



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

APRENDIZAJE ESPACIAL Y NEUROGÉNESIS

ADULTA EN PEZ CEBRA

(Danio rerio)

Laura Mazzitelli Fuentes

Licenciada en Ciencias Biológicas

Tesis presentada para optar al título de

Doctora en Biología

Director: Lucas A. Mongiat

San Carlos de Bariloche

Abril 2022

A mi papá, Diego, por inspirarme la curiosidad y enseñarme a hacer ciencia.

Por sus consejos, su paciencia y por ser mi ejemplo a seguir.

APRENDIZAJE ESPACIAL Y NEUROGÉNESIS ADULTA EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

Los peces teleósteos crecen a lo largo de toda su vida, y por lo tanto, sus órganos y tejidos deben adaptarse al incremento en el tamaño corporal. La neurogénesis adulta, es decir, la generación de nuevas neuronas en individuos adultos, aparte de contribuir a este crecimiento, puede ser considerada un mecanismo que provee una forma de plasticidad necesaria para la adaptación del cerebro a desafíos ambientales. El *pallium*, o telencéfalo dorsal, del pez cebra (*Danio rerio*) es una estructura encefálica involucrada en el procesamiento de diversas funciones cognitivas que presenta numerosos nichos neurogénicos a lo largo de la región periventricular. La adición de nuevas neuronas como un mecanismo plástico asociado al aprendizaje aún no ha sido explorado en este modelo. Bajo la hipótesis de que la actividad circuital modula positivamente la neurogénesis adulta, se entrenaron peces cebra adultos en un paradigma comportamental de aprendizaje espacial y se evaluó la dinámica de los progenitores neuronales (NPs) en diferentes nichos del *pallium*. Para tal fin, se utilizó la Tarea de Constancia Espacial, que consiste de un laberinto rombooidal guiado por claves espaciales, e implica la conjugación del procesamiento de las claves dentro del laberinto con la información direccional interna del individuo. Se encontró que los peces cebra adultos son capaces de aprender en este paradigma luego de 5 sesiones consecutivas de entrenamiento. Esta actividad cognitiva aumenta la proliferación de NPs exclusivamente en dos regiones del *pallium*: el *pallium* lateral caudal (cLP) y el *pallium* medial rostral (rMP). Para determinar si el aprendizaje impacta sobre la neurogénesis en el *pallium*, se marcaron NPs en división mediante la administración de BrdU, y luego los peces fueron entrenados en distintos períodos de maduración de las nuevas neuronas adultas. Los resultados indican que las nuevas neuronas son producidas como consecuencia del aprendizaje en rMP y cLP, pero ambas subregiones difieren en el grado de extensión y en el período crítico de susceptibilidad a la actividad cognitiva. Se propone que el aprendizaje incrementa la neurogénesis adulta mediante dos mecanismos: impulsando la proliferación encadenada de NPs (es decir, mediante sucesivas divisiones de los pro-

genitores marcados con BrdU) y rescatando a las nuevas neuronas de la muerte celular. Finalmente, se evaluó si estas regiones del *pallium* están comunicadas, y se encontró que cLP y rMP se encuentran sinápticamente conectadas mediante una vía glutamatérgica. Estos hallazgos resaltan el rol de la neurogénesis adulta como una fuente de plasticidad cerebral conservada evolutivamente, y demuestran una especialización rostro-caudal del *pallium* en peces cebra adultos.

PALABRAS CLAVE: aprendizaje espacial, plasticidad, progenitor neuronal, *Danio rerio*, telencéfalo

SPATIAL LEARNING AND ADULT NEUROGENESIS IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Teleost fish grow throughout their lives, therefore their organs must adapt to their increasing body size. Adult neurogenesis, or the generation of new-born neurons in adult individuals, could provide a form of plasticity necessary to adapt the brain to environmental challenges. The zebrafish pallium, or dorsal telencephalon, is a brain structure involved in the processing of various cognitive functions and exhibits extended neural progenitor (NP) niches throughout the periventricular zone. The involvement of neuronal addition as a learning-related plastic mechanism has not been explored in this model, yet. Based on the assumption that neuronal activity positively modulates adult neurogenesis, adult zebrafish were trained in a spatial behavioral paradigm and NP dynamics were evaluated in different pallial niches. To that end, a Spatial Constancy Task was tested on zebrafish. This task consists of a cue-guided rhomboid maze, in which fish must learn to exit the maze by relating external cues with their internal-directional information. Adult zebrafish were able to learn this task, after five daily sessions, and this cognitive activity increased NP proliferation exclusively in two pallial regions: the caudal lateral pallium (cLP) and the rostral medial pallium (rMP). To assess whether learning impinges on pallial adult neurogenesis, mitotic-NP were labeled by BrdU administration, and then fish were trained at different periods of adult-born neuron maturation. The results indicate that adult-born neurons are being produced in rMP and cLP during the learning process, but with distinct critical periods among these regions. It is proposed that learning increases adult neurogenesis by two mechanisms: driving a chained proliferation of labeled NP and rescuing newborn neurons from death. Finally, synaptic connectivity among these pallial regions was assessed, demonstrating a glutamatergic connection between cLP and rMP. These findings highlight adult neurogenesis as a conserved source of brain plasticity and shed light on a rostro-caudal specialization of pallial NP niches in adult zebrafish.

KEYWORDS: spatial learning, plasticity, neural progenitor, *Danio rerio*, telencephalon

Índice general

1. Introducción General	7
1. Neurogénesis Adulta: Breve Reseña Histórica	7
2. Neurogénesis Adulta en Teleósteos	10
3. Modulación de la Neurogénesis Adulta	11
4. Telencéfalo de Teleósteos	15
2. Capítulo I. Aprendizaje en Pez	
Cebra: Búsqueda de un Paradigma	
Comportamental	17
1. Introducción	17
1.1. Aprendizaje y Memoria	17
1.2. Aprendizaje desde perspectiva <i>Estructura-Función</i>	18
1.3. El Pez Cebra como Modelo de Estudio	20
2. Resultados	21
2.1. Reconocimiento de Objetos (OR)	21
2.2. Aprendizaje en una Tarea de Constancia Espacial (SCT)	32
3. Discusión y Conclusiones	35
3. Capítulo II. Aprendizaje Espacial y Neurogénesis Adulta en Pez	
Cebra	40
1. Introducción	40
1.1. Progenitores Neuronales en Telencéfalo de Teleósteos	40
1.2. Homologías en Pallium Telencefálico de Teleósteos y Mamíferos	43
2. Resultados	46

2.1.	Proliferación Celular inducida por SCT	46
2.2.	Neurogénesis Adulta inducida por SCT	47
2.3.	Período Crítico de la Neurogénesis Adulta inducida por SCT	53
3.	Discusión y Conclusiones	59
4.	Capítulo III. Conectividad Circuitual de cLP-rMP	72
1.	Introducción	72
2.	Resultados	75
2.1.	Activación Neuronal en Pallium Telencefálico post-SCT	75
2.2.	Análisis de Conectividad de cLP - rMP	76
3.	Discusión y Conclusiones	79
5.	Conclusiones	83
6.	Materiales y Métodos	84
1.	Animales	84
2.	Paradigmas Comportamentales	86
2.1.	Reconocimiento de Objetos Novedosos	86
2.2.	Tarea de Constancia Espacial	87
3.	Marcación con BrdU	89
4.	Histología	89
4.1.	Preparación del Tejido	89
4.2.	Inmunofluorescencia	90
5.	Análisis de Imágenes	91
6.	Imágenes del Calcio	92
7.	Análisis Estadístico	93
7.	Apéndice	94
8.	Abreviaturas	107
9.	Referencias	108

Introducción General

1. Neurogénesis Adulta: Breve Reseña Histórica

El sistema nervioso central de los vertebrados posee células madre neurales (o NSCs, por sus siglas en inglés, Neural Stem Cells) capaces de generar nuevas neuronas a lo largo de la vida del animal, proceso conocido como *neurogénesis adulta*. El descubrimiento de la neurogénesis en un cerebro adulto significó la ruptura de un dogma instalado desde principios del siglo XIX. Aquel dogma establecía que sólo se producían neuronas durante el desarrollo, y estaba basado en la teoría neuronal de Santiago Ramón y Cajal (1913) sustentada por la complejidad de las conexiones del sistema nervioso e incompatibilidad con la integración de nuevas neuronas. Luego del advenimiento de la técnica de marcado *in vivo* de la síntesis del ADN con timidina tritiada (Sidman y col., 1959), esta idea comenzó a ser revisada.

Los primeros estudios que presentaron evidencias en favor de la generación de nuevas neuronas en cerebros de individuos adultos se realizaron en roedores de laboratorio, a partir de la marcación de células en división (Altman y Das, 1965). Éste y otros trabajos, permitieron identificar zonas de proliferación celular en distintas regiones cerebrales, como son el giro dentado del hipocampo, el neocórtex y el bulbo olfatorio. Sin embargo, debido a limitaciones técnicas, la demostración de que esas células proliferantes pudieran adoptar fenotipo neuronal era débil. Posteriormente, otros trabajos realizados en canarios, demostraron de manera muy elegante y robusta la integración de nuevas neuronas en determinadas áreas del cerebro, cuya función está estrechamente relacionada con el aprendizaje del canto (Goldman

y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984). Por lo tanto, estas investigaciones no sólo evidenciaron la generación de nuevas neuronas y su integración, sino que también demostraron que estas nuevas neuronas presentan funcionalidad en los circuitos cerebrales de canarios adultos. Sin embargo, los estudios de Pasko Rakic (Rakic, 1985) negaron la existencia de neurogénesis adulta en primates, fortaleciendo el antiguo dogma, y la neurogénesis adulta fue considerada una especialización evolutiva presente en aves.

En los años '90, el debate en contra del dogma volvió a abrirse, ya que se observó diferenciación neuronal en cultivo de NSCs obtenidas de tejido cerebral de mamífero adulto (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Reynolds y Weiss, 1992; Richards y col., 1992). Por otro lado, se comenzaron a desarrollar técnicas que permitieron avances cruciales en el estudio de la neurogénesis adulta. La primera de ellas fue la introducción de marcadores específicos de distintos fenotipos neuronales, que se pudieron identificar a través de detección inmunohistoquímica (Cameron y col., 1993; Seki y Arai, 1993). Esto se complementó con el desarrollo de un análogo sintético de timidina: la bromodeoxiuridina (BrdU), la cual se incorpora al ADN y permite la marcación y seguimiento de células en división (Miller y Nowakowski, 1988). La posibilidad de co-localización de BrdU con marcadores neuronales, mediante el uso de microscopios confocales y de epifluorescencia, fue la herramienta necesaria para poder confirmar la presencia de nuevas neuronas. Finalmente, el grupo de Fred Gage corroboró y cuantificó el fenómeno en el cerebro adulto de roedores y humanos (Eriksson y col., 1998; Kempermann y col., 1997; Kuhn y col., 1996), sentando las bases para la aceptación general de la existencia e importancia de la neurogénesis adulta.

Hoy en día, sabemos que la formación de nuevas neuronas requiere de la presencia de progenitores neuronales (células madre capaces de generar neuronas) y de nichos neurogénicos. Estos últimos son zonas que generan determinados factores tróficos que permiten el desarrollo de los progenitores. El desarrollo e integración de nuevas neuronas en un cerebro maduro sigue el patrón ontogenético: se inicia con la proliferación de NSCs, luego se produce la diferenciación y posteriormente la maduración, la cual a su vez incluye la migración y establecimiento de conexiones

con circuitos preexistentes (Kempermann, 2012). Un avance que permitió estudiar con más detalle las características de las nuevas neuronas fue la marcación genética mediante retrovirus modificados portando el gen de la proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein). Esto permite identificar la progenie de las NSCs en forma indeleble, y posibilita el análisis de la morfología celular y la realización de registros electrofisiológicos en neuronas GFP positivas para determinar propiedades eléctricas de las nuevas neuronas (Espósito y col., 2005; Ge y col., 2006; van Praag y col., 2002; Zhao y col., 2006). Otro gran adelanto fue la creación de modelos transgénicos que permiten marcar diferentes tipos neuronales, progenitores en división y neuronas inmaduras (Overstreet y col., 2004).

La gran mayoría de los estudios actuales realizados en neurogénesis adulta utilizan como modelo mamíferos murinos. Éstos poseen dos nichos neurogénicos ubicados en el telencéfalo: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Lledo y col., 2006), con excepción de los primates, en los cuales sólo existe un nicho neurogénico: el giro dentado del hipocampo. Las células progenitoras neurales resultan una importante fuente de plasticidad cerebral (Mongiat y col., 2015) y constituyen una potencial fuente de neuronas capaces de reparar tejido cerebral en respuesta a daños como isquemia, trauma o incluso procesos neurodegenerativos (Bellenchi y col., 2013). Más aún, estudios previos han demostrado que progenitores neurales de la SVZ contribuyen al remodelado circuital del cerebro luego de sufrir una injuria experimental. En modelos de epilepsia en ratas, se ha visto que las convulsiones cerebrales repetidas provocan un incremento en la neurogénesis adulta tanto en SGZ como en SVZ (revisado por Parent y Lowenstein, 2002). Por otra parte, también se observó que la neurogénesis adulta también puede ser inducida mediante infarto cerebral, particularmente en el cuerpo estriado, y estas nuevas células son capaces de migrar hasta regiones dañadas donde comienzan a adoptar fenotipo neuronal (Arvidsson y col., 2002). Sin embargo, la eficiencia regenerativa en dichas condiciones patológicas es extremadamente baja.

En contraste, en vertebrados no mamíferos, la neurogénesis adulta ocurre en múltiples regiones cerebrales (Bonfanti y col., 2011; Chapouton y col., 2007; Kas-

lin y col., 2008). Los peces teleósteos se distinguen por su alta tasa neurogénica a lo largo de todo su sistema nervioso central. Su cerebro produce nuevas neuronas de manera continua, en grandes cantidades y en más de una decena de zonas proliferativas. Es interesante notar que estos vertebrados son capaces de regenerar e incorporar nuevas neuronas en respuesta a una noxa o injuria, convirtiendo a estos animales en modelos experimentales ideales para estudiar fenómenos de reparación en tejidos neurales (Clint y Zupanc, 2001; G. K. H. Zupanc, 2001).

Entender los mecanismos que favorecen los procesos neurogénicos en el cerebro adulto de peces, resulta entonces de gran relevancia para diseñar aproximaciones terapéuticas ante el daño y las enfermedades neuronales.

2. Neurogénesis Adulta en Teleósteos

La neurogénesis adulta es un fenómeno altamente conservado evolutivamente: se encuentra presente en todos los grupos de vertebrados, aunque, a lo largo de la filogenia, se observa una enorme variabilidad respecto de la cantidad de nichos neurogénicos y del grado de capacidad neurogénica. Como se mencionó, los peces teleósteos exhiben, por un lado, una gran cantidad de nichos neurogénicos y por otro, la capacidad de regenerar tejido neuronal dañado. De hecho, son el grupo que presenta la mayor y más distribuida capacidad neurogénica de todos los vertebrados analizados hasta el momento.

En peces teleósteos, el número de neuronas en el sistema nervioso central incrementa con la edad del pez, y en consecuencia, estos organismos sufren un aumento del tamaño cerebral a lo largo de toda su vida (Clint y Zupanc, 2001; Ekström y col., 2001). En línea con esta afirmación, estudios realizados en Gymnotiformes y Cypriniformes, en particular, en el ciprínido pez cebra (*Danio rerio*), muestran que tanto el número de nichos neurogénicos como el número relativo de nuevas neuronas generadas son, al menos, un orden de magnitud mayor en comparación con mamíferos (G. K. Zupanc, 2008). Esta excepcional capacidad de producir nuevas neuronas se debe a la existencia de un entorno altamente permisivo para la proliferación y diferenciación de progenitores neurales (G. K. H. Zupanc y Sîrbulescu, 2011; G. K.

Zupanc, 2008).

