

Efecto de la exposición a estrés crónico en la expresión de genes asociados al comportamiento ansiogénico *sam2* y *nlg1* en pez cebra (*Danio rerio*)

Laura Catalina Avila Matallana

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Microbióloga

Directora:

Natasha Ivonne Bloch Morel, PhD

Codirectora:

Adriana Jimena Bernal Giraldo, PhD

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias Biológicas
Bogotá, Colombia
2021

Efecto de la exposición a estrés crónico en la expresión de genes asociados al comportamiento ansiogénico *sam2* y *nlg1* en pez cebra (*Danio rerio*)

Laura Catalina Avila Matallana

Resumen

La salud mental se ha considerado un componente integral y esencial, que se ha visto fuertemente afectado por una amplia variedad de cambios y estímulos en la vida cotidiana. Condiciones como estrés, se han relacionado como factores de riesgo a enfermedades y representan una complicación adicional en los procesos de tratamiento y recuperación. Se destaca la necesidad de ampliar conocimiento en relación con la conexión entre el estrés y su repercusión en los individuos, de manera que se evidencien los factores fisiológicos, moleculares y comportamentales. Este estudio, se centra en entender que cambios moleculares pueden estar asociados con los cambios en comportamiento y el proceso de regeneración derivados de la exposición de los individuos a condiciones de estrés crónico teniendo en cuenta el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal. Lo anterior, evaluando la existencia de diferencias en los niveles de expresión génica de dos genes *sam2* y *nlg1* que se han relacionado en estudios previos con comportamiento ansiogénico. Se observó, que hay una diferencia significativa entre los niveles de expresión para *sam2* entre los grupos experimentales, en donde, se identificaron mayores niveles de expresión en los individuos del grupo estrés en comparación con el grupo control. No se identificaron diferencias significativas en los niveles de expresión para *nlg1*. La exploración de los cambios moleculares que ocurren luego de la exposición de los individuos a estrés permite entender los mecanismos a través de los cuales se da la relación entre el estrés el comportamiento y la capacidad de regeneración en los individuos, en donde el eje hipotálamico-pituitario-interrenal (HPI) podría ser el principal protagonista.

Palabras clave: Estrés, comportamiento, ansiedad, RT-qPCR, expresión génica.

INTRODUCCIÓN

El estrés se define como una respuesta natural del cuerpo frente a un estresor que puede ser de naturaleza crónica o episódica (Fink, 2016). Este se ha identificado como un factor de riesgo a enfermedades como lo son la diabetes, obesidad, afecciones del sistema inmune y además llega a representar una complicación adicional en procesos de tratamiento y sanación (Gómez et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos de dichos fenómenos observados no se entienden del todo, por ende, su comprensión sigue siendo una necesidad.

El sistema encargado de la respuesta a estrés en humanos es el sistema hipotálamo-pituitario adrenal (HPA). Este sistema hace parte del sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. La hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (CRH) producida en el hipotálamo, es conocida como el principal regulador del eje pituitario adrenal y se encarga principalmente de estimular la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a nivel pituitario (Charmandari et al., 2005). La ACTH viaja a la corteza suprarrenal, en donde regula la secreción de glucocorticoides y andrógenos suprarrenales, además de participar en el control de la secreción de aldosterona (Charmandari et al., 2005). Cada una de estas hormonas liberadas tienen sus propios receptores (GR) en los respectivos tejidos diana, en donde llegan a regular positiva o negativamente la expresión de genes que tienen relación con funciones inmunológicas y del metabolismo (Charmandari et al., 2005; Collier et al., 2017).

