anteriormente en contexto social (**Objetivo 5**). Los resultados mostraron que una semana de aislamiento genera valores intermedios en el IPV, lo que replica los resultados obtenidos por Tumbak y colaboradores (2020) que obtuvieron resultados similares con sólo 48 hs de aislamiento (**Figura 28**). Además, extendiendo esos hallazgos observamos que el aislamiento parcial también afecta la la distancia media a la barrera que muestran los animales parcialmente aislados. Por otro lado, esa intervención genera probabilidades intermedias entre sociales y aislados de ejecutar un escape (**Figura 29**). Pese a que estos resultados son preliminares y fueron realizados en un grupo menor de individuos, sugieren que si bien una semana de aislamiento afecta la preferencia visual y la evaluación de riesgo, el aislamiento más prolongado evidentemente tiene una contribución diferencial. Es un punto a desarrollar la descripción de potenciales ventanas críticas en el desarrollo respecto de la importancia de la interacción social.

Perspectivas

A pesar de que este estudio ha proporcionado evidencia valiosa sobre la influencia del aislamiento social en el desarrollo de comportamientos evasivos, se deben considerar algunas limitaciones. No se exploró el efecto del aislamiento en etapas posteriores del desarrollo, por ejemplo en peces adultos (90 dpf), lo cual sería útil dado que el impacto es más notorio a medida que el período de aislamiento aumenta.

Por otro lado en el paradigma de interacción social queda la incógnita si los peces sociales preferían estar en la CS debido a que en la CNS no había ningún tipo de estímulo visual, o si realmente se acercaban a la barrera de la CS porque reconocían a sus pares. Se podría llevar a cabo un experimento en el cual se introduzca algún tipo de estímulo en la CNS, podrían ser objetos inanimados (ej: piedras), para descartar un sesgo en la

preferencia visual por la mera presencia de un estímulo en la CS y la ausencia de uno en la CNS.

Por otro lado, si bien en este estudio se observó el efecto del aislamiento en la evaluación de riesgo y en la preferencia por conespecíficos, podría ocurrir que este contexto de desarrollo afecte otro tipo de comportamientos como el cortejo, comportamientos de agresión o incluso de caza.

Finalmente, en este trabajo no indagamos sobre las bases mecanísticas de los efectos que observamos en la conducta de los animales. Sin embargo, este trabajo es parte de un proyecto de investigación general del laboratorio, dentro del cual se realizan otros estudios relacionados al efecto del aislamiento en peces cebra. Dichas investigaciones analizan por un lado los mecanismos neuronales que subyacen la toma de decisiones en la región de la habénula utilizando técnicas de imaging de calcio para registrar la actividad neuronal, y por otro lado las estrategias de respuesta (conocidas como “active coping” y “passive coping”) en peces sometidos a situaciones de estrés, por medio de un protocolo con shocks eléctricos, en peces aislados y peces control. De esta manera, este primer trabajo sienta las bases para el estudio conductual y su base neuronal del efecto del aislamiento durante el desarrollo temprano de peces cebra.

8. Bibliografía

- Agulló V., Nicolás Martorell, & Violeta Medan. Desarrollo de un algoritmo de categorización de patrones comportamentales de peces cebra en respuesta a estímulos de peligro. In Proceedings of RAFA 2022 P 8788 (Asociación de Física Argentina, 2022).
- Banerjee, S., Bhat, M. & Riordan, M. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front. Cell. Neurosci.*, 8, (2014).
- Bhattacharyya, K., McLean, D. L., & MacIver, M. A. (2017). Visual Threat Assessment and Reticulospinal Encoding of Calibrated Responses in Larval Zebrafish. *Current biology : CB*, 27(18), 2751–2762.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.012>
- Branco, T. & Redgrave, P. The neural basis of escape behavior in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, 43, 417–439 (2020).
- Briefer EF, Xie B, Engesser S, Sueur C, Freeberg TM, Brask JB. 2024 The power of sound: unravelling how acoustic communication shapes group dynamics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 379: 20230182. <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0182>
- Budick, S. A. & O'Malley, D. M. Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. *J. Exp. Biol.*, 203, 2565–2579 (2000).
- Burgess, Harold & Granato, Michael. (2007). Sensorimotor Gating in Larval Zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27. 4984-94. 10.1523/JNEUROSCI.0615-07.2007.
- Buske, Christine, and Robert Gerlai. "Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish." *Developmental psychobiology* vol. 54,1 (2012): 28-35. doi:10.1002/dev.20571
- Curtin, P. C. P., Medan, V., Neumeister, H., Bronson, D. R. & Preuss, T. The 5-HT5A receptor regulates excitability in the auditory startle circuit: functional implications for sensorimotor gating. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 33, 10011–10020 (2013).
- Dionne-Dostie, Emmanuelle et al. "Multisensory integration and child neurodevelopment." *Brain sciences* vol. 5,1 32-57. 11 Feb. 2015, doi:10.3390/brainsci5010032
- Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A. R. & Wilson, S. W. Development of social behavior in young zebrafish. *Front. Neural Circuits*, 9, (2015).
- Eaton, R. C., Farley, R. D., Kimmel, C. B. & Schabtach, E. Functional development in the Mauthner cell system of embryos and larvae of the zebrafish. *J Neurobiol*, 8, 151–172 (1977).
- Eaton, R. C. & Farley, R. D. Mauthner neuron field potential in newly hatched larvae of the zebrafish. *J Neurophysiol*, 38, 502–512 (1975).
- Eaton, R. C. et al. "Flexible body dynamics of the goldfish C-start: implications for reticulospinal command mechanisms." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 8,8 (1988): 2758-68. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-08-02758.1988
- Elizalde-Velázquez, G. & Herrera-Vázquez, S. Zebrafish as model organism in aquatic ecotoxicology: current trends and future perspectives. *InTechOpen* (2023). <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002731>.
- Engeszer, Raymond E et al. "Learned social preference in zebrafish." *Current biology : CB* vol. 14,10 (2004): 881-4. doi:10.1016/j.cub.2004.04.042