Respecto de las zonas de proliferación, se ha demostrado que el cerebelo es la región con mayor incorporación de neuronas en el SNC de teleosteos (aproximadamente el 60 % de todas las células generadas por el pez cebra). Los nichos restantes, incluyen el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Figura 1.1 A). Las células progenitoras dan origen tanto a células gliales como a neuronas, las cuales son capaces de migrar hacia distintas regiones, e integrarse eficientemente en circuitos preexistentes. Aproximadamente, la mitad de las nuevas neuronas se integran de manera funcional en los circuitos del cerebro adulto y sobreviven por el resto de la vida del pez, mientras que el resto no logran conectarse sinápticamente, y en consecuencia, son eliminadas por apoptosis (G. K. H. Zupanc y Sîrbulescu, 2011). Esta capacidad de generación de nuevas células y de eliminación de las neuronas no conectadas por apoptosis, es lo que les confiere la habilidad de regenerar rápidamente tejido neuronal luego de una lesión. Por lo tanto, el estudio de las bases moleculares del proceso de regeneración podría convertirse en una importante herramienta para la regeneración de neuronas perdidas, con potencial de aplicación en terapias para enfermedades neuronales en humanos (Lie y col., 2004).

En mamíferos se ha visto que la neurogénesis adulta no es un fenómeno estático, sino que, como veremos en la siguiente sección, existen distintos factores intrínsecos y extrínsecos que pueden modularla en sus diferentes etapas: la proliferación, determinación de fenotipo, migración, maduración, integración y supervivencia.

3. Modulación de la Neurogénesis Adulta

Diversos estudios en aves y roedores han investigado el rol de distintos factores y condiciones ambientales que son capaces de modular la incorporación de nuevas neuronas en regiones asociadas al procesamiento sensorial. Estos cambios ocurren en distintos estadios de su desarrollo. Por ejemplo, se ha visto que experiencias aversivas o estresantes, como puede ser la exposición a olores de predadores, el aislamiento, privación del sueño, etc., tienden a disminuir la producción de nuevas neuronas. Existen al menos tres mecanismos reportados sobre el impacto del estrés

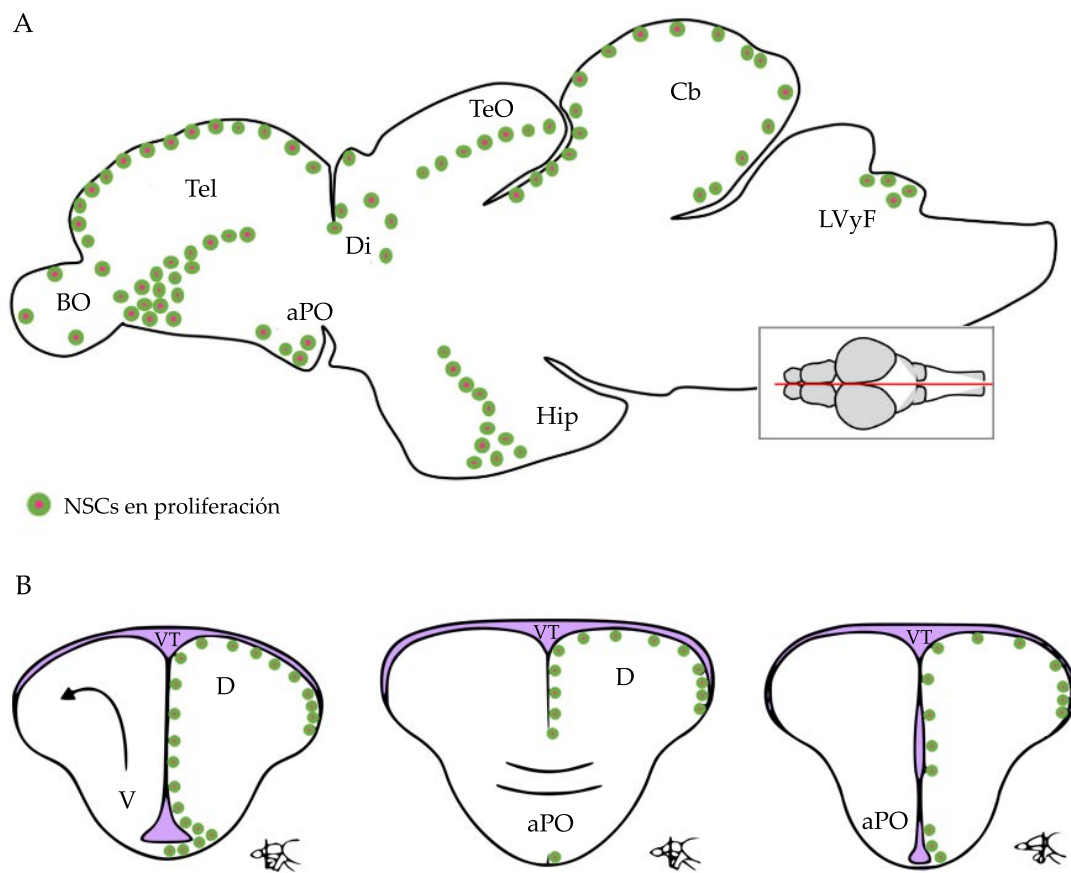


Figura 1.1: Nichos Neurogénicos en Telencéfalo de Teleósteos. A. Representación esquemática de sección sagital del encéfalo de teleosteo (A) y tres cortes coronales del telencéfalo a lo largo del eje rostro-caudal (B) ilustrando la localización de las células en proliferación. BO: bulbo olfatorio; Tel: telencéfalo; aPO: área preóptica; Di: diencéfalo; TeO: tectum óptico; Hip: hipotálamo; Cb: cerebelo; LVyF: lóbulo vagal y facial; D: región dorsal del telencéfalo; V: región ventral del telencéfalo; VT: ventrículo telencefálico. Modificado de Grandel y col., 2006; Labusch y col., 2020

en la neurogénesis: la supresión de la proliferación de NSCs, un retardo en la diferenciación a fenotipo neuronal y un aumento de muerte de las nuevas neuronas generadas antes de la experiencia estresante (Opendak y Gould, 2015; Schoenfeld y Gould, 2012). En contraposición, experiencias positivas, como pueden ser la actividad física, la exposición a ambientes enriquecidos o la administración de fármacos como la cocaína, incrementan el número de neuronas nuevas (revisado por Opendak y Gould, 2015).

En particular, existe evidencia de una correlación positiva entre el número de nuevas neuronas y la *performance* durante distintas tareas de aprendizaje. En canarios se obtuvo la primera evidencia de que la incorporación de nuevas neuronas en

núcleos asociados al canto estaba relacionada al momento de aprendizaje del mismo (Alvarez-buylla y col., 1990; Goldman y Nottebohm, 1983). Los machos adultos exhiben un canto que se mantiene estable hasta la llegada del otoño, período en el cual el canto es modificado. En concordancia, se observó que los individuos exhiben 4.9 veces más cantidad de nuevas neuronas en el principal núcleo telencefálico de control del canto en otoño, en comparación con individuos analizados en durante la primavera.

En roedores, también se ha observado que esta vinculación entre *performance* y neurogénesis es bidireccional: por ejemplo, la actividad física voluntaria aumenta la neurogénesis adulta en la SGZ, lo cual genera una mejora en el rendimiento durante la tarea espacial laberinto de agua de Morris, e incrementa la potenciación a largo plazo en el giro dentado (Farmer y col., 2004; van Praag y col., 1999). En la misma línea, condiciones como estrés, aumento de corticosteroides en sangre y envejecimiento son factores que impactan de manera negativa en la neurogénesis adulta del giro dentado del hipocampo, y generan, en consecuencia, un impedimento o deterioro en la capacidad cognitiva de los individuos (Bizon y Gallagher, 2003; Drapeau y col., 2003; Gould y col., 1999; Kuhn y col., 1996). Otros estudios en los que la neurogénesis hipocampal se ve disminuida por manipulación farmacológica, radiación o ablación resulta en un deterioro de la respuesta comportamental y una reducción de la plasticidad sináptica en dicha región (Madsen y col., 2003; Saxe y col., 2006; Shors y col., 2001; Snyder y col., 2005). Este fenómeno no se restringe al hipocampo, sino que también se ha visto que la constante incorporación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio de roedores provoca una mejora en el aprendizaje de discriminación de olores, y la evocación de memorias olfatorias asociadas a una recompensa (Lepousez y col., 2015; Rochefort y col., 2002; Sakamoto y col., 2014). En síntesis, una extensa bibliografía muestra una relación bidireccional entre la neurogénesis adulta y los cambios asociados a la experiencia y el aprendizaje. Todos estos estudios apuntan a una regulación de la neurogénesis adulta dependiente de la experiencia, en la cual las nuevas neuronas sirven de sustrato mediante el cual se moldean los circuitos que producen los comportamientos para adaptarse a un ambiente cambiante.

En teleósteos existen algunas investigaciones que muestran cómo la estimulación sensorial incrementa la incorporación de nuevas neuronas en regiones encefálicas asociadas al procesamiento de actividad sensorial. Por ejemplo, en los nichos neurogénicos de las regiones del bulbo olfatorio y lóbulo vagal, asociado a estímulos gustativos, y la zona periventricular caudal del tectum óptico, asociada al procesamiento visual, del pez cebra. Cuando se le presentan los respectivos estímulos sensoriales procesados por dichas áreas, se observa un incremento en la generación de nuevas neuronas, tanto por aumento de la proliferación de NSCs (tectum óptico) como en un aumento de la sobrevida (bulbo olfatorio, lóbulo vagal) de nuevas neuronas (Figura 1.2) (Labusch y col., 2020). Esta evidencia sugiere que la estimulación sensorial sostenida incrementa la neurogénesis adulta específicamente en los nichos neurogénicos a los que dicha actividad sensorial se encuentra asociada.

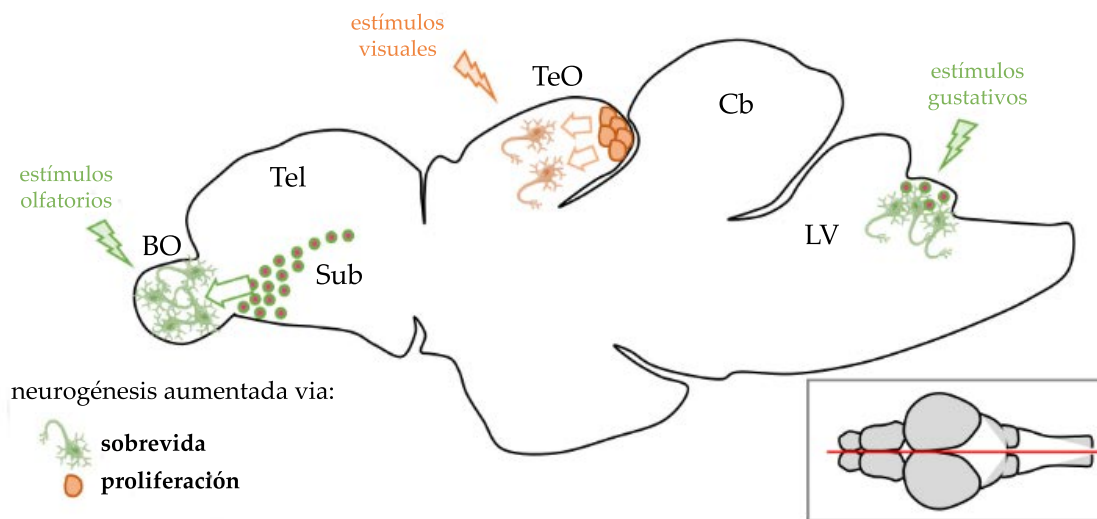


Figura 1.2: Modulación de la neurogénesis adulta en teleósteos. Influencia de estímulos sensoriales. Representación esquemática de sección sagital del encéfalo de teleósteo, ilustrando el efecto de distintas modalidades sensoriales sobre tres nichos neurogénicos: bulbo olfatorio, tectum óptico y lóbulo vagal. La modulación puede ser via aumento de la proliferación de NSCs (naranja) o por aumento de la sobrevida de las nuevas neuronas (verde). Modificado de Labusch y col., 2020.

Si bien en teleósteos se han comenzado a investigar cómo afectan distintos factores a la tasa de neurogénesis, no existen trabajos a la fecha que hayan estudiado la relación entre la realización de distintas tareas cognitivas y la neurogénesis. En esta Tesis buscamos abordar esta pregunta, utilizando el modelo de pez cebra.

4. Telencéfalo de Teleósteos

A lo largo de la filogenia, el desarrollo y la morfología de las distintas estructuras del encéfalo de los vertebrados se han ido modificando. En particular, la región del telencéfalo es una de las que exhibe mayor diversidad estructural. A diferencia de los mamíferos, el telencéfalo de los peces teleósteos posee un desarrollo embriológico por eversión del tubo neural, en lugar de evaginación, dando lugar a dos hemisferios separados entre sí por un ventrículo en forma de T. En este tipo de desarrollo, las zonas periventriculares no sólo quedan dispuestas internamente, sino también cubriendo la superficie externa de los hemisferios. La región del ventrículo se encuentra rodeada por una membrana coroidea, la cual se prolonga hacia la región dorsal de ambos lóbulos. Cada hemisferio se subdivide en una región dorsal denominada *pallium*, y una ventral, el *subpallium*. En el *pallium*, a su vez, se pueden distinguir las regiones medial (Dm), central (Dc), lateral (Dl) y posterior (Dp). La parte ventral o *subpallium*, se divide en una región dorsal (Vd) y una ventral (Vv) (Figura 1.3) (Ganz y col., 2014). De las dos grandes regiones, *pallium* y *subpallium*, la primera presenta mayor desarrollo, y una gran heterogeneidad y diferenciación de tipos neuronales (Pushchina y col., 2003).

Estudios realizados en pez cebra, pez cuchillo (*Apteronotus leptorhynchus*) y el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) mostraron que la zona periventricular del telencéfalo de peces adultos se hallan progenitores neuronales, convirtiendo a esta región en un importante nicho neurogénico (Figura 1.1 B) (Ekström y col., 2001; G. K. H. Zupanc y col., 2005).

Interesantemente, se ha visto que varias estructuras del *pallium* de teleósteos son homólogas a las del *pallium* de los mamíferos, las cuales están implicadas en la función cognitiva. Este punto resulta particularmente importante, ya que la correcta determinación de estas zonas homólogas permite utilizar peces teleósteos como modelos neurobiológicos, tanto para la comprensión de la fisiología del sistema nervioso, como para el estudio de enfermedades neurológicas humanas.

Para poder establecer dichas regiones, se han realizado numerosos estudios con distintos tipos de abordajes, como son el análisis de patrones de expresión de dis-

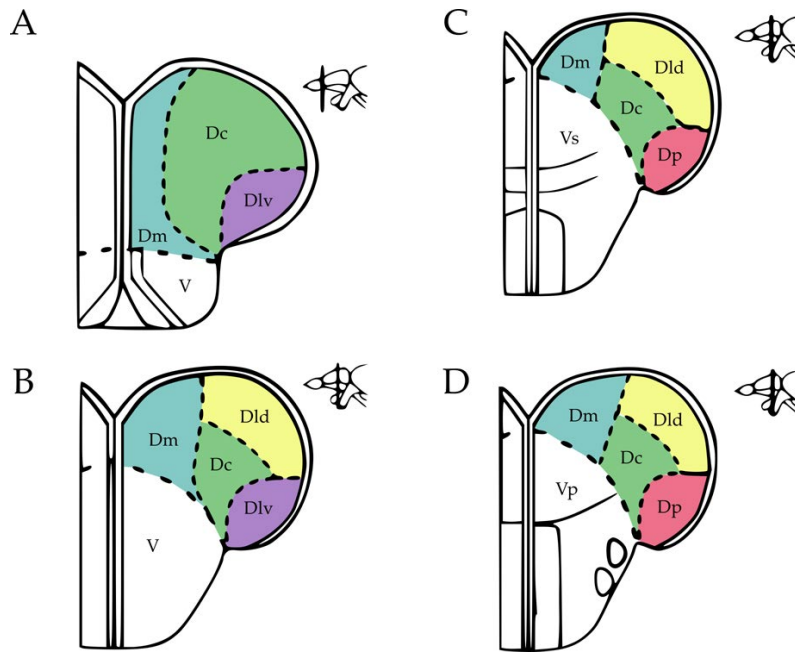


Figura 1.3: Esquema de las regiones del *pallium* a distintas alturas del eje rostro-caudal del telencéfalo de teleósteos. Dm: región dorso-medial; Dc: región dorso-central; Dld: región dorso-lateral dorsal; Dlv: región dorso-lateral ventral; Dp: región dorso-posterior; V: área ventral del telencéfalo o *subpallium*; Vs: núcleo supracomisural del *subpallium*; Vp: núcleo postcomisural del *subpallium*. En el extremo superior derecho de cada figura (A, B, C, D) se visualiza dónde se ha realizado el corte transversal en vista lateral del cerebro. Modificado de Ganz y col., 2014.

tintos genes durante el desarrollo temprano, el estudio de la conectividad entre distintas regiones, y ensayos de lesión que asocian regiones con comportamientos (revisado por Mueller y Wullimann, 2009). De acuerdo a éstos, y como veremos más adelante en el Capítulo II, el *pallium* dorso-medial (MP) es considerado homólogo a la amígdala basolateral, y el *pallium* dorso-lateral (LP), al hipocampo. Esta última, sería entonces la región candidata para el procesamiento espacial en teleósteos. Si bien existe cierto consenso respecto de la participación del LP en el aprendizaje espacial, cómo el pez cebra procesa esta información, y cuál es el impacto que este comportamiento tiene sobre la plasticidad del circuito son preguntas que aún no han sido abordadas.