El pez cebra, se ha postulado como un organismo modelo prometedor para enfermedades neuropsiquiátricas complejas. Esta especie tiene una elevada fecundidad, pequeño tamaño y es fácil de mantener; características que le otorgan una simplicidad práctica (Gerlai, 2011). Adicionalmente, posee estructuras y funciones conservadas evolutivamente junto con fenotipos conductuales bien definidos, siendo un animal social con jerarquías y comportamiento complejo. Adicionalmente, poseen el eje hipotalámico-pituitario-interrenal (HPI), el cual, se encarga de la respuesta al estrés y cuyos órganos primarios (hipotálamo, hipófisis y la corteza suprarrenal) cumplen con funciones y estructuras muy similares a los estudiados en el eje HPA descrito anteriormente (Charmandari et al., 2005; Clark et al., 2011). Dichas características son las que permiten acercarse más a la complejidad de nuestra propia especie (Blaser et al., 2010).

En un estudio anterior (Henriquez et al., 2021), se observaron diferencias en el proceso de regeneración y en el comportamiento de los individuos expuestos al protocolo de estrés con respecto a los controles. Los individuos que se encontraban bajo el protocolo de estrés mostraron comportamientos asociados con ansiedad y una diferencia en tamaño y uniformidad en el proceso de regeneración de la aleta caudal.

El proceso de regeneración es una compleja sincronización de diferentes interacciones de tejidos. Para que se de este proceso, se establecen 2 dominios que interactúan recíprocamente en el sitio de la lesión, el epitelio de la herida que se encarga de dar soporte y el blastema que consiste en una masa de células indiferenciadas de la que deriva el tejido (Pfefferli & Jazwinska, 2015). El estrés crónico puede estar generando un desbalance de la homeostasis, que es responsable de coordinar las interacciones, de manera que retrasa la rápida proliferación de células y la formación de blastema. Algunos estudios (Hachemi et al., 2018; Mathew et al., 2007) reportan efectos inhibitorios de los glucocorticoides en los procesos de regeneración, dada su acción sobre el cerebro y órganos metabólicos. Estos tienen grandes efectos en el sistema musculoesquelético, afectando procesos como la proliferación celular, la diferenciación, la autofagia y la apoptosis. Lo anterior, sugiere que puede haber una relación en el eje HPI y el proceso de regeneración que pueda explicar las diferencias observadas en el desarrollo de dicho proceso entre los individuos estrés y control.

Adicionalmente, se han derivado un conjunto de estudios en relación con genes que se han asociado con el comportamiento ansiogénico y que pueden llegar a tener una relación con el eje de respuesta a estrés. SAM-2 Es una quimiocina, secretada comúnmente como quimio atrayente para guiarla migración del sistema inmunológico. Tiene expresión en el sistema nervioso central y su papel en el cerebro se ha asociado con respuestas neuroinflamatorias (Rosténe et al., 2007). Choi et al (2018), le confirieron una posible función neuromoduladora, derivado de estudios en donde las líneas de peces y ratones knockout del gen presentaban una respuesta relacionada con ansiedad en pruebas de comportamiento y, además, se detectó un aumento de mRNA de *crh* en su hipotálamo.

Por otro lado, la neuroligina 1 (NGLN1) es una proteína de superficie que se ha asociado como modulador de la sinapsis, localizándose en las sinapsis glutaminérgicas excitatorias. Se ha asociado con trastornos como el trastorno de estrés postraumático (PTSD) y trastorno del espectro autista en humanos (Kilaru et al., 2016). Su variación se ha asociado con predisposición a niveles más altos de ansiedad o miedo en ratones y es de importancia en la memoria asociativa del miedo en ratas adultas (Bian et al., 2019; Kim et al., 2008).

Por lo anterior, en el presente estudio, se realizó el análisis de expresión de *sam2* y *nlg1* en pez cebra (*Danio rerio*) bajo efecto de la exposición a estrés crónico para esclarecer de esta manera su relación con el comportamiento angiogénico y la capacidad de regeneración de la aleta caudal. De esta manera, se evaluará si existen diferencias en los niveles de expresión entre los individuos sometidos a un protocolo de estrés crónico y los individuos control.