Evans, Dominic A et al. "Cognitive Control of Escape Behaviour." *Trends in cognitive sciences* vol. 23,4 (2019): 334-348. doi:10.1016/j.tics.2019.01.012

Gabbiani, F et al. "Computation of object approach by a wide-field, motion-sensitive neuron." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 19,3 (1999): 1122-41. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-03-01122.1999

Gabbiani, Fabrizio & Preuss, Thomas & Dewell, Richard. (2023). Approaching object acceleration differentially affects the predictions of neuronal collision avoidance models. *Biological Cybernetics*. 117. 1-14. 10.1007/s00422-023-00961-0.

Groneberg, Antonia H et al. "Early-Life Social Experience Shapes Social Avoidance Reactions in Larval Zebrafish." *Current biology : CB* vol. 30,20 (2020): 4009-4021.e4. doi:10.1016/j.cub.2020.07.088

Hensch, T. K. Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 69, 215–237 (2005).

Hinz, Robert C, and Gonzalo G de Polavieja. "Ontogeny of collective behavior reveals a simple attraction rule." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 114,9 (2017): 2295-2300. doi:10.1073/pnas.1616926114

Howe, Kerstin et al. "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." *Nature* vol. 496,7446 (2013): 498-503. doi:10.1038/nature12111

Ismail, F. Y., Fatemi, A. & Johnston, M. V. Cerebral plasticity: windows of opportunity in the developing brain. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.*, 21, 23–48 (2017).

Kalueff, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10, 70–86 (2013).

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995 Jul;203(3):253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302. PMID: 8589427.

Korn, H. & Faber, D. S. The Mauthner cell half a century later: a neurobiological model for decision-making? *Neuron*, 47, 13–28 (2005).

Lauer, J., Zhou, M., Ye, S. et al. Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut. *Nat Methods*, 19, 496–504 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01443-0>.

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. *Dev. Neurobiol.*, 74, 1053–1077 (2014).

Magurran, A. E. The adaptive significance of schooling as an anti-predator defence in fish. *Ann. Zool. Fenn.*, 27, 51–66 (1990).

Maierdiyali, A.; Wang, L.; Luo, Y.; Li, Z. Effect of Tank Size on Zebrafish Behavior and Physiology. *Animals* 2020, 10, 2353 (2020).

Marques, J. C., Lackner, S., Félix, R. & Orger, M. B. Structure of the zebrafish locomotor repertoire revealed with unsupervised behavioral clustering. *Curr. Biol. CB*, 28, 181-195.e5 (2018).

Marquart, G., Tabor, K., Bergeron, S. & Briggman, K. & Burgess, H. Prepontine non-giant neurons drive flexible escape behavior in zebrafish. *PLOS Biol.*, 17, e3000480 (2019).

Martorell, N. & Medan, V. Audiovisual integration in the Mauthner cell enhances escape probability and reduces response latency. *bioRxiv* (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.08.19.456957>.

Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., & Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature neuroscience*, 21(9), 1281–1289. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y>

Medan, V., Mäki-Marttunen, T., Sztarker, J. & Preuss, T. Differential processing in modality-specific Mauthner cell dendrites. *J. Physiol.*, (2017). <https://doi.org/10.1113/JP274861>.

Medan, V. & Preuss, T. Dopaminergic-induced changes in Mauthner cell excitability disrupt prepulse inhibition in the startle circuit of goldfish. *J. Neurophysiol.*, 106, 3195–3204 (2011).

Medan, V. & Preuss, T. The Mauthner-cell circuit of fish as a model system for startle plasticity. *J. Physiol.-Paris*, 108, 129–140 (2014).

Meshalkina, D. A. et al. Zebrafish models of autism spectrum disorder. *Exp. Neurol.*, 299, 207–216 (2018).

Nagasawa, M., Okabe, S., Mogi, K. & Kikusui, T. Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. *Front. Hum. Neurosci.* (2012).

Otero Coronel, S., Martorell, N., Beron de Astrada, M. & Medan, V. Stimulus contrast information modulates sensorimotor decision making in goldfish. *Front. Neural Circuits*, 14, 23 (2020).