Por lo tanto, bajo la hipótesis de que la actividad circuital, dada como resultado de la ejecución de una tarea de aprendizaje, modula positivamente la neurogénesis adulta, en esta Tesis se propone encontrar una estructura telencefálica que responda específicamente a un dado paradigma de aprendizaje, y estudiar el impacto de éste último sobre el remodelado circuital por neurogénesis adulta.

Capítulo I. Aprendizaje en Pez

Cebra: Búsqueda de un Paradigma Comportamental

1. Introducción

1.1. Aprendizaje y Memoria

El aprendizaje y la memoria son procesos cognitivos complejos filogenéticamente conservados en el reino animal. Desde organismos invertebrados simples, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, hasta vertebrados complejos, como los primates, estos procesos permiten al individuo adaptarse a los cambios ambientales. Podemos definir el aprendizaje como el proceso por el cual el sistema nervioso adquiere nueva información, y es observable a partir de cambios comportamentales (Purves, 2004). Otra posible definición es la modificación de una respuesta comportamental en base a un estímulo ambiental (Sweatt, 2010). Es decir, el aprendizaje se da cuando un animal cambia su *patrón de comportamiento* en respuesta a una *experiencia*. La memoria, en cambio, hace referencia a la codificación y almacenamiento de la información aprendida, que a su vez está asociado al fenómeno de evocación o recuperación de la información a través del cual se expresa el cambio comportamental (Purves, 2004).

Las memorias pueden ser de corta o larga duración, y esta propiedad depende

del número de veces en las que un animal experimenta un estímulo que modifica su comportamiento: una única repetición o *trial* de entrenamiento puede suscitar una memoria que dure minutos, mientras que estimulaciones repetidas pueden resultar en memorias de horas o días de duración. Los mecanismos que subyacen al establecimiento y consolidación de memorias es lo que conocemos como fenómenos de *plasticidad*. Dicha plasticidad puede ser de tipo sináptica, si implica cambios a nivel molecular (ej: potenciación/depresión a largo plazo); estructural, si provoca alteraciones anatómicas en los circuitos (como cambios en el tamaño y número de espinas dendríticas); o circuital, que puede implicar tanto la formación de nuevas sinapsis como la incorporación de nuevas neuronas. Estos procesos pueden darse en forma independiente, o también pueden ocurrir de manera combinada/encadenada (Lamprecht y Ledoux, 2004; Lledo y col., 2006; Sweatt, 2010).

Los mecanismos del aprendizaje y la memoria han despertado particular interés, y han sido estudiados de manera exhaustiva a nivel molecular, celular, circuital y comportamental. Cabe destacar que su investigación no sólo resulta relevante para el entendimiento de las bases del comportamiento animal, sino que también presenta implicancias médicas. Por ejemplo, es sabido que distintos desórdenes del sistema nervioso central, como las distintas formas de demencia, o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, están asociadas a impedimentos en estas funciones, las cuales continúan siendo irreversibles. El entendimiento de la biología de estos procesos cognitivos resulta, entonces, de vital importancia entre otras cosas para poder diseñar estrategias que permitan evitar los efectos detrimentales que poseen dichas enfermedades neurológicas.

1.2. Aprendizaje desde perspectiva *Estructura-Función*

Uno de los principales intereses en el estudio del aprendizaje es la asignación de regiones específicas del encéfalo asociadas a distintos tipos de experiencias. Es decir, el estudio del aprendizaje y la memoria con un enfoque *estructura-función*. En roedores, existen numerosos paradigmas comportamentales que permiten el estudio del aprendizaje desde esta perspectiva. Tal es el caso de las *tareas dependientes del hipocampo*. En modelos murinos, se ha visto que esta estructura cumple un rol crítico

en el procesamiento cognitivo de la información *espacial* y *temporal*, y también se encarga de la consolidación de memorias episódicas (Smith y Mizumori, 2006).

En el laboratorio, para estudiar el aprendizaje espacial en roedores, se utilizan diferentes paradigmas comportamentales, entre ellos, el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984) y el laberinto circular de Barnes (Barnes, 1979). En el primer caso, el individuo es colocado en una pileta en la que se encuentra sumergida una plataforma, con una solución acuosa opaca que le impide al animal visualizar la misma. Utilizando claves espaciales, el roedor debe ser capaz de orientarse para ubicar la localización de dicha plataforma. En el caso del laberinto de Barnes, este consiste en una plataforma circular con 20 agujeros, de los cuales solo uno conduce a una cámara de escape, que cumple la función de refugio. Dado que los roedores encuentran aversivos los espacios abiertos y bien iluminados, buscarán alrededor de la plataforma, utilizando claves espaciales colocadas en las paredes tratando de encontrar un refugio seguro y oscuro. Ambos paradigmas han sido ampliamente utilizados para estudiar navegación espacial en mamíferos.

Otra de las tareas dependientes del hipocampo es el reconocimiento de objetos o contextos *novedosos*. Los estímulos novedosos pueden cambiar el comportamiento de los animales, como provocar estrés y ansiedad, o por el contrario, pueden generar atracción, reflejado en un comportamiento de exploración (Antunes y Biala, 2012). Para estudiar este proceso, se utiliza típicamente el test de Reconocimiento de Objetos Novedosos (o *Novel Object Recognition*, NOR). Esta es una tarea en la cual se expone al individuo a objetos idénticos, y luego se realiza un re-exposición al mismo ambiente, intercambiando uno de los objetos por otro novedoso. Este constituye un paradigma que permite evaluar el reconocimiento y la discriminación entre objetos similares (fenómeno referido como *separación de patrones*), mediante el análisis del tiempo de exploración de cada uno (objetos familiar y novedoso).

Teniendo estos antecedentes en cuenta, podemos decir que en mamíferos existe una amplia evidencia de la vinculación entre estructura y función, en este caso, del *hipocampo* con el *aprendizaje espacial*. En comparación con la extensa bibliografía que disponemos sobre la relación entre estructura y función en mamíferos, los trabajos que analizan esta vinculación en peces teleóstos, mediante el estudio el impacto

de la ejecución de determinados paradigmas comportamentales sobre estructuras específicas, son escasos. Por lo tanto, podemos afirmar que este tipo de abordaje en modelos teleósteos es aún incipiente.

1.3. El Pez Cebra como Modelo de Estudio

¿Qué puede aportar, entonces, el hecho de estudiar aprendizaje y memoria en el modelo de pez cebra? El pez cebra ha emergido en las últimas décadas como un potente modelo para estudios biomédicos. Si bien son filogenéticamente distantes de los mamíferos, una enorme cantidad de genes presentan homología con teleósteos. De hecho, aproximadamente un 70 % de los genes humanos tienen al menos un ortólogo en este modelo. En particular, de los genes asociados a enfermedades en humanos, un 82 % presenta su ortólogo en pez cebra (Howe y col., 2013). Esto sumando al hecho de que el pez cebra constituye un modelo con posibilidades de manipulación genética, lo convierten en uno de los mejores candidatos para la investigación de las bases genéticas y moleculares de dichos procesos.

Por otra parte, los procesos de aprendizaje resultan muchas veces difíciles de abordar en mamíferos, dada la complejidad de las estructuras involucradas. Por lo tanto, el abordaje de los mismos en un sistema biológicamente más sencillo, nos permitiría entender las bases neurobiológicas fundamentales para el desarrollo de estos rasgos altamente conservados evolutivamente.

Para poder estudiar el fenómeno de neurogénesis adulta en asociación con un dado aprendizaje, uno de los objetivos de esta Tesis es poder asociar un paradigma de aprendizaje a una dada región encefálica. Como se mencionó previamente, el *pallium* telencefálico, y en particular la región dorso-lateral ha sido sugerida como homóloga al hipocampo. Existen ya antecedentes de trabajos comportamentales en pez cebra en los que se han adaptado paradigmas dependientes del hipocampo, como el reconocimiento de objetos novedosos o el paradigma de campo abierto (*open field*) (Braida y col., 2014; Faillace y col., 2017; Hamilton y col., 2016; Karnik y Gerlai, 2012; Lucon-Xiccato y Dadda, 2014; May y col., 2016; Oliveira y col., 2015; Pinheiro-da-Silva y col., 2017; Sison y Gerlai, 2011).

En esta Tesis, se decidió abordar dos paradigmas distintos, el **Reconocimiento**

de **Objetos** y una **Tarea de Constancia Espacial**, con el desafío, entonces, de demostrar la capacidad de aprendizaje en individuos de pez cebra frente a una dada tarea, para luego estudiar su vinculación con una estructura específica del pallium telencefálico.

2. Resultados

2.1. Reconocimiento de Objetos (OR)

Con el objetivo de establecer un paradigma de aprendizaje que permita el posterior estudio de la estructura implicada en la ejecución de dicha tarea, se decidió inicialmente analizar la preferencia por objetos novedosos (NOR) del pez cebra, siendo que este protocolo ya cuenta con antecedentes bibliográficos. Para tal fin, se realizó, en primer lugar, un relevamiento bibliográfico de los protocolos realizados en distintas especies de teleósteos adultos. Los resultados están resumidos en la Tablas 2.1 y 2.2.

Como se mencionó anteriormente, la tarea de reconocimiento de objetos novedosos, consiste en exponer al pez a objetos idénticos durante un tiempo dado (al que denominaremos *tiempo de exposición 1*, o T1). Luego de un *intervalo de retención*, o IR, se los re-expone al mismo ambiente, intercambiando uno de los objetos por otro novedoso durante un *tiempo de exposición 2*, o T2. La variable evaluada es el tiempo de exploración en las inmediaciones de cada objeto.

Como se puede apreciar, existe una enorme variabilidad en los tiempos, objetos y número de individuos utilizados en cada trabajo. Los protocolos no sólo varían en cuanto a estos parámetros, sino que, aún más importante, cambia el tipo de respuesta que registran respecto de los objetos nuevos, siendo de atracción en algunos casos (*neofilia*) y de repulsión en otros (*neofobia*). A continuación analizaremos la variabilidad en algunos de los parámetros de NOR.

Respecto a T1, los tiempos utilizados se extienden desde 5 minutos a 3 horas, mientras que para T2 son de 5-30 minutos como máximo. Los IR son los que presentan mayor variabilidad, siendo el mínimo de 5 min y el máximo de 6 días. Esta

variación responde, por un lado, al tipo de memoria analizada (memoria de corto vs. largo plazo), y a la capacidad de aprendizaje de las distintas especies y/o líneas genéticas.

A las diferencias ya mencionadas se suma la variabilidad en los objetos utilizados, tanto en tamaño como en color. Por ejemplo, para pez cebrado, existen diversos estudios que muestran preferencia por colores (Avdesh y col., 2012; Bault y col., 2015; Oliveira y col., 2015; Peeters y col., 2016), los cuales tampoco son concluyentes respecto de los colores a los que se sienten atraídos/repelidos. En conclusión, estos resultados muestran una enorme complejidad a la hora establecer parámetros inequívocos para la realización de esta tarea de aprendizaje, no sólo dada por los tiempos de exploración y retención, sino también por el tipo/color de los objetos elegidos.

Publicación	Especie	Habitación	T1	IR	T2
Lucon-Xiccato, 2014	<i>Danio rerio</i>	24hs	25 min	2h, 6h o 24h	25 min
Braida, 2014	<i>Danio rerio</i>	1 semana	10 min	5 min, 3hs, 24hs o 96 hs	10 min
Oliveira, 2015	<i>Danio rerio</i>	15 min por día/5 días	30 min	24 hs	30 min
May, 2016	<i>Danio rerio</i>	5 min	10 min	1, 5, 10, 15, o 30 min	10 min
Hamilton, 2016	<i>Danio rerio</i>	2 min	5 min	2 min	5 min
Pinheiro-da-Silva, 2017	<i>Danio rerio</i>	15 min / 5 días	15 min	24 hs	15 min
Faillace, 2017	<i>Danio rerio</i>	5 min, 2 veces al día / 3 días	5 o 10 min	1.5 o 24 hs	10 min
Sneddon, 2003	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	experimento en su tanque	15 min x 4 (cada hora)	-	-
Miletto Petrazzini, 2012	<i>Poecilia reticulata</i>	20 hs	20 min	30 min	12 min
Lucon-Xiccato, 2016	<i>Poecilia reticulata</i>	6 días, durante 24hs	1 o 3 hs	1 o 6 días	12 min
Hamilton, 2017	<i>Stegastes partitus</i>	10 min con Dopamina	10 min	10 min	10 min

Tabla 2.1: Trabajos previos en Reconocimiento de Objetos Novedosos. T1: exposición a objetos idénticos, IR: Intervalo de Retención, T2: exposición a objeto familiar + objeto novedoso.

Publicación	Nº individuos	Medidas Objetos (cm)	Medida Tanque (cm)	Respuesta a ON
Lucon-Xiccato, 2014	13M/17H	diámetro: 1.8 4 x 0.5	50 x 20 x 32	NEOFILIA
Braida, 2014	9-11	2.5	70 x 30 x 10	NEOFILIA
Oliveira, 2015	48	2.7 x 2.7 3.5 x 3.5	40 x 20 x 25	NEOFILIA
May, 2016	256	4 5	29 x 14 x 18	NEOFILIA
Hamilton, 2016	107	4 5	14.5 x 14.5	NEOFILIA
Pinheiro-da-Silva, 2017	11	4 x 4 x 4	40 x 25 x 20	NEOFILIA
Faillace, 2017	50	3	25 x 25 x 20	Preferencia por colores rojos y verdes
Sneddon, 2003	30	9 x 5 máximo	45 x 25 x 35	NEOFILIA
Miletto Petrazzini, 2012	12	10.5 x 1 2 x 3	18 x 38 x 16.5	NEOFILIA
Lucon-Xiccato, 2016	16M/16H	4 x 4 x 2 4 x 3 x 7	50 x 20 x 32	NEOFILIA
Hamilton, 2017	16	no informa	no informa	NEOFILIA con Dopamina-R

Tabla 2.2: Trabajos previos en Reconocimiento de Objetos Novedosos. ON: Objeto Novedoso. Neofilia: preferencia por objeto novedoso. Neofobia: aversión por objeto novedoso.