Materiales y métodos

Animales. Los individuos de este estudio fueron machos y hembras, adultos de tres años y siete meses de edad de la especie *Danio rerio*, AB Wild type del laboratorio de neurociencia y ritmos circadianos de la Universidad de los Andes. Fueron alojados con un ciclo de 14h/10h light/dark cycle, con una temperatura de 28,5 (± 1 °C), un rango de salinidad de 500-800 S/cm y un pH entre 7,0 y 8,0 en un multi-tank re circulating water system (Aquanearing, San Diego,

CA, USA). Estos individuos fueron alimentados 2 veces al día con una mezcla de artemia salina y Omega One flake food durante la fase de luz. Todos los protocolos y procedimientos experimentales realizados fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal (CICUAL) de la Universidad de los Andes mediante el FUA 19-025.

Estrés, pruebas de comportamiento y evaluación de regeneración. El proceso de la exposición al comportamiento de estrés, las pruebas de comportamiento y la evaluación del proceso de regeneración se basó en los procedimientos descritos por Henriquez y colaboradores (2021). Los individuos fueron aleatoriamente asignados a un grupo estrés y un grupo control, donde aquellos pertenecientes al grupo estrés fueron expuestos a un protocolo de estrés crónico (UCS). El ensayo tiene una duración total de 23 días. Se inició con una prueba comportamental (Open Field y scototaxis), seguido de una exposición de los individuos del grupo estrés al protocolo de estrés crónico impredecible (UCS) durante 8 días, con exposición a 2 estresores por día seleccionados de manera aleatoria, y una segunda prueba comportamental (Open Field y scototaxis) el día 9. Posteriormente el día 10 se realiza un corte en la parte baja de la aleta caudal para la evaluación del proceso de regeneración. Se realizan mediciones del crecimiento cada 3 días hasta completar un total de 4 medidas de crecimiento del corte. Durante la evaluación del proceso de regeneración se mantiene la exposición del grupo de estrés al protocolo UCS.

Procesamiento de muestras. Dados los resultados preliminares del ensayo en relación con el proceso de regeneración, se optó por evaluar la expresión de los genes diana en el día 12 del protocolo anteriormente mencionado, dado que entre la primera y la segunda medida posterior al corte de vio la mayor diferencia en el proceso de regeneración entre los individuos estrés y control. Se realizó la eutanasia de los individuos en una solución de hielo con metasulfonato de tricaina y se almacenaron en 2 mL de RNAlater a -20°C hasta su procesamiento. Se practicó la disección de los cerebros de cada uno de los individuos en una solución de PBS 1X y se volvió a almacenar en RNAlater a -20°C . La extracción de ARN del tejido cerebral se realizó con el uso del kit (Aurum™ Total RNA Mini Kit BIO-RAD), el resultado de dicha extracción fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento para la síntesis de cDNA. La síntesis de cDNA se realizó por medio de una transcripción reversa con el kit (iScript Select cDNA Synthesis Kit BIO-RAD) y fue almacenado a -30°C para la realización de una qPCR con el kit (iTaQ™ universal SYBR® Green supermix BIO-RAD) dando uso del (QIAGEN modelo ROTOR-GENE Q).

Diseño de primers. Los primers para la qPCR se diseñaron con las herramientas PrimerBlast y PrimerQuest, en conjunto con la herramienta OligoAnalyzer. Estos amplifican fragmentos cortos entre 70-200 pb, en un límite de exón-exón para evitar la amplificación de posible contaminación con DNA genómico y con T_m cercanas a 60°C teniendo en cuenta una diferencia de T_m entre el par de primers $\leq 2^{\circ}\text{C}$.

Tabla 1. Primers

Gen	Forward	Reverse
<i>nlg-1</i> *	GGCTTGGTGTGCTCGGTTTT	GGTCACCCCAAAGAAAGCA
<i>sam-2</i>	TCACATTGTTGAGGTGCGGA	CACCACTTCTGCTGGACGAT
<i>rpl13a</i>	ACAAAACCAAGAGGGGTCAGG	GACAACCATGCGCTTTCTCTTG
<i>eef1a111</i>	CCAACCTCAACGCTCAGGTCA	CAAACCTGCAGGCGATGTGA

*El primer de *nlg-1* fue tomado del estudio realizado por Krall y colaboradores (2019).