Otero-Coronel, S.; Preuss, T.; Medan, V. Multisensory Integration Enhances Audiovisual Responses in the Mauthner Cell. *bioRxiv* 2024. doi: 2023.05.30.542841.

Orger, M. B. & de Polavieja, G. G. Zebrafish behavior: opportunities and challenges. *Annu. Rev. Neurosci.*, 40, 125–147 (2017).

Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*. 2009;(12):2975-3015. DOI:10.1002/dvdy.22113

Paula-Pérez I. Diagnóstico diferencial entre el espectro autista y el espectro esquizofrénico. *Rev Neurol* 2012; 54 (Supl 1): S51-62.

Rea, V. & Van Raay, T. J. Using zebrafish to model autism spectrum disorder: a comparison of ASD risk genes between zebrafish and their mammalian counterparts. *Front. Mol. Neurosci.*, 13, (2020).

Rohe, T., & Noppeney, U. (2015). Sensory reliability shapes perceptual inference via two mechanisms. *Journal of vision*, 15(5), 22. <https://doi.org/10.1167/15.5.22>

Rowland, B. A., Quessy, S., Stanford, T. R. & Stein, B. E. Multisensory integration shortens physiological response latencies. *J. Neurosci.*, 27(22), 5879–5884 (2007).

Saszik, S. M. & Smith, C. M. The impact of stress on social behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Pharmacol.*, 29, 53–59 (2018).

Scerbina, T., Chatterjee, D. & Gerlai, R. Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study. *Amino Acids*, 43, 2059–2072 (2012).

Senna, Irene et al. "Development of multisensory integration following prolonged early-onset visual deprivation." *Current biology : CB* vol. 31,21 (2021): 4879-4885.e6. doi:10.1016/j.cub.2021.08.060

Shams, S., Khan, A. & Gerlai, R. Early social deprivation does not affect cortisol response to acute and chronic stress in zebrafish. *Stress*, 0, 1–9 (2020).

Singleman C, Holtzman NG. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: A staging tool for teaching and research. *Zebrafish*. 2014;(4):396-406

- Smith, R. J. F. Alarm signals in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 2, 33–63 (1992).
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 83, 13–34 (2008).
- Stein, B., Stanford, T. & Rowland, B. Development of multisensory integration from the perspective of the individual neuron. *Nat. Rev. Neurosci.*, 15, 520–535 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrn3742>.
- Stein, B. & Stanford, T. Multisensory integration: current issues from the perspective of the single neuron. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9, 255–266 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrn2331>.
- Stevenson, R. A., & James, T. W. (2009). Audiovisual integration in human superior temporal sulcus: Inverse effectiveness and the neural processing of speech and object recognition. *NeuroImage*, 44(3), 1210–1223. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.09.034>
- Teicher, M. H. et al. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27, 33–44 (2003).
- Trant, J. M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.-C. & Place, A. R. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.*, 290, 475–483 (2001).
- Troconis, E. L., Ordoobadi, A. J., Sommers, T. F., Aziz-Bose, R., Carter, A. R., & Trapani, J. G. (2017). Intensity-dependent timing and precision of startle response latency in larval zebrafish. *The Journal of physiology*, 595(1), 265–282. <https://doi.org/10.1113/JP272466>
- Tunbak, H., Vazquez-Prada, M., Ryan, T. M., Kampff, A. R. & Dreosti, E. Whole-brain mapping of socially isolated zebrafish reveals that lonely fish are not loners. *eLife*, 9, (2020).
- Varga, Z. K. et al. Conserved Serotonergic Background of Experience-Dependent Behavioral Responsiveness in Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Neurosci.* 40, 4551–4564 (2020).
- R. L. & Andreu-Sánchez, C. Multimodal behavioral responses to salient stimuli in a zebrafish model for neurodevelopmental disorders. *IntechOpen* (2023). <https://doi.org/10.5772/intechopen.110273>.
16. Ward, A. J. W. & Hart, P. J. B. Foraging benefits of shoaling with familiars may be exploited by outsiders. *Anim. Behav.* 69, 329–335 (2005).
- Xiao, N. G. et al. On the facilitative effects of face motion on face recognition and its development. *Front. Psychol.* 5, 633 (2014).
- Yazaki-Sugiyama, Y. Neuronal mechanisms regulating the critical period of sensory experience-dependent song learning. *Neurosci. Res.* 140, 53–58 (2019).
- Zabegalov, Konstantin N et al. "Understanding zebrafish aggressive behavior". *Behavioural processes* vol. 158 (2019): 200-210. doi:10.1016/j.beproc.2018.11.010
- Zhang, M., Chen, Y., Lin, Y., Ding, H., & Zhang, Y. (2022). Multichannel Perception of Emotion in Speech, Voice, Facial Expression, and Gesture in Individuals With Autism: A Scoping Review. *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR*, 65(4), 1435–1449. https://doi.org/10.1044/2022_JSLHR-21-00438
- Zhao, Y., Selman, K., Woda, C. & Wallace, R. A. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*: II. The transition from previtellogenesis to vitellogenesis growth. *J Exp Zool*, 273, 26–39 (1995).