Reconocimiento de Objetos en Pez Cebrado de Acuario Comercial

Debido a la variabilidad en las respuestas de neofilia vs. neofobia descritas en la literatura revisada, la estrategia, en una primera aproximación, fue realizar

un protocolo con una exposición a objetos idénticos (T1), un intervalo de retención (IR) y una nueva exposición a un objeto *familiar* y otro *novedoso* (T2) de 5 minutos cada uno. Utilizamos peces obtenidos en un acuario comercial. En este caso, dado que tanto la forma como la distribución de colores son factores que pueden influir en la preferencia de objetos, se diseñaron objetos de forma idéntica que incluían una combinación de distintos colores. De esta manera, se evita un posible sesgo en la interpretación de los datos de tiempo de permanencia en cercanía de un objeto que pudiera estar dado por una mera preferencia a un único color dado. Es importante resaltar que, a diferencia de muchos de los trabajos mencionados en la sección anterior, la forma de los objetos se mantuvo constante a lo largo de todas las pruebas, los únicos factores que se modificaron fueron los colores utilizados y la distribución de los mismos. La variable analizada fue el tiempo de permanencia en cercanía de uno y otro objeto, utilizando un Índice de Discriminación (I_D) (ver *Materiales y Métodos, Sección 2.1*), según el cual valores positivos indican preferencia por el objeto *familiar*, mientras que valores negativos, muestran mayor permanencia en cercanía del objeto *novedoso*.

Si bien estaba previsto que todos los ensayos fueran realizados en la línea de laboratorio AB *wild-type* (cuya ventaja radica en ser genéticamente estandarizada y, por lo tanto, aportar reproducibilidad y la eliminación de la variabilidad de origen genético en los experimentos que serán abordados en los Capítulos II y III) inicialmente, frente a la falta de individuos de la línea mencionada, se utilizaron peces provenientes de un acuario comercial local para la puesta a punto comportamental.

Como se observa en la Figura 2.1, en T1 no hay una preferencia por ninguno de los dos objetos, lo cual es esperable dado que ambos son idénticos. Sin embargo, cuando se analiza T2, se observa una gran variabilidad en la respuesta al estímulo novedoso, no detectándose ninguna preferencia clara. Dada la variabilidad de resultados, se consideró, por un lado, cambiar la geometría de la arena por una rectangular, para que se evidencie más claramente la preferencia de nado del individuo hacia la izquierda o derecha (Figura 2.2). Por otra parte, con el objetivo de lograr una eventual actividad circuital sostenida en el tiempo, necesaria para probar posteriormente la hipótesis de la incorporación de nuevas neuronas, se optó por realizar

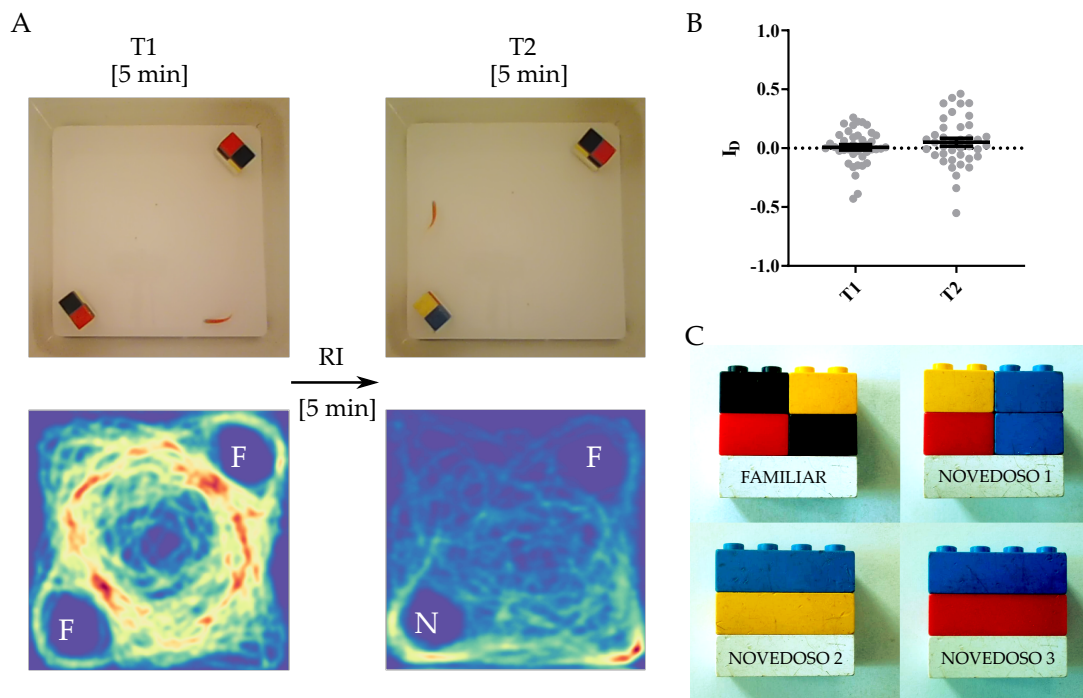


Figura 2.1: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* de acuario comercial. A. Protocolo de Reconocimiento de Objetos. Exposición a objetos idénticos (T1), un intervalo de retención (IR) y una nueva exposición a un objeto *familiar* y otro *novedoso* (T2) de 5 minutos cada uno. *Arriba*: Fotos representativas de T1 y T2. *Abajo*: Ejemplo de mapas de calor de la trayectoria de un individuo. B. Preferencia por los objetos en T1 y T2. En T2 valores positivos indican preferencia por objeto *familiar*, y negativos, por el objeto *novedoso*. No se observa preferencia por ninguno de los objetos (t -test pareado, $t_{(39)}=1.235$, n.s., $N=40$). C. Objeto *familiar* utilizado a lo largo de todos los experimentos, y tres ejemplos de objetos *novedosos*.

un protocolo con 4 sesiones repartidas en dos días de entrenamiento, cada una con la estructura [T1-IR-T2]. Este cambio también buscó reforzar la consolidación de la memoria de los objetos *familiares* (Figura 2.3, A). Finalmente, al día siguiente, se los sometió a una sesión de prueba de memoria a largo plazo, en la que se los expuso solamente al objeto *familiar* con uno *novedoso* (es decir, sólo T2). De manera que se modificaron los protocolos originales de preferencia de objetos *novedosos*, que constan de una única sesión de aprendizaje, a sucesivas sesiones diarias de estructura [T1-IR-T2], con objetos *novedosos* que variaban sesión a sesión. Es decir, cada T2 de una sesión presentaba un objeto *novedoso* diferente del de la siguiente sesión.

Los resultados muestran que no hubo preferencia por ninguno de los dos objetos ni durante las sesiones de aprendizaje, ni durante el test de MLP (Figura 2.4).

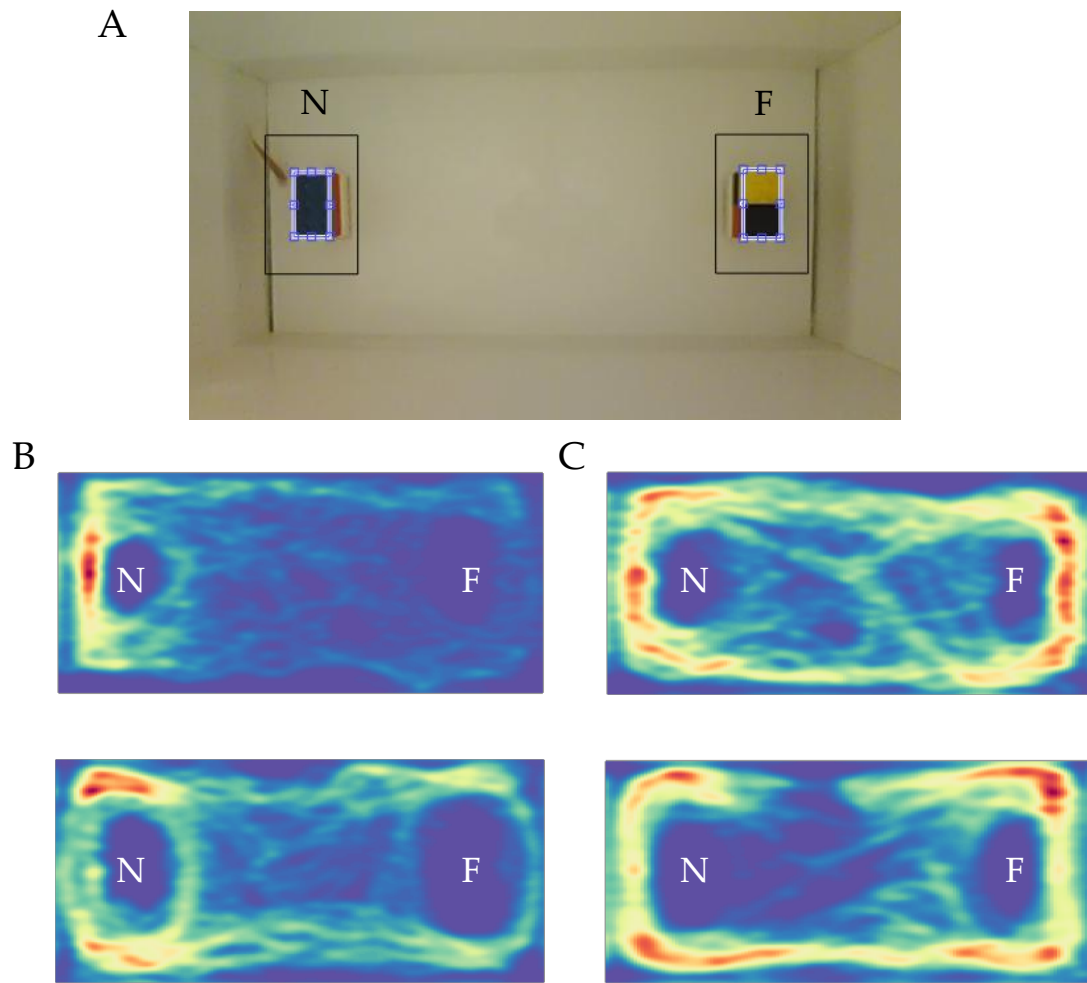


Figura 2.2: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* de acuario comercial. A. Foto representativa de dispositivo. Las cajas negras indican las Áreas de Interés donde se analizó el tiempo de exploración a lo largo de las sesiones. Para mayor detalle, ver *Materiales y Métodos, Sección 2.1*. B. Mapas de calor representativos de individuos con preferencia por el objeto novedoso. C. Mapas de calor representativos de individuos que no mostraron preferencia por ninguno de los dos objetos. N: objeto novedoso; F: objeto familiar.

Reconocimiento de Objetos con Refuerzo Apetitivo

Considerando este resultado, se optó por forzar la discriminación del objeto *novedoso* con un estímulo apetitivo. Para probar si efectivamente se generaba una asociación entre el objeto distinto con el estímulo apetitivo, la prueba de MLP del último día fue realizada en ausencia de la recompensa. Por otro lado, también se agregaron dos sesiones de habituación a la pecera vacía de 20 minutos, previas al inicio del entrenamiento (Figura 2.5, A,B), para disminuir el factor de ansiedad en el comportamiento de nado dado por la exposición a un contexto novedoso.

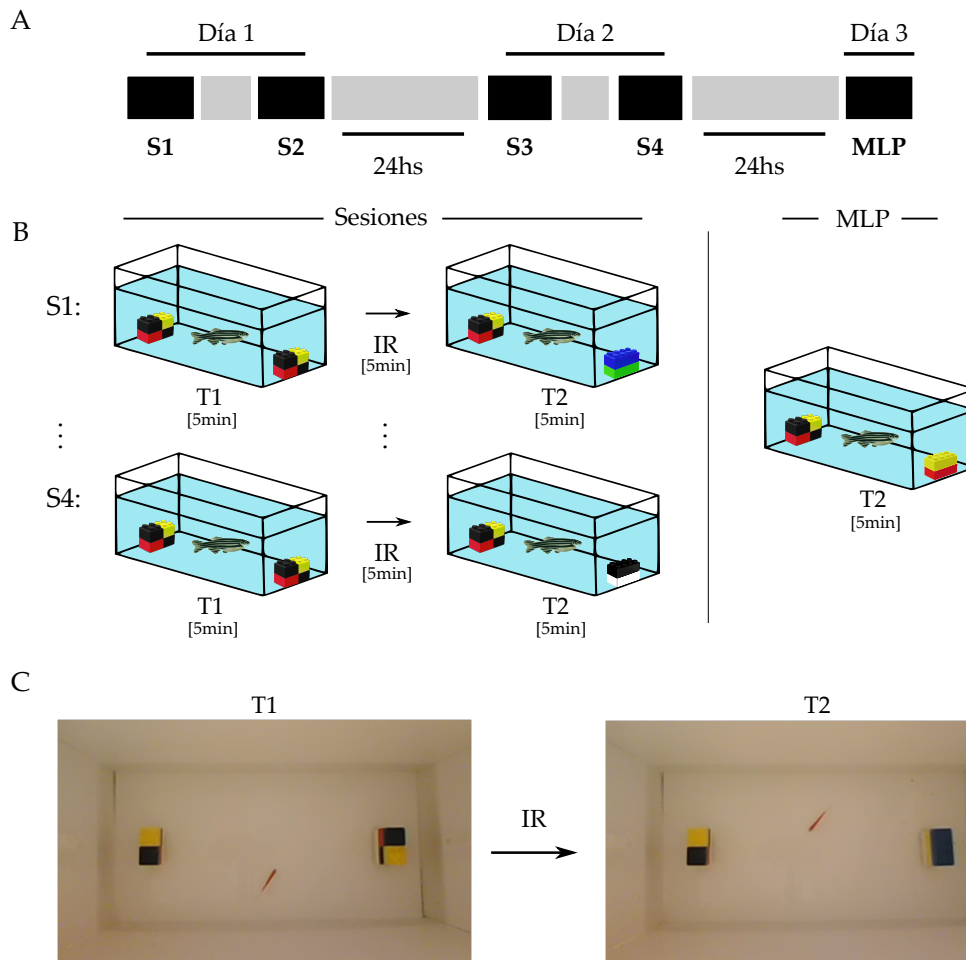


Figura 2.3: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* de acuario comercial. A. Protocolo de Aprendizaje. Cada sesión (S) constó de [T1-IR-T2]. Se realizaron dos sesiones por día, durante dos días consecutivos, seguido de un test de Memoria a Largo Plazo (MLP). B. Ilustraciones describiendo el protocolo. C. Fotos representativas de T1 y T2.

En este caso, sí se observó una clara preferencia aprendida hacia los objetos novedosos durante las sesiones. Con lo cual, está claro que se forma una asociación entre el objeto y la recompensa. La misma preferencia, aunque no tan marcada, se observa durante la prueba de MLP (Figura 2.5, C). Es evidente que el tiempo de permanencia en el objeto novedoso en ausencia de la recompensa es más acotada que durante las sesiones, con lo cual se decidió analizar el primer minuto del test para estudiar únicamente la primer elección del individuo frente a la exposición a los objetos. Se observó que la diferencia aumenta, respecto de analizar los 5 minutos de prueba, indicando que los individuos efectivamente consolidan una memoria luego

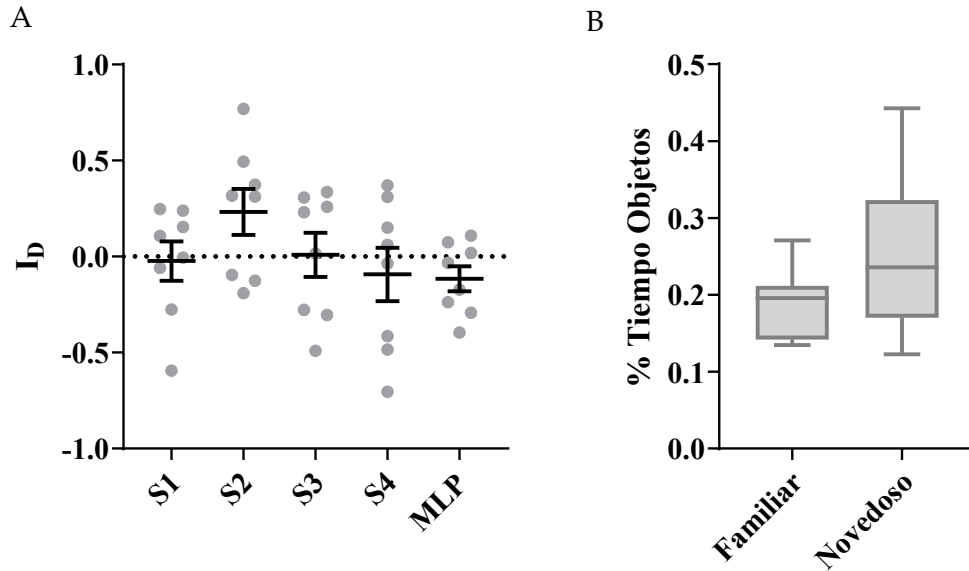


Figura 2.4: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* de acuario comercial. A. Índice de Discriminación durante T2 para cada sesión y test de MLP. No se observan diferencias significativas respecto de 0 (t-test para una muestra, S1: $t_{(7)}=0.2273$, S2: $t_{(7)}=1.932$, S3: $t_{(7)}=0.08446$, S4: $t_{(7)}=0.6666$, MLP: $t_{(7)}=1.772$, n.s., N=8). B. Porcentaje del tiempo total del test de MLP (5 minutos) en cercanía del objeto *familiar* y *novedoso* (t-test pareado, $t_{(7)}=1.7944$, n.s., N=8).

de 4 sesiones de entrenamiento (Figura 2.5, D).