Cálculos fluorescencia. Se realizó la qRT-PCR para *sam2* y *nlg1* para la estimación de su expresión relativa teniendo en cuenta *eef1a111* y *rpl13a* como controles endógenos para cada una de las muestras. El proceso de análisis de los datos de fluorescencia obtenidos se realizó con DART-PCR. El programa ha demostrado ser eficiente y confiable para estimar la eficiencia de la amplificación para cada par de primers a partir de su perfil de amplificación, permitiendo por ende estimar la fluorescencia de cada reacción debidamente corregido por dicha eficiencia (Peirson et al., 2003). La expresión relativa (R_0) se calculó de la siguiente manera:

$$R_0 = R_{Ct} \times (1 + E)^{-Ct}$$

Donde R_{Ct} es el ciclo de umbral, R_{Ct} es la fluorescencia en este ciclo y E es la eficiencia de amplificación (Peirson et al., 2003). El proceso anterior se realizó teniendo en cuenta un total de 3 réplicas por cada gen housekeeping mencionado. Para la normalización se utilizó el promedio de la expresión relativa R_0 de los genes housekeeping:

$$R_{0 \text{ Normalizado}} = \frac{R_0 \text{ target gene}}{(R_0 \text{ eef1a111} + R_0 \text{ rpl13a})/2}$$

Para evaluar la diferencia entre control y tratamiento (grupo estrés) se realizó un estudio de fold change y un t-test ($p < 0,05$) en Rstudio permitiendo establecer la significancia de los resultados.

RESULTADOS

Comportamiento

De acuerdo al análisis realizado del comportamiento de los individuos presentado por Henríquez y colaboradores (2021), se observan cambios en términos de la exploración del tanque en las pruebas de open field y scototaxis. Se identificó que los peces que se encontraban bajo el protocolo de estrés tenían una tendencia a nadar más cerca de las paredes en comparación con los individuos del grupo control junto con variaciones del comportamiento de los peces en términos de velocidad y aceleración en las pruebas de open field. Adicional a dichos resultados, observamos que en los ensayos de scototaxis hay una diferencia, aunque no significativa (t-test p-value 0,075), en el número de transiciones de los individuos, en donde, los individuos del grupo estrés tienden a hacer mayor número de transiciones (Figura 1).

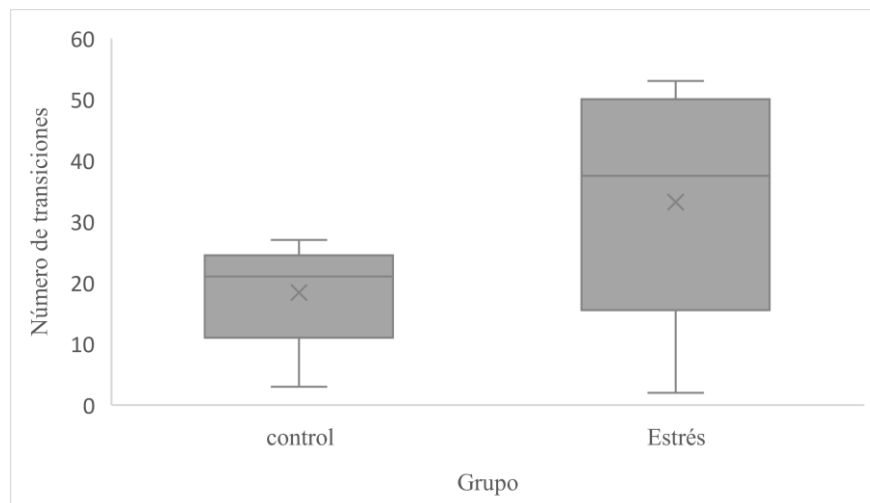


Figura 1. Gráfico total de transiciones durante la prueba de scototaxis para los grupos estrés y control.

Ensayos moleculares para estimar niveles de expresión de los genes *sam2* y *nlg1*

Los resultados de la expresión mostraron que existe una tendencia de un mayor nivel de expresión de los genes *sam2* y *nlg1* en los individuos sometidos al protocolo de estrés en comparación de los individuos pertenecientes al grupo control. La media de expresión expresada como porcentaje de fluorescencia de grupo control para el gen *sam2* normalizada a *eef1a111* y *rpl13a* fue de $1,6 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-5}$ s.d. mientras que para el grupo bajo el protocolo de estrés fue de $4,1 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-5}$ s.d..

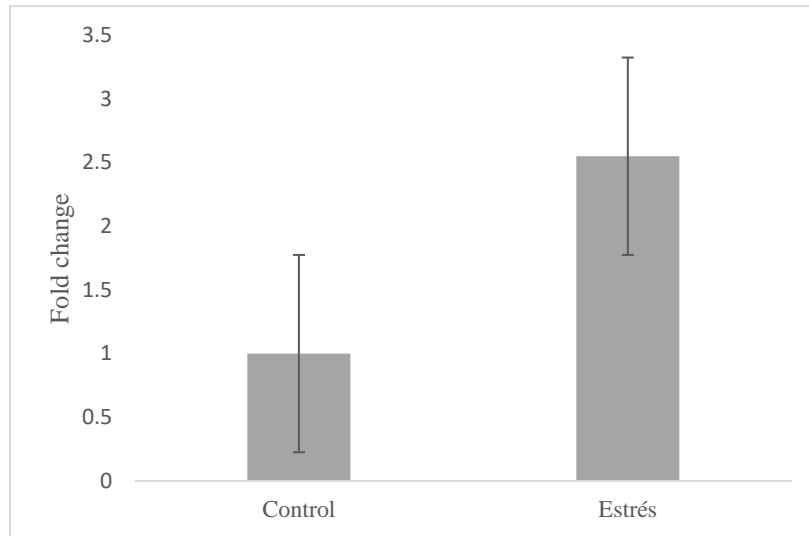


Figura 2. Gráfico fold change para los resultados de los niveles de expresión de *sam2* en individuos del grupo control y grupo estrés.

En la figura 2. vemos el análisis de fold change, el cual es una relación de las cantidades que describe las diferencias de los valores de expresión. Se obtuvo una media de $2,55 \pm 1,03$ s.d. indicando que el grupo estrés tiene niveles de expresión mayores de este gen. Las diferencias encontradas fueron significativas teniendo en cuenta los resultados del t-test ($t=2.42$, $p\text{-value}=0,045$).

Por otro lado, la media de expresión expresada como porcentaje de fluorescencia de grupo control para el gen *nlg1* normalizada a *efl1a111* y *rpl13a* fue de $0,07 \pm 2,8 \times 10^{-4}$ s.d. mientras que para el grupo bajo el protocolo de estrés fue de $0,1 \pm 1,0 \times 10^{-3}$ s.d.

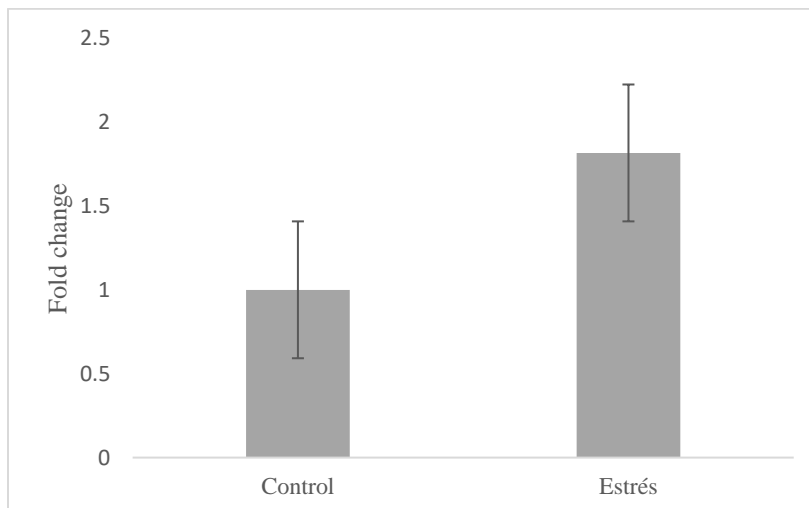


Figura 3. Gráfico fold change para los resultados de los niveles de expresión del gen *sam2* en individuos del grupo control y grupo estrés.