Reconocimiento de Objetos con Refuerzo Apetitivo en cepa AB

wild-type

Una vez obtenido este resultado, el siguiente paso fue probar el mismo protocolo pero en la línea AB *wild-type*. Llamativamente, y a diferencia de lo observado con los peces comerciales de acuario, los AB *wt* no aprendieron a diferenciar los objetos novedosos de los familiares durante las sesiones (Figura 2.6, B).

Por lo tanto, se modificó nuevamente el protocolo de aprendizaje. Con el objetivo de reforzar la memoria por los objetos *familiares*, se extendieron las sesiones de habituación de 20 minutos a 24 horas: la primera habituación se realizaba con la pecera vacía, y la segunda, con exposición a los objetos idénticos. En consecuencia, se eliminaron las exposiciones a los objetos *familiares* (F-F) durante las sesiones, las cuales fueron reemplazadas directamente por la presentación de los objetos *familiar-novedoso* (F-N) y se eliminaron los IR. Por último, se agregaron dos tratamientos

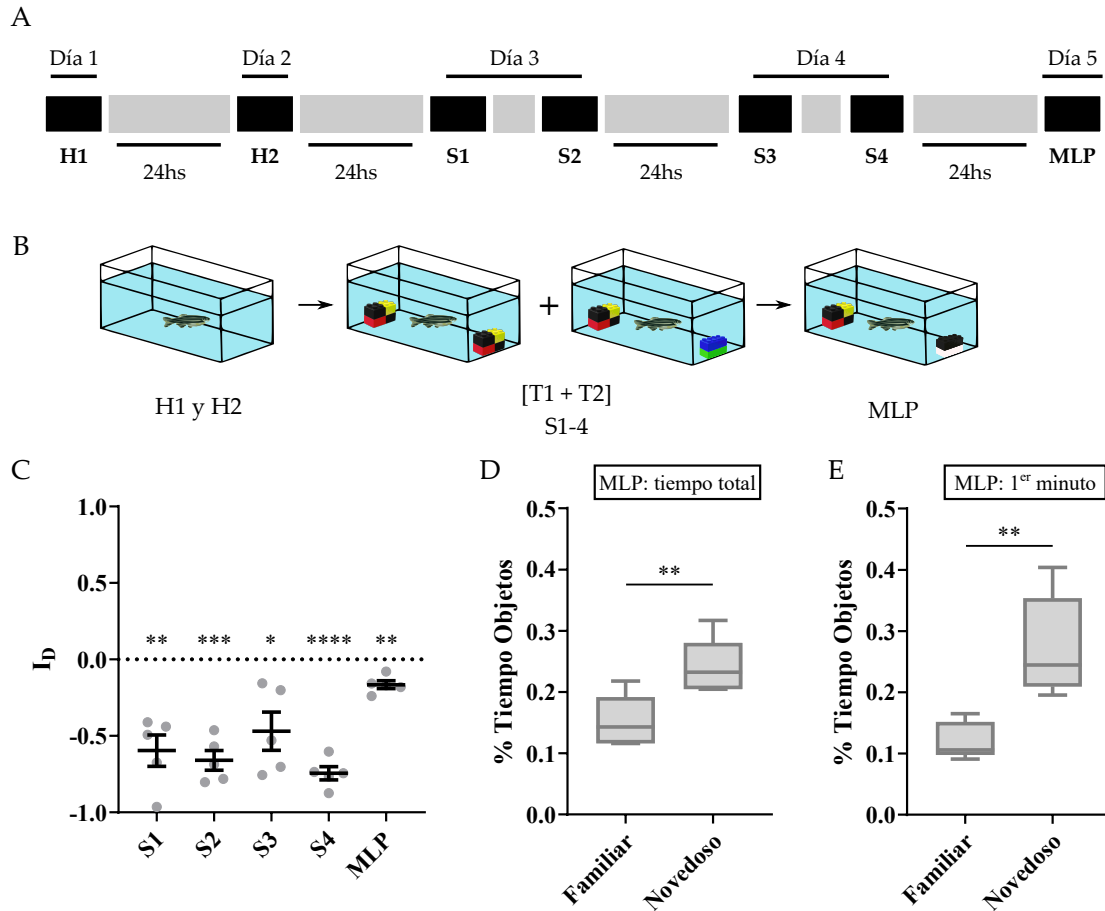


Figura 2.5: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* de acuario comercial con refuerzo apetitivo. A. Protocolo de Aprendizaje. Cada sesión (S) constó de [T1-IR-T2], seguida de una prueba de MLP. B. Ilustraciones describiendo el protocolo. C. Índice de Discriminación de T2 para cada sesión y test de MLP. Se observa una clara preferencia por el objeto novedoso a lo largo de las sesiones, y durante el test de MLP (t-test para una muestra, S1: $t_{(4)}=5.793$, S2: $t_{(4)}=10.23$, S3: $t_{(4)}=3.764$, S4: $t_{(4)}=17.24$, MLP: $t_{(4)}=6.421$, * indica $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, $N=5$). D. Porcentaje del tiempo total del test de MLP (5 minutos) en cercanía de los objetos (t-test pareado, $t_{(4)}=6.515$, ** indica $p<0.01$, $N=5$). E. Porcentaje del tiempo en cercanía de los objetos, durante el primer minuto del test de MLP (t-test pareado, $t_{(4)}=5.272$, ** indica $p<0.01$, $N=5$).

Control: un grupo solamente estaba expuesto a objetos *familiares* en cada sesión, y el alimento era administrado en ambos objetos en forma indistinta (F-F alimento *random*) para descartar una eventual preferencia por algún lado de la pecera; el otro grupo era entrenado con los objetos *familiares* y *novedosos*, pero sin estímulo alimenticio (F-N sin recompensa), para demostrar si se trata de una mera preferencia por el objeto, o si es producto de la asociación con el estímulo alimenticio. Como se observa en la Figura 2.7 D, el grupo de peces Entrenados en la tarea presenta

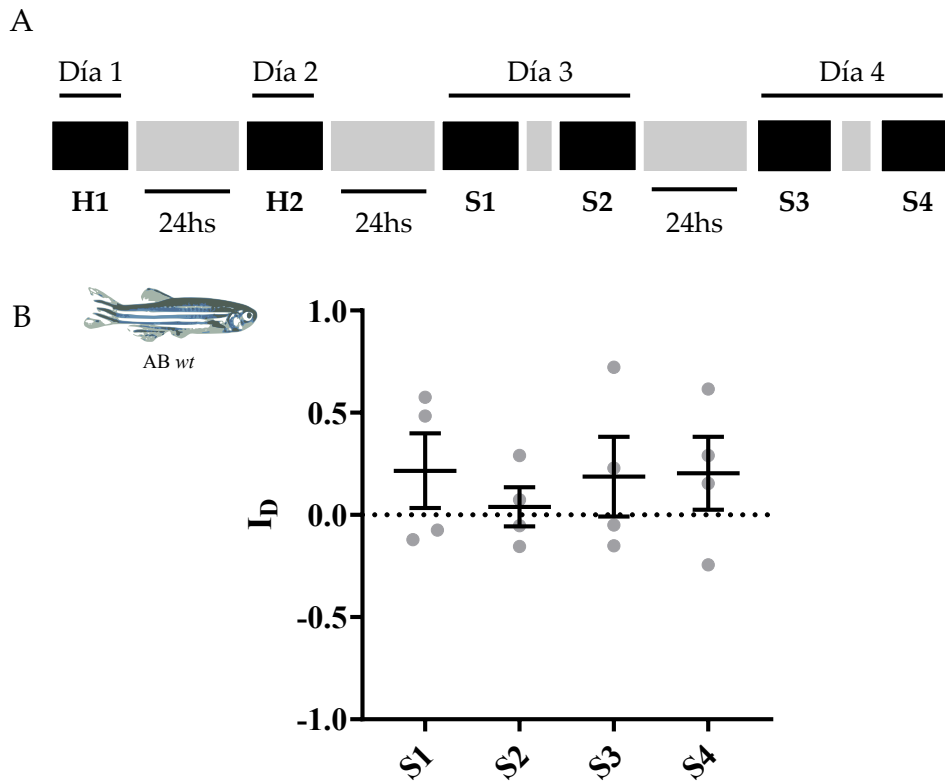


Figura 2.6: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* ABwt con refuerzo apetitivo. A. Protocolo de Aprendizaje. Cada sesión (S) constó de [T1-IR-T2]. B. Índice de Discriminación de T2 para cada sesión. No se observan diferencias significativas respecto de 0 (t-test para una muestra, S1: $t_{(3)}=1.186$, S2: $t_{(3)}=0.4165$, S3: $t_{(3)}=0.9616$, S4: $t_{(3)}=1.146$, n.s., N=4).

un mayor tiempo de nado en las inmediaciones del objeto novedoso, como resultado de la estimulación con alimento, pero esa preferencia deja de ser significativa en la S4, y se pierde por completo en el test de MLP, en el cual la media del I_D es cercana a 0. En cuanto a los Controles, tanto los Entrenados sin recompensa como los Entrenados únicamente con objetos familiares muestran un patrón de nado *random*, con prácticamente igual cantidad de tiempo de nado distribuido entre ambos objetos, a lo largo de todas las sesiones (Figura 2.7, C).

Con estos resultados, se hipotetizó que quizás el constante cambio del objeto *novedoso* en cada sesión, sumado a uno diferente en el test podría ser demasiado desafiante para el individuo. Para intentar simplificar la tarea tanto el objeto *novedoso* como el *familiar* se mantuvieron inalterados a lo largo de los días. Por lo tanto, la distinción entre la condición *familiar* vs. *novedoso*, en este caso, se pierde. Es por ello que este ensayo se corresponde con un paradigma de Condicionamiento

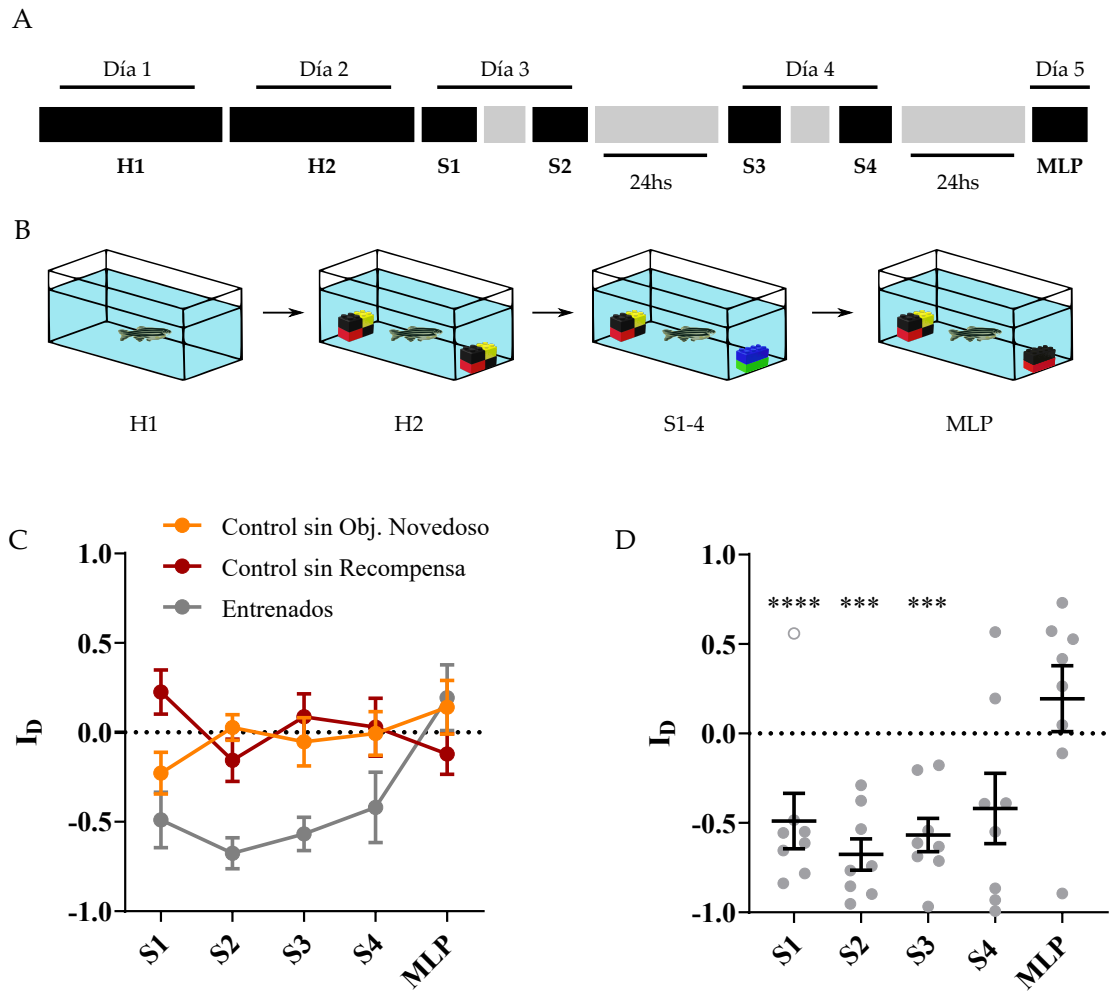


Figura 2.7: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* ABwt con refuerzo apetitivo. A. Protocolo de Aprendizaje. Se realizaron habituaciones de 24 horas. La H2 fue realizada con los objetos idénticos, y luego en cada sesión (S) sólo se realizó T2. Al finalizar las sesiones, se realizó un test de MLP. B. Ilustraciones describiendo el protocolo. C. Índice de Discriminación para cada sesión. D. Performance de individuos Entrenados. Se observa que los Entrenados muestran una preferencia por el objeto *novedoso* durante las primeras tres sesiones, no así en S4 ni MLP (t-test para una muestra, S1: $t_{(7)}=13.15$, S2: $t_{(7)}=7.723$, S3: $t_{(7)}=6.085$, S4: $t_{(7)}=2.135$, MLP: $t_{(7)}=1.057$, *** indica $p<0.001$, **** $p<0.0001$, $N=8$).

de Preferencia al Lugar, el cual fue realizado exclusivamente a modo de control, para tratar dilucidar si en nuestras condiciones experimentales los individuos eran efectivamente capaces de discriminar visualmente los objetos. También se extendió el número de sesiones a siete, y decidimos realizar un test de memoria a corto plazo, luego de la S7. Por último, en este caso se analizaron sólo los dos primeros minutos de cada sesión, para evaluar la preferencia inicial del individuo. Como se puede observar en la Figura 2.8, la preferencia por el objeto *novedoso* que se obser-

va desde la S3 en adelante, dado por la presencia del estímulo apetitivo, se pierde por completo en el test de MCP, demostrando, una vez más, que incluso realizando un protocolo de refuerzo del aprendizaje sostenido durante 4 días consecutivos, los peces no logran formar una asociación entre el objeto presentado como *novedoso* y la presencia del alimento, o no reconocen la diferencia entre objetos.