En la figura 3. vemos el análisis fold change, para este gen. Se obtuvo una media de $1,8 \pm 1,47$ s.d. indicando que el grupo estrés tiene niveles de expresión mayores de este gen. Las diferencias encontradas entre los grupos para este gen no fueron significativas teniendo en cuenta los resultados del t-test ($t=-1.22$, $p\text{-value}=0,26$).

DISCUSIÓN

El sistema de respuesta a estrés ha permitido a los individuos enfrentar múltiples desafíos fisiológicos y ambientales, con el fin de maximizar las posibilidades de supervivencia (Hachemi et al., 2018). Sin embargo, se ha dado a conocer que en un estado frecuente y prolongado puede desencadenar una amplia variedad de efectos secundarios, siendo perjudiciales para el organismo. Los individuos de estudio expuestos al protocolo de estrés mostraron diferencias en comportamiento, regeneración y en la expresión de genes que se han asociado a comportamiento ansiogénico.

En términos de regeneración, estudios posteriores en pez cebra han evidenciado que el estrés puede llegar a tener un efecto sobre este proceso. Sallin y Jazwinska (2016) se enfocaron en evaluar dicha condición teniendo como foco el tejido cardíaco, dada la asociación del estrés con enfermedades cardiovasculares. Se encontró que se vio afectada la capacidad natural de regeneración del corazón, lo que indica que esta habilidad es vulnerable a la respuesta a estrés del sistema paracrino. Similar a lo anterior, en el desarrollo posterior a este estudio, los resultados de regeneración mostraron que si se ve afectado el proceso de regeneración de la aleta caudal en los individuos que están bajo el protocolo de estrés. Lo anterior, indicando que dicha exposición genera cambios a nivel fisiológico que terminan afectando ciertas funciones de importancia en los individuos en procesos de recuperación.

Las diferencias de comportamiento observadas se relacionan con comportamientos observados en los individuos asociados a ansiedad. Uno de estos es la tigmotaxis. La tigmotaxis es aquel comportamiento en el cual los individuos evitan el centro de la arena y permanecen muy cerca de los límites de un nuevo entorno (Champagne et al., 2010). En el caso de los peces, estos se mantenían más en la proximidad de las paredes en comparación con los individuos control, siendo este un indicador de ansiedad (Shams et al., 2015).

Los cambios de comportamiento observados en los individuos en términos de velocidad y aceleración durante la prueba de open field, pueden estar relacionadas con los eventos de congelamiento o inmovilización de los peces, en donde, dicha variable se ha asociado al estrés y memoria del miedo (Baker & Wong., 2019).

Además, las diferencias en las relaciones de tiempo y transiciones en las pruebas de scototaxis, se atribuyen a la preferencia del animal por áreas protegidas que en este caso sería

oscuridad, en donde, un aumento de la actividad del compartimiento oscuro refleja un comportamiento que promueve la ansiedad (Maximino et al., 2010).

El gen *sam2* genera una condición interesante para este estudio, teniendo en cuenta la conexión conferida con el sistema de respuesta a estrés, el cual, podría responder a las diferencias en el proceso de regeneración observados derivados posiblemente de los efectos inhibitorios de los glucocorticoides liberados (Hachemi et al., 2008) y su relación con el comportamiento ansiogénico. Choi y colaboradores (2018), encontraron que las líneas knockout (KO) de ratón y pez cebra presentaban mayores eventos de congelamiento y movimientos erráticos, junto con mayor tigmotaxis que los individuos wild type, en conjunto con niveles mayores de mRNA *crh*.