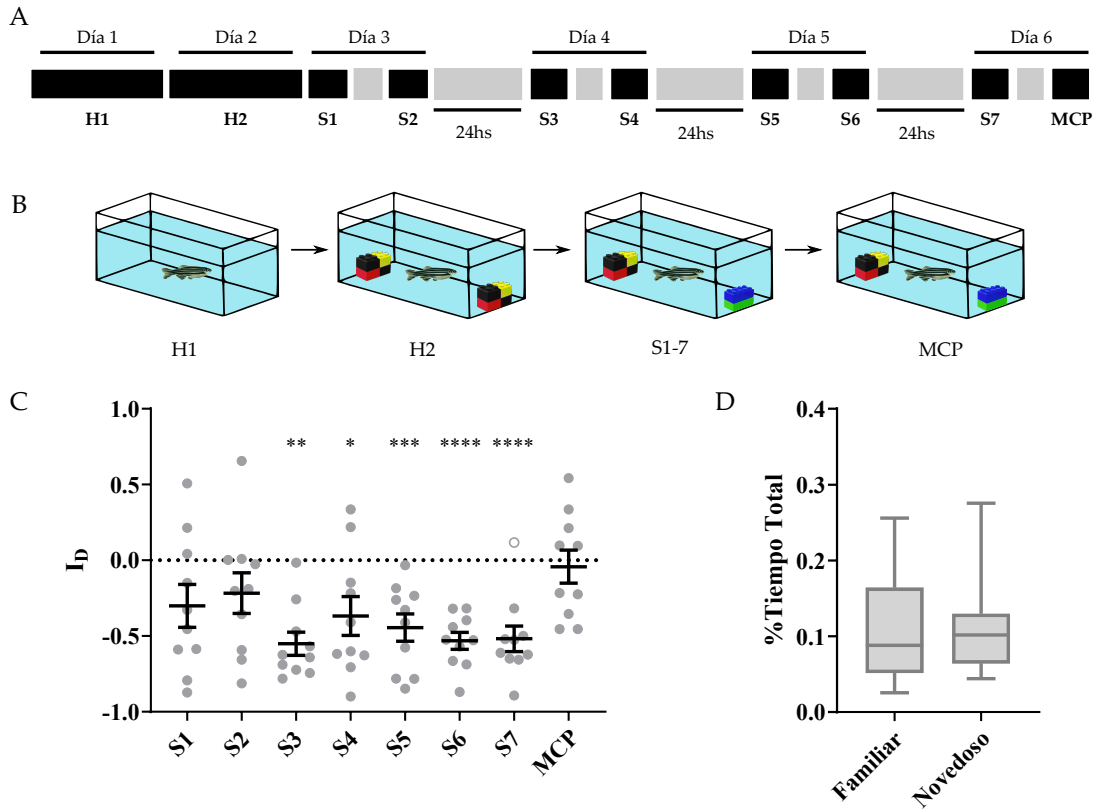


Figura 2.8: Reconocimiento de Objetos en *Danio rerio* ABwt con refuerzo apetitivo. A. Protocolo de Aprendizaje. Se realizaron habituaciones (H) de 24 horas. La H2 fue realizada con los objetos idénticos, y luego en cada sesión (S) sólo se realizó T2. En este caso, el objeto *novedoso* se mantuvo inalterado a lo largo de las sesiones. Al finalizar las 7 sesiones, se realizó un test de Memoria a Corto Plazo (MCP). B. Ilustraciones describiendo el protocolo. C. Índice de Discriminación de los primeros dos minutos de nado de cada sesión. Se observa que los Entrenados muestran una preferencia por el objeto *novedoso* durante las S3-7, no así en el test de MCP (t-test para una muestra, S1: $t_{(9)}=2.116$, S2: $t_{(9)}=1.623$, S3: $t_{(9)}=7.177$, S4: $t_{(9)}=2.850$, S5: $t_{(9)}=4.907$, S6: $t_{(9)}=9.624$, S7: $t_{(9)}=11.41$, MCP: $t_{(9)}=0.3797$, * indica $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, N=8). D. Porcentaje del tiempo en cercanía de los objetos, durante los dos primeros minutos del test de MCP. No se observan diferencias significativas (t-test pareado, $t_{(9)}=0.04608$, n.s., N=10).

Dado que no se obtuvo un resultado concluyente en ninguno de los protocolos probados en la línea AB *wt* en el que se pudiera asegurar aprendizaje de discriminación de objetos, se decidió cambiar de paradigma de aprendizaje.

2.2. Aprendizaje en una Tarea de Constancia Espacial (SCT)

Como se mencionó previamente, las tareas de aprendizaje o mapeo espacial han sido ampliamente exploradas en modelos murinos. En teleósteos uno de los paradigmas comportamentales que se han probado con éxito es la Tarea de Constancia Espacial (Broglia y col., 2010; Ingle y Sahagian, 1973; López y col., 2000). Esta tarea, que consiste de un laberinto romboidal guiado por claves espaciales, implica la conjugación del procesamiento de las claves dentro del laberinto con la información direccional interna del individuo. Más aún, el grupo de Salas y colaboradores ha evidenciado la vinculación entre esta tarea y la región del *pallium* lateral del telencéfalo de pez dorado (*Carassius auratus*) (Broglia y col., 2010; López y col., 2000).

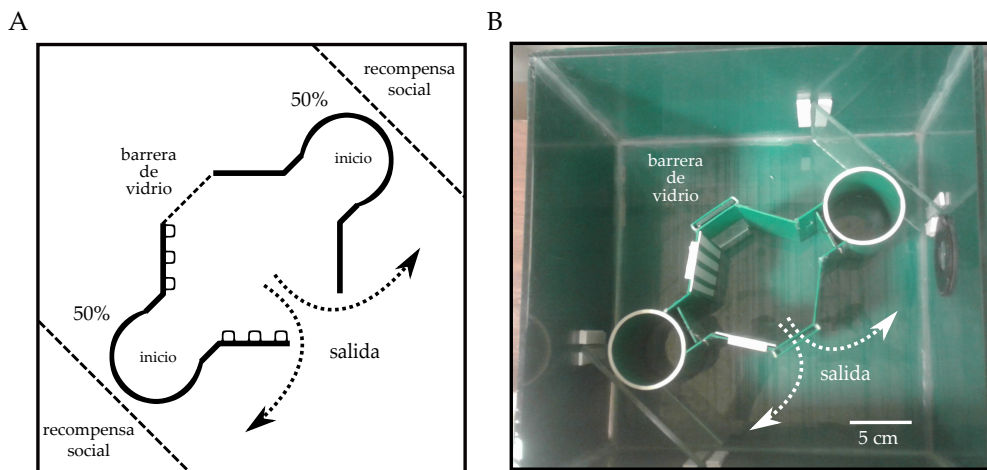


Figura 2.9: A. Pecera experimental. El dispositivo contiene dos compartimentos de salida, y dos posibles salidas, una de ellas bloqueada por una barrera de vidrio transparente. Los peces fueron entrenados para encontrar la salida correcta, mediante la orientación con claves espaciales dispuestas en dos de las paredes. En las esquinas de la pecera (y detrás de los compartimentos de inicio), se ubican dos recintos delimitados por barreras de vidrio donde se colocaron conespecíficos (dos por recinto), a modo de recompensa. En cada trial, el individuo fue colocado en uno de los compartimentos de inicio y, una vez que se encontraban en la arena central, se registró la primer decisión del individuo: si salía por la salida abierta se lo consideraba un acierto, y si chocaba contra la pared de vidrio, una falla. B. Vista superior de la pecera experimental.

Para estudiar la performance del pez cebra en este paradigma comportamental, se adaptó el dispositivo romboidal originalmente desarrollado para pez dorado (Ingle y Sahagian, 1973). Dicho dispositivo, ubicado dentro de una pecera cuadrada,

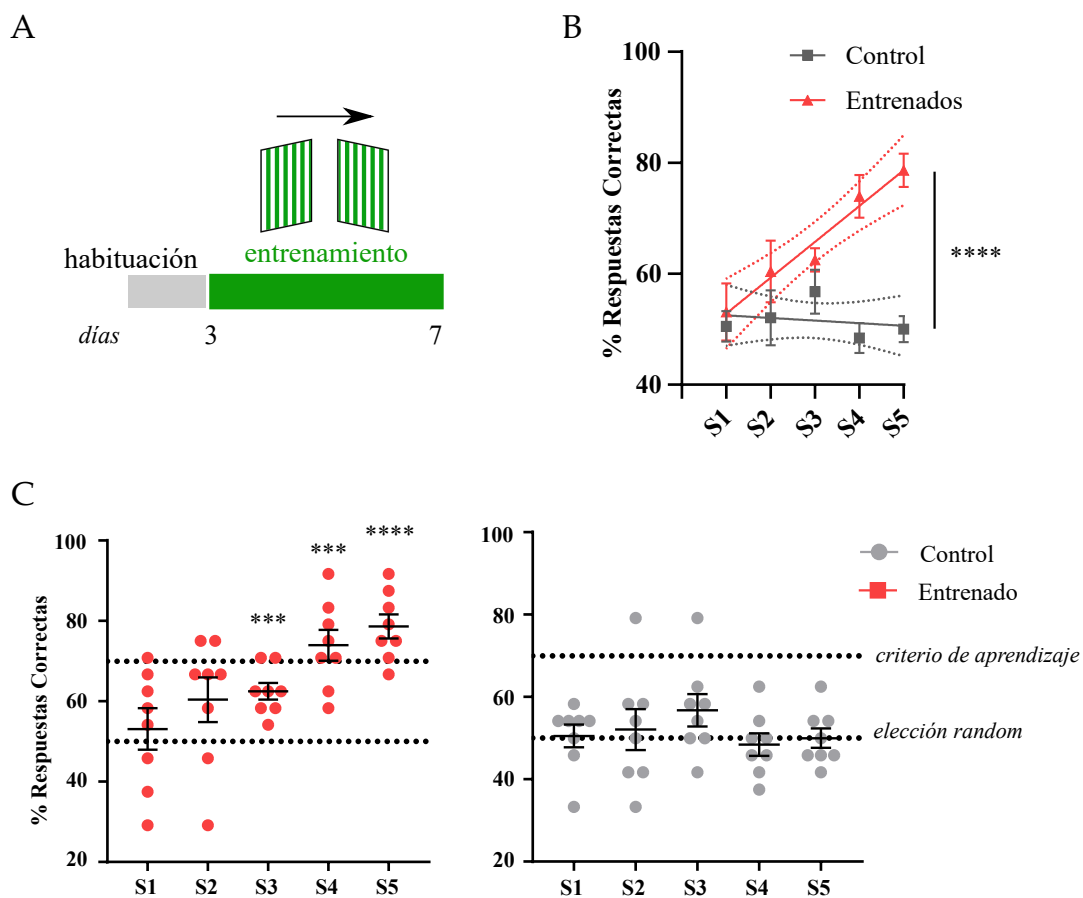


Figura 2.10: A. Cronograma Experimental. Los individuos fueron habituados a la pecera experimental durante dos días, luego de lo cual recibieron el entrenamiento durante cinco días consecutivos. Cada sesión diaria consistió de 24 trials. Las claves utilizadas y dirección de la salida vistas de frente están indicadas arriba del cronograma. B. Regresión lineal simple para las curvas de aprendizaje de Entrenados y Controles (ANCOVA, $F_{(1,77)}=9.010$. **** indica $p<0.0001$). Las líneas punteadas indican intervalo de confianza del 95%. C. Gráficos de dispersión de la performance durante la realización de la SCT para individuos Entrenados (*izquierda*) y Controles (*derecha*). Los peces Entrenados muestran diferencias significativas respecto de la *elección random* a partir de la S3 (t de Student de una muestra, S1: $t_{(7)}=0.6070$, S2: $t_{(7)}=1.871$, S3: $t_{(7)}=6.000$, S4: $t_{(7)}=6.243$, S5: $t_{(7)}=9.574$, *** indica $p<0.001$, **** $p<0.0001$, $N=8$). Los Controles no difieren significativamente de la *elección random* en ninguna de las sesiones (t de Student de una muestra, S1: $t_{(7)}=0.1876$, S2: $t_{(7)}=0.4183$, S3: $t_{(7)}=1.722$, S4: $t_{(7)}=0.5743$, S5: $t_{(7)}=0.000$, n.s., $N=8$).

presenta una arena central con dos compartimentos de entrada al mismo y dos salidas, una de las cuales está bloqueada por una barrera de vidrio transparente (Figura 2.9). En dos de las paredes de la arena central se ubican claves espaciales que le permiten al individuo orientarse para encontrar la salida correcta. Para estimular la salida de los individuos del dispositivo, se colocaron conespecíficos en las esquinas de la pecera, a modo de *recompensa social*.

El entrenamiento consistió de sesiones diarias de 24 pruebas/trials cada una. En

cada trial, el individuo fue colocado en alguno de los compartimentos de entrada, en forma pseudorandom. Una vez en la arena, se registró la primer decisión del individuo: si salía por la salida abierta se lo consideraba un acierto, y si chocaba contra la pared de vidrio, una falla. De manera que la variable utilizada para evaluar el aprendizaje fue el porcentaje de respuestas correctas durante cada sesión diaria.

Inicialmente, se realizó un entrenamiento que consistió en 5 sesiones diarias (S1-S5), con dos sesiones de habituación al dispositivo, previas a S1 (Figura 2.10.A). En las primeras sesiones (S1 y 2) los individuos obtuvieron porcentajes cercanos al 50% de aciertos (media \pm ES=53.13 \pm 5.15 y 60.42 \pm 5.57, respectivamente), que no fueron significativamente distintos a una decisión random (t de Student de una muestra, $H_0: \mu=0.5$, $t=0.607$, $p=0.5630$ y $t=1.871$, $p=0.1036$, respectivamente). A partir de la S3 la distribución de los datos difiere significativamente de la línea random, y se mantiene en los días sucesivos (t de Student de una muestra, $t=6.0$, $p=0.0005$). Finalmente, luego de 5 días de entrenamiento, se observa que todos los individuos superan el criterio de aprendizaje (70% de respuestas correctas), y obtienen un promedio del $\sim 80\%$ en S5 (media_{S5} \pm ES= 78.65 \pm 2.992, N=8) (Figura 2.10.B, D).

Para descartar que la orientación se deba a la percepción de la barrera de vidrio transparente, y no las claves espaciales, se entrenó un grupo Control que recibió las mismas condiciones que el grupo Entrenado, con la excepción de que la barrera de vidrio era colocada en forma random en alguna de las dos salidas. Los resultados muestran que los Controles no superan el criterio de aprendizaje en ninguna de las sesiones, y en ningún caso son significativamente distintos de la decisión random (media_{S5} \pm ES= 50.00 \pm 2.362, N=8) (Figura 2.10.B, D). En la Figura 2.10. C se pueden observar las curvas de la regresión lineal para las medias de cada sesión de aprendizaje, en donde se evidencia claramente la mejora progresiva de la *performance* de los individuos Entrenados a lo largo de las sesiones, mientras que la pendiente de la curva de los Controles es prácticamente 0. De esta manera, se puede afirmar que el aprendizaje se debe exclusivamente a la orientación con las claves, y no a una posible detección de la barrera de vidrio (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto del tratamiento: $F_{(1,14)}=25.78$, $p=0.0002$, efecto de

la sesión: $F_{(4,56)}=3.422$, $p=0.0143$).

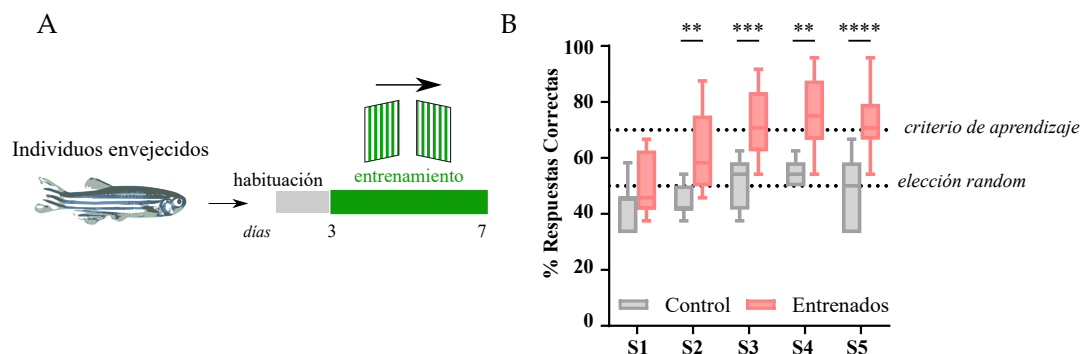


Figura 2.11: A. Cronograma Experimental utilizando peces cebra de 21 meses de edad (envejecidos). B. Curvas de aprendizaje para peces Entrenados y Controles (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto del tratamiento: $F_{(1,12)}=25.68$, efecto de la sesión: $F_{(4,48)}=7.317$, seguido de prueba post hoc de Fisher, ** indica $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

Es sabido que la senescencia típicamente conlleva un deterioro cognitivo, y de hecho hay varios estudios en pez cebra que lo demuestran (Adams y Kafaligonul, 2018; Ruhl y col., 2017; Yang y col., 2017). Por lo tanto, se decidió realizar el protocolo de aprendizaje en animales envejecidos (21 meses de edad), para probar su capacidad de aprendizaje de la SCT. Como se observó para los adultos jóvenes, los individuos senescentes también muestran una curva de aprendizaje, mejorando notoriamente su performance a lo largo de las sesiones de aprendizaje (Figura 2.11 B). Esto muestra que los individuos envejecidos mantienen la capacidad de aprender la tarea de SCT a lo largo de 5 sesiones consecutivas.

Considerando todos estos resultados, se decidió utilizar este paradigma comportamental para los experimentos subsiguientes.

3. Discusión y Conclusiones

La capacidad de orientarse en el espacio es un rasgo primitivo, altamente conservado a lo largo de la evolución, necesario para poder llevar a cabo las funciones básicas de un individuo. Si bien la gran mayoría de los estudios avocados al aprendizaje espacial se centran en los mamíferos, en las últimas décadas se han comenzado a realizar estudios en otros grupos de vertebrados, permitiendo así ampliar el conocimiento a nivel filogenético, y trazar lazos comparativos entre especies.

En teleósteos se han adaptado y/o modificado tareas que habitualmente se realizan en roedores, como el laberinto en cruz o *plus maze* (Broglia y col., 2010; Salas y col., 2006; Sison y Gerlai, 2010), campo abierto u *open field* (Karnik y Gerlai, 2012), tablero de agujeros o *hole-board maze* (Durán y col., 2008), etc. En esta Tesis, inicialmente, se sometió a los peces a una tarea de Reconocimiento de Objetos Novedosos. Este paradigma, introducido por primera vez por Ennaceur y Delacour (Ennaceur y Delacour, 1988), se encuentra ampliamente utilizado en mamíferos, ya que permite estudiar memoria episódica, una función cognitiva dependiente del hipocampo, la cual suele verse alterada en ciertos desórdenes neuropsiquiátricos. En roedores posee una alta reproducibilidad, dado que existe un consenso respecto de la respuesta neofílica de los individuos al estímulo novedoso.

Sin embargo, en teleósteos, si bien se han realizado múltiples intentos por establecer un paradigma de reconocimiento de objetos que permita estudiar memoria en peces, se ha visto que la respuesta de los individuos es altamente variable (resumen en Tablas 2.1y 2.2). Esto puede deberse a varios factores. Por un lado, la enorme variabilidad de tiempos y protocolos utilizados necesariamente genera una asimetría en las respuestas evaluadas. Si bien en la mayoría de los casos la respuesta que reportan los autores es neofílica, con estos antecedentes no es posible asegurar que este protocolo sea reproducible. Por otra parte, es necesario tener en cuenta el tamaño, forma y, sobre todo, el color de los objetos utilizados. Como se mencionó anteriormente, diversos trabajos estudian la preferencia de color en pez cebra. En éstos estudios testean preferencia por colores de los ambientes presentados (no de objetos) y encuentran preferencia por los contextos azules (Bault y col., 2015; Oliveira y col., 2015; Peeters y col., 2016) y verdes (Oliveira y col., 2015), los cuales se contraponen con resultado de Avdesh y colaboradores (Avdesh y col., 2012) que muestran una aversión por los ambientes azules y una clara preferencia por los rojos/verdes. En esta misma línea se encuentra el trabajo de Faillace y colaboradores (Faillace y col., 2017) (ver Tabla 2.2), el único de los trabajos de NOR en peces que busca discriminar preferencia de colores en objetos presentados, en el cual observan un mayor tiempo de exploración de objetos rojos y verdes por encima de los azules y amarillos. Por otra parte, tampoco es despreciable el efecto del aprendizaje en la

preferencia de color, que pudiera estar dado, por ejemplo, por el color del alimento que consumen normalmente en su dieta. Al respecto, Spence y Smith (Spence y Smith, 2008) estudiaron la preferencia de color en individuos condicionados a dietas de diferentes colores. En todos los casos, se observa una preferencia por el color rojo, mostrando una preferencia innata por este color. Por lo tanto, una gran parte de la variabilidad observada podría ser adjudicada a la disparidad en los objetos utilizados en cada trabajo.

En este caso, tampoco se pudo demostrar una respuesta neofílica o neofóbica al objeto novedoso, ni siquiera aumentando el número de sesiones realizadas. De manera que se modificó el protocolo para forzar la preferencia del pez con una recompensa alimenticia, a lo largo de varios días. En el caso de los peces obtenidos en un acuario local, es decir, que no poseen un *background* genético estandarizado, este protocolo logró consolidar una memoria, dado que se observó una preferencia por el estímulo novedoso en el test de MLP. Sin embargo, al aplicar el mismo cronograma a peces de la línea AB *wild-type*, se vio que este resultado no fue reproducible. Esto evidencia una variabilidad comportamental dependiente del trasfondo genético del individuo. El efecto de la endocruza y la consecuente disminución de la variabilidad geno-fenotípica en cepas de laboratorio puede ser el motivo del impedimento de la cepa AB *wild-type* para el aprendizaje de la tarea.

Por otro lado, varios estudios también señalan la existencia de variabilidad inter e intrapoblacional en pez cebra, particularmente en comportamientos de agresividad y audacia o *boldness* (Moretz y col., 2007; Wright y col., 2006; Wright y col., 2003). Se ha visto que diferentes poblaciones naturales presentan distinta predisposición por la exploración de objetos nuevos y muestran que existe un componente genético para este tipo de comportamiento. Incluso también comparan con líneas de laboratorio, evidenciando que la audacia o *boldness* es sensiblemente más baja en estos individuos que en los recolectados en ambientes naturales (Wright y col., 2006; Wright y col., 2003).

Los resultados aquí presentados, en este contexto son, entonces, esperables y muestran que es necesario establecer un paradigma diferente para poder estudiar aprendizaje en peces, que se ajuste específicamente a la variabilidad comportamental

de la población o línea utilizada.

Se decidió, entonces, testar a los peces en un tarea diferente, denominada de *constancia espacial*. Este paradigma, inicialmente descrito por Ingle y Sahagian (Ingle y Sahagian, 1973) para pez dorado (*Carassius auratus*), propone la orientación de los individuos en una arena romboidal, a partir de claves que diferencian dos de las cuatro paredes del recinto, con un dado patrón de rayas. El desafío de esta tarea es aún mayor cuando consideramos que el pez no sólo debe enfrentarse a la decisión de girar a izquierda o derecha cuando observa las claves, sino también interpretar que el hecho de ingresar a la arena y no observar las claves (es decir, salir por el compartimento de inicio con las claves hacia atrás), es una señal que deben entender para decidir la correcta localización de la salida. De esta manera, se evitan posibles respuestas de giro egocéntricas, y se puede asegurar que los individuos están efectivamente decidiendo la dirección de nado en función de la posición de las claves. Otra característica interesante de este paradigma es que la motivación que se presenta al individuo para la realización de la tarea es la presencia de conespécíficos, los cuales sólo son visibles cuando el pez sale del dispositivo experimental. Esta forma de recompensa es una opción superadora respecto del alimento. Esto se debe a que, por un lado, no existe el fenómeno de "saciedad", que sí puede ocurrir con el alimento. Por ejemplo, se ha visto que en una tarea de discriminación visual, los peces que son recompensados con comida se sacían rápidamente, y dejan de sentirse motivados por la tarea, mientras que los que anticipan una recompensa social, mantienen la atención durante muchos más trials (Daggett y col., 2019). En este trabajo, de hecho, se realizó un protocolo comportamental de hasta 15 sesiones en el cuales los individuos mostraron una motivación sostenida. Por otra parte, esta modalidad evita una posible orientación dada por señales olfativas, y una consecuente malinterpretación del comportamiento.

En pez dorado, los primeros resultados reportados muestran que todos los individuos alcanzan un criterio de 90% de respuestas correctas al cabo de 2-3 días de entrenamiento (realizando de 20-30 trials por día). Este paradigma fue posteriormente retomado por el grupo de Salas (López y col., 2000), quienes reportan una performance similar para la especie: luego de 3 días de entrenamiento (de 25

trials diarios), los individuos alcanzan entre 80-90% de respuestas correctas. En pez cebra, si bien se han realizado algunos estudios, de comportamiento en tareas espaciales, este paradigma no había sido testeado. Los resultados exhibidos en el presente Capítulo muestran que, si bien los peces son capaces de orientarse correctamente, la curva de aprendizaje es más lenta que en el pez dorado: demoran unos 5 días en alcanzar un 80% de respuestas correctas.

En conclusión, se logró demostrar la capacidad de aprendizaje de la línea AB *wild-type* del pez cebra en un paradigma de constancia espacial, con un protocolo sencillo del que se obtienen resultados reproducibles que, a la vez, representa una novedad para esta especie.

Capítulo II. Aprendizaje Espacial y Neurogénesis Adulta en Pez Cebra

1. Introducción

1.1. Progenitores Neuronales en Telencéfalo de Teleósteos

La plasticidad cerebral le permite a los circuitos neuronales adaptarse a las demandas y estímulos externos, promoviendo la habilidad de hacer frente a los desafíos del medio ambiente. La neurogénesis adulta constituye una gran fuente de plasticidad que, a diferencia de las restantes formas, implica la incorporación de nuevas unidades computacionales a los circuitos. (Mongiat y Schinder, 2011; Sailor y col., 2016; Toda y col., 2017).

Como se mencionó anteriormente, en mamíferos uno de los únicos sitios (y el único para los primates) en donde sigue habiendo incorporación de nuevas neuronas en la adultez es el hipocampo, estructura involucrada en la representación espacial y la memoria episódica. Interesantemente, se ha visto que la realización de tareas dependientes del hipocampo provocan un incremento en el número de neuronas nuevas que se integran en el giro dentado del hipocampo (Gould y col., 1999; Kempermann, 2002; Leuner y col., 2006. Incluso se ha visto que esta relación es bidireccional, dado que modulando la tasa de neurogénesis adulta, también se genera un impacto en la *performance* de la tarea cognitiva.

En resumen, una vasta literatura demuestra la importancia de la neurogénesis adulta en el hipocampo de mamíferos, siendo éste un proceso que puede regular

la función del hipocampo, y viceversa. A pesar de ello, los mecanismos y tiempos de modulación no están claros. Si bien no está robustamente demostrado, en el campo de la neurogénesis adulta numerosas evidencias sostienen que los procesos de proliferación y maduración neuronal se correlacionan positivamente con la *actividad eléctrica del circuito*. De esta manera, la realización de comportamientos que involucran la activación del hipocampo incrementan, en consecuencia, la tasa de neurogénesis adulta.

Como se mencionó en la *Introducción General*, en teleósteos, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, la neurogénesis adulta se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del eje rostro-caudal, generando una variedad de subtipos neuronales (Adolf y col., 2006; Grandel y col., 2006; Strobl-Mazzulla y col., 2010; G. K. H. Zupanc y Sîrbulescu, 2011). Una de las principales regiones donde se ha estudiado la neurogénesis adulta es el telencéfalo dorsal, o *pallium*. En contraste con otros vertebrados, el telencéfalo de los teleósteos (y de los actinopterigios, en general) presenta un desarrollo por eversión del tubo neural (Folgueira y col., 2012). En consecuencia, ambos hemisferios del *pallium* están separados por un ventrículo en forma de "T". Rodeando el ventrículo, en la llamada *zona periventricular*, se localizan los progenitores neuronales (NPs) (ver Figura 1.1)(Adolf y col., 2006; Grandel y col., 2006).

En este punto, cabe hacer una aclaración de términos. Por definición, las células madre o *stem cells* son células, como mínimo bipotentes, capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas y que además poseen la capacidad de autorrenovación (Gilbert, 2003). Es decir, son capaces de divisiones asimétricas, las cuales tienen como resultado una nueva célula madre y una célula con un mayor grado de diferenciación. Por otra parte, existe el término progenitor neuronal (NPs), que se usa de manera más amplia, ya que se utiliza para describir (a) progenitores con un destino neuronal definido, (b) a células neurogénicas cuyo potencial de autorrenovación no está determinado o (c) para referirse en forma conjunta a células con capacidad neurogénica (NSCs + NPs) (Labusch y col., 2020). De aquí en adelante, se empleará esta última acepción del término NP, para hacer referencia en forma general a la población de células con capacidad neurogénica, y se utilizará NSC,

para las células que cumplen estrictamente con la condición de multipotencialidad.

Análisis clonales en NSCs de individuos adultos sugieren un modelo en el cual la autorrenovación y la multipotencialidad se dan a un nivel *poblacional*. Es decir, las células pueden realizar divisiones de tipo simétricas (para amplificar y asegurar el mantenimiento del pool de NSCs) o divisiones asimétricas (de diferenciación) de manera estocástica. Se ha visto que las NSCs ubicadas en el sistema nervioso no son la excepción a este modelo, y exhiben también esta "asimetría poblacional" (Rothenaigner y col., 2011; Than-Trong y col., 2020). Si se adopta un fenotipo neuronal, entonces estas nuevas neuronas migran radialmente unas pocas micras hacia adentro del parénquima del *pallium*, maduran y se integran en circuitos pre-existentes (Grandel y col., 2006; Lange y col., 2020; Rothenaigner y col., 2011). Este proceso neurogénico lleva a una estructura en la cual las neuronas generadas en el desarrollo temprano se posicionan en el centro del *pallium*, mientras que las formadas durante la adultez establecen un gradiente de nuevas neuronas, en donde las neuronas más recientes se ubican en estratos más cercanos a la zona periventricular (Furlan y col., 2017).

Los NPs en la región periventricular han sido categorizadas como de tipo I (glía radial quiescente), tipo II (glía radial en división) o tipo III (progenitores no gliales en división) (Chapouton y col., 2010; März y col., 2010) (Figura 3.1). Un estudio en el que se realizó un análisis clonal de NPs mediante el uso de vectores virales, verificó esta clasificación y se vio que los progenitores podían dividirse en dos categorías: (a) neuroblastos que inicialmente transitan una etapa de amplificación y luego pasan a una fase neurogénica de divisiones simétricas (o tipo III), y (b) glía radial, también consideradas "verdaderas células madre neurales", similares a las NSCs de mamíferos (tipo I y II). (Rothenaigner y col., 2011). Estas últimas representan la población más abundante de la zona periventricular ($\sim 90\%$), mientras que la mayor proporción de las neuronas nuevas generadas se originan a partir de progenitores en un estado más diferenciado ($\sim 56\%$) provenientes de neuroblastos (o NPs tipo III). Más aún, se observó que las neuronas nuevas demoran entre 4-8 semanas en integrarse funcionalmente en los circuitos locales, siendo este el único trabajo que reporta un tiempo estimado de maduración en teleósteos.

2010; Elliott y col., 2017; Portavella y col., 2004; von Trotha y col., 2014). Estos trabajos sugieren que la región dorso-lateral (*lateral pallium*, LP) es homóloga al hipocampo, mientras que la región dorso-medial (*medial pallium*, MP) es homóloga a la amígdala basolateral de los mamíferos.

La región LP del telencéfalo, dada su homología con el hipocampo de mamíferos, es señalada como estructura candidata para el procesamiento espacial. Se ha demostrado que lesiones en la región LP del telencéfalo perjudican notablemente la capacidad de aprendizaje espacial (Broglia y col., 2010; Portavella y col., 2003; Portavella y col., 2004; Rodríguez y col., 2002). También se ha visto que existe una correlación entre el aumento de la actividad de síntesis proteica en LP y la *performance* en aprendizaje espacial, medido mediante estimación de la actividad transcripcional con tinción argéntica (AgNOR) de proteínas asociadas a las regiones organizadoras nucleolares (NORs) (Broglia y col., 2010; Durán y col., 2010; Vargas y col., 2000). Asimismo, un estudio comportamental similar realizado en el cíclido *Astatotilapia burtoni* demostró que el aprendizaje espacial induce un rápido incremento en la expresión del gen inmediato temprano (*egr-1*) y de la neurotrofina *bdnf* en la región LP, incremento no observado en peces que no completan el aprendizaje (Wood y col., 2011). Otros estudios basados en el empleo de bloqueantes de receptores neuronales mostraron que el suministro de antagonistas del receptor NMDA en la región LP afecta negativamente en la formación de la memoria espacial, tanto en el pez cebra como en el pez dorado (Blank y col., 2009; Gómez y col., 2006). Es decir, que en el LP se requieren fenómenos de plasticidad sináptica mediada por receptores NMDA para procesar la información ambiental y consolidar la memoria, al igual que el hipocampo de los mamíferos. Todas estas investigaciones demuestran que existe una correlación entre la representación del espacio y la capacidad de navegación, y la región LP del telencéfalo, y que esta función sería homóloga al hipocampo de los mamíferos, el cual es fundamental para la construcción de mapas espaciales y la orientación en el espacio.

Por otra parte, se ha mostrado que existe una correlación entre la pérdida de la capacidad de resolver ensayos de evitación de estímulos negativos y lesiones en la región del MP. Estudios en pez dorado mostraron que la ablación de la región

MP afecta selectivamente el aprendizaje de los individuos cuando se les presenta el estímulo aversivo, mientras que el daño en la región LP no altera el rendimiento en este tipo de protocolos (Portavella y col., 2003; Portavella y col., 2004). Una serie de experimentos realizados por Okamoto y col. han descripto la participación de MP en respuesta al comportamiento de freezing en paradigmas de condicionamiento por miedo, y en resolución de conflictos de agresión social (Agetsuma y col., 2010; Chou y col., 2016). Asimismo, han mostrado la activación específica de la región dorso-central, utilizando registros *in vivo* de la dinámica de calcio intracelular, como resultado de la evocación de memorias de largo plazo en un paradigma de evitación activa (Aoki y col., 2013). Todos estos autores han relacionado la función de esta región con la amígdala de los tetrápodos, la cual justamente se encuentra relacionada al aprendizaje a partir de sucesos emocionales y la consolidación de la memoria.

En resumen, estos estudios demuestran la existencia de regiones en el telencéfalo funcionalmente diferentes, que son fundamentales tanto para la adquisición y ejecución de distintas funciones cognitivas, como para la consolidación de la memoria. La presencia de zonas especializadas en el análisis de estímulos ambientales para la navegación espacial, el aprendizaje emocional y la generación de memorias a largo plazo serían rasgos primitivos que se han conservado a lo largo de la evolución (Mueller y Wullimann, 2009; Salas y col., 2006), y que pueden ser consideradas importantes herramientas para el estudio comparativo de modelos de aprendizaje animal.

En roedores, es sabido que la ejecución de distintos paradigmas comportamentales dependientes del hipocampo aumentan la sobrevida de neuronas inmaduras en individuos adultos (Aasebø y col., 2018; Anderson y col., 2011; Lledo y col., 2006). Estos estudios sugieren que la neurogénesis adulta juega un rol relevante en la estructuración de los circuitos neuronales durante el aprendizaje. Sin embargo, este rol de la neurogénesis no ha sido explorado aún en teleósteos. Por lo tanto, el objetivo principal del presente Capítulo es mostrar cómo la activación de regiones específicas dada por el aprendizaje durante la SCT lleva al remodelado circuital por neurogénesis adulta en dichas regiones.

2. Resultados

2.1. Proliferación Celular inducida por SCT

Estudios previos en pez dorado reportaron que el aprendizaje en SCT induce el aumento selectivo de la actividad metabólica en el LP de individuos entrenados (Durán y col., 2010; Ocaña y col., 2017; Uceda y col., 2015). Por lo tanto, bajo la hipótesis de que la actividad circuital en los nichos neurogénicos promueve la proliferación, el objetivo fue probar si el aprendizaje en esta tarea tendría algún efecto sobre la división celular. Como se mencionó en el *Capítulo I, Sección 2.2*, es importante resaltar que el tratamiento Control está sujeto a las mismas manipulaciones y condiciones ambientales que los individuos Entrenados. Por lo tanto, cambios en la proliferación sólo pueden ser adjudicados al proceso de aprendizaje.

Para evaluar la actividad mitótica de NPs, se sometió a peces adultos a un cronograma de 5 sesiones consecutivas de entrenamiento, luego de lo cual se determinó la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) a lo largo del eje rostro-caudal del telencéfalo (Figura 3.2 A). El antígeno PCNA es una proteína nuclear, asociada al complejo de la ADN Polimerasa, enzima vital para la replicación del ADN. La detección de esta molécula permite identificar células en las fases S y G2 mitóticas. Para el estudio rostro-caudal, se tomaron 4 secciones equidistantes a lo largo del eje anteroposterior correspondientes a las secciones coronales 71, 92, 107, 114 del *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas* (Wullimann y col., 1996) (Figura 3.2 B). Para mayor detalle, ver Figura 7.1 en *Apéndice*.

Todas las células PCNA⁺ se encontraron distribuidas a lo largo de la región periventricular, sitio donde se localizan los NPs, y se registraron aumentos en la tasa de proliferación de los mismos en regiones muy acotadas del eje rostro-caudal (Figura 3.3 A y C). En línea con la hipótesis de trabajo, se encontró un incremento en la detección de PCNA en LP respecto de los Controles, aunque la misma se vio restringida a la región caudal con un aumento del $\sim 250\%$ para cLP. En las regiones rostral y rostro-medial se registran valores bajos de proliferación.

Sorprendentemente, también se observó un aumento significativo en los niveles

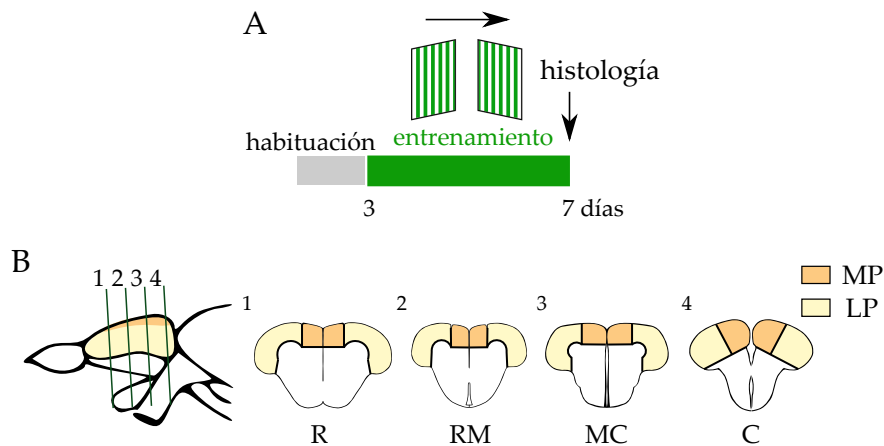


Figura 3.2: A. Cronograma experimental. Los individuos fueron habituados al aparato experimental y sucesivamente entrenados durante 5 sesiones consecutivas. Al finalizar, fueron sacrificados para el análisis histológico. B. Izquierda: Vista esquemática del encéfalo anterior del pez cebra, indicando la posición de las secciones coronales a la derecha. Derecha: Secciones coronales del telencéfalo de pez cebra a lo largo del eje rostro-caudal (R: rostral, RM: rostro-medial, MC: medio-caudal, C: caudal). Las regiones coloreadas indican MP y LP.

de PCNA en la región rostral del MP (rMP, $\sim 180\%$ de aumento respecto del tratamiento Control). Para las alturas restantes (rostro-medial, medio-caudal, caudal) la tasa de proliferación disminuye aproximadamente a la mitad en los Entrenados, y no se registran diferencias con el grupo Control.

Por lo tanto, estos resultados muestran una distribución antero-posterior diferencial de las células PCNA⁺ en peces Entrenados, siendo más abundante en rMP y desplazándose hacia el cLP.

2.2. Neurogénesis Adulta inducida por SCT

La neurogénesis adulta es un fenómeno plástico que puede ser modulado por la actividad eléctrica de los circuitos neuronales a diferentes niveles, ya sea la proliferación de los NPs, migración diferenciación y sobrevivencia de nuevas neuronas. Sin embargo, el rol de la actividad cognitiva sobre la modulación de la neurogénesis adulta no ha sido explorada en pez cebra. Por otra parte, bajo la hipótesis de que la actividad circuital sostenida es necesaria para la proliferación, maduración y migración de nuevas neuronas, resulta imprescindible poder realizar protocolos sostenidos en el tiempo, que aseguren un constante desafío cognitivo para el animal. Por lo tanto, en este Capítulo se buscó probar si la actividad neuronal sostenida, desencadenaba

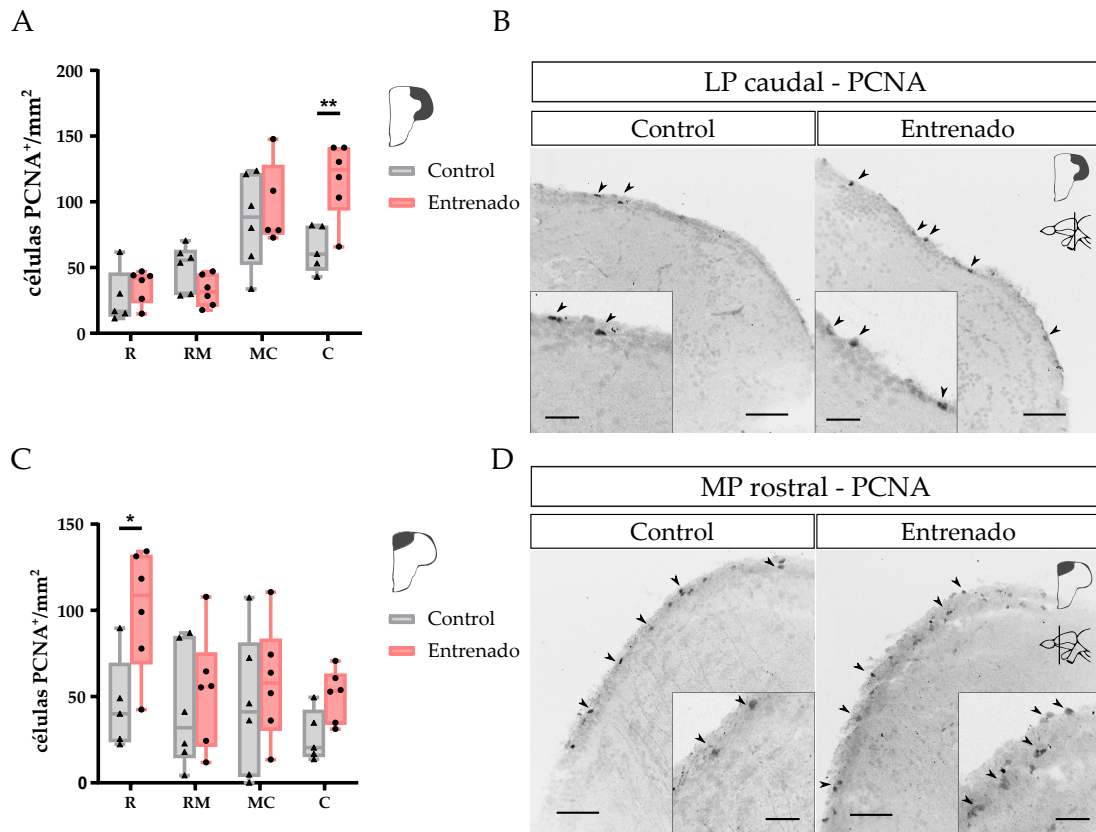


Figura 3.3: A. Células PCNA⁺ en LP. (ANOVA de dos vías, seguido de test post-hoc de Bonferroni, efecto del Tratamiento $F_{(1,37)} = 3.873$, efecto de la región del *pallium*: $F_{(3,37)} = 20.27$, ** indica $p < 0.01$. Entrenado, N = 6; Control, N = 6). B. Secciones coronales del pallium telencefálico con inmunodetección para PCNA en el cLP de individuos Control y Entrenados. Escala, 50 μm . Escala en magnificaciones, 20 μm . Las flechas negras indican células PCNA⁺ representativas. C. Células PCNA⁺ en MP. (ANOVA de dos vías, seguido de test post-hoc de Bonferroni, efecto del Tratamiento $F_{(1,38)} = 7.796$, efecto de la región del *pallium*: $F_{(3,38)} = 2.332$, * indica $p < 0.05$. Entrenado, N = 6; Control, N = 6). D. Secciones coronales del pallium telencefálico con inmunodetección para PCNA en el rMP de individuos Control y Entrenados. Escala, 50 μm . Escala en magnificaciones, 20 μm . Las flechas negras indican células PCNA⁺ representativas.

denada como consecuencia del aprendizaje impacta sobre las neuronas inmaduras para promover el remodelado circuital del *pallium*.

Para poder abordar este interrogante, se realizó una marcación de progenitores neuronales en individuos adultos mediante inmersión durante 24hs en bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de timidina. Con el objetivo de analizar el impacto del aprendizaje sobre neuronas en proceso de maduración, se buscó una ventana temporal en la cual las nuevas neuronas fueran susceptibles a inputs sinápticos. Por lo tanto, se dejó que las células marcadas con BrdU se desarrollaran durante 12 días. Luego de ello, los peces fueron separados en dos grupos (Entrenados vs. Controles)

y sujetos a un aprendizaje sostenido en el laberinto romboidal desde 12 a 30 días post-inmersión (dpi), un período que estimamos que las neuronas aún se encuentran madurando. La ventana de tiempo hasta el inicio del aprendizaje (12 días) fue elegida en base a un estudio de conectividad de neuronas en pez cebra que reporta que las nuevas neuronas en el telencéfalo tardan entre 4-8 semanas en integrarse a circuitos locales (Rothenaigner y col., 2011). Dado que este es el único trabajo que refiere a los tiempos de maduración e integración, los cuales aun no han sido determinados con precisión para esta especie, se consideró un tiempo prudencial de 12 días luego de la marcación, con el objetivo de estudiar el impacto del aprendizaje durante un período en el cual las nuevas neuronas recibieran inputs sinápticos.

Por otra parte, es posible que el aprendizaje de una regla a lo largo de varias semanas deje de representar un desafío para el individuo (sobre todo considerando que alcanzan un 80 % de respuestas correctas luego de 5 días de entrenamiento) y no se pueda sostener la actividad del circuito durante el período de maduración. Por lo tanto, con el objetivo de mantener el desafío cognitivo en el tiempo, se diseñó un protocolo en el cual tanto el color y patrón de las claves espaciales como la localización de la salida fueron cambiadas semana a semana, con un intervalo entre cada bloque de entrenamiento de dos días (Figura 3.4 A).

De manera similar a lo observado en el capítulo anterior, en el primer bloque de entrenamiento los individuos muestran una diferencia estadísticamente significativa respecto de la *elección random* a partir de S2 (t de Student de una muestra, $t_{(7)}=5.557$, $p=0.0009$), llegando a un promedio de 76.56 % de respuestas correctas hacia S5 (Figura 3.4 B). Luego del cambio de regla y claves, la *performance* de S6 baja a los niveles iniciales (S1), pero se observa que rápidamente se adaptan a las nuevas condiciones ambientales en S7 (t de Student de una muestra, $\mu_0=50$, $t_{(7)}=5.376$, $p=0.0010$), logrando un promedio mucho más elevado al finalizar el segundo bloque de entrenamiento ($\text{media}_{S10} \pm \text{ES}=91.15 \pm 2.66$). Finalmente, al modificar nuevamente