En este estudio observamos que en condiciones de estrés se detectó en los individuos un aumento en la expresión del gen *sam2* que puede estar relacionada con la función como neuromodulador que se le ha conferido. Un aumento de la expresión de dicho gen en los individuos bajo el protocolo de estrés crónico puede derivar en un aumento de la supresión tónica GABAérgica de la excitabilidad de las neuronas *crh* generando una posible disminución de la síntesis de CRH. Lo anterior, como un intento de recuperar el equilibrio perdido por la exposición al protocolo de estrés crónico, dado que en dicha condición hay una disminución de la regulación inhibitoria de las neuronas *crh*.

Un comportamiento similar se observó para el gen *nlg1*, en donde, a pesar de no ser significativo, dicho aumento podría explicarse teniendo en cuenta su importancia como modulador de la percepción de estímulos del medio en los individuos, dada su función en la especificación de las sinapsis excitadoras (Kim et al., 2008). Sin embargo, su papel en el proceso de respuesta a estrés no se encuentra muy claro aún. Para dilucidar de mejor manera dicho papel se propone identificar de manera más puntual las zonas en el cerebro en donde se pueda estar dando esa diferencia de expresión entre los individuos control respecto a los individuos del protocolo de estrés y así entender de manera más amplia su comportamiento. La no significancia de la diferencia de los niveles de expresión podría haberse visto afectada por el tamaño muestral que se tuvo en cuenta para el desarrollo del estudio. Sería ideal aumentar dicho tamaño muestral, para evaluar de mejor manera la significancia de estas diferencias.

Ambos genes estudiados tienen identificado su respectivo homólogo en humanos. Estos genes se han asociado con la discapacidad intelectual y el trastorno del espectro autista en el caso del gen *sam2* (Choi et al., 2018) y la NLGN-1 adicional a lo anterior, se ha asociado con PTSD.

Teniendo en cuenta lo anterior, se sugiere que el gen *sam2* puede tener un papel como neuromodulador en relación con la respuesta a estrés y su relación con la ansiedad que adicionalmente se encuentra evolutivamente conservado. Adicionalmente, se comprende la importancia de estudiar, a mayor profundidad, la expresión de *nlg1* y su relación con los comportamientos asociados con ansiedad de manera que se pueda dilucidar si tiene alguna relación con el sistema de respuesta a estrés.

Sería de interés estudiar cómo el tiempo de exposición a estrés puede llegar a afectar la expresión de dichos genes para evaluar de mejor manera el efecto de la exposición al protocolo de estrés en los individuos, para entender y esclarecer más las relaciones encontradas y descritas anteriormente.

Por último, cabe resaltar la importancia en establecer los mecanismos moleculares que expliquen los fenómenos observados entorno a la relación entre el estrés, los procesos de regeneración y los comportamientos asociados a ansiedad. De esta manera, se puede evaluar el potencial terapéutico de los diferentes actores en el proceso que puede llegar a tener un gran impacto a nivel de salud en humanos.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo a lo largo del proceso, junto con su confianza, sus conocimientos y sabiduría. Mi directora de tesis Natasha Bloch, mi codirectora Adriana Bernal, mi asesora Verónica Akle. A Angie Henríquez por iniciar todo este proceso de investigación y a Claudia Camila Barrera por siempre estar ahí para asesorarme junto a los demás miembros de los laboratorios en los cuales realicé las diferentes partes de mi trabajo de investigación, el laboratorio de neurociencias y ritmos circadianos, el laboratorio de ingeniería biomédica - neurogenética y genómica y el laboratorio de interacciones moleculares de microorganismos en agricultura.

REFERENCIAS

Baker, M. R., & Wong, R. Y. (2019). Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

Bian, Y., Xu, Y., Zhou, G., Yang, L., Zhao, M., Zeng, L., Li, W., & Li, Z. (2019). Identification of key genes and pathways in post-traumatic stress disorder using microarray analysis. *Frontiers in Psychology*.

Collier, A. D., Kalueff, A. V., & Echevarria, D. J. (2017). Zebrafish models of anxiety-like behaviors. In *The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish* (pp. 45-72). Springer, Cham.

Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C., De Kloet, R. E., & Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behavioural brain research*, 214(2), 332-342.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005 Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 259 – 284.

- Choi J, Jeong Y, Kim S, Ariyasiri K, Kim H, Jung S, Hwang K, Choi T, Park C, Huh W, Carl M, Rosenfeld J, Raskin S, Ma A, Gecz J, Kim H, Kim J, Shin H, ... Kim C. (2018). Targeted knockout of a chemokine-like gene increases anxiety and fear responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(5), E1041–E1050
- Clark, K. J., Boczek, N. J., & Ekker, S. C. (2011). Stressing zebrafish for behavioral genetics.
- Fink, G. (2016). Stress, definitions, mechanisms, and effects outlined: Lessons from anxiety. In *Stress: Concepts, cognition, emotion, and behavior* (pp. 3-11). Academic Press.
- Gerlai, R. (2011). Using zebrafish to unravel the genetics of complex brain disorders. In *Behavioral neurogenetics* (pp. 3-24). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gómez-Carretero, P., Monsalve, V., Soriano, J. F., & De Andrés, J. (2007). Alteraciones emocionales y necesidades psicológicas de pacientes en una Unidad de Cuidados Intensivos. *Medicina Intensiva*, *31*(6), 318-325.
- Hachemi, Y., Rapp, A. E., Picke, A., Weidinger, G., Ignatius, A., & Tuckermann, J. (2018). Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture, *Journal of Molecular Endocrinology*, *61*(1), R75-R90.
- Härtwig, E. A., Aust, S., & Heuser, I. (2013). HPA system activity in alexithymia: a cortisol awakening response study. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(10), 2121-2126.
- Henríquez Martínez, A., & Bloch Morel, N. I. (2021). *Effects of chronic stress exposure on the anxiogenic behavior and regenerative capacity of zebrafish (Danio rerio)*. Uniandes.
- Kilaru, V., Iyer, S. V., Almlı, L. M., Stevens, J. S., Lori, A., Jovanovic, T., et al. (2016). Genome-wide gene-based analysis suggests an association between Neuroligin 1 (NLGN1) and post-traumatic stress disorder. *Transl. Psychiatry* *6*:e820. doi: 10.1038/tp.2016.69
- Kim, J., Jung, S. Y., Lee, Y. K., Park, S., Choi, J. S., Lee, C. J., ... & Kim, J. H. (2008). Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(26), 9087-9092.
- Krall, M., Htun, S., & Slavotinek, A. (2019). Use of PTC124 for nonsense suppression therapy targeting BMP4 nonsense variants in vitro and the *bmp4*^{st72} allele in zebrafish. *PLoS one*, *14*(4), e0212121.
- Mathew, L. K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E. A., Löhr, C. V., Loynes, C. A., ... & Tanguay, R. L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 35202-35210.
- Maximino, C., De Brito, T. M., de Mattos Dias, C. A. G., Gouveia, A., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature protocols*, *5*(2), 209-216.

Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia Jr, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural brain research*, 214(2), 157-171.

Peirson, S. N., Butler, J. N., & Foster, R. G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic acids research*, 31(14), e73-e73.

Rostène, W., Kitabgi, P., & Mélik Parsadaniantz, S. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), 895–903. Mathew, L. K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E. A., Löhr, C. V., Loynes, C. A., ... & Tanguay, R. L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 35202-35210.

Sallin P, Jazwinska A. 2016 Acute stress is detrimental to heart regeneration in zebrafish. *Open Biol.* 6: 160012. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160012>

Shams, S., Chatterjee, D., & Gerlai, R. (2015). Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. *Behavioural brain research*, 292, 283-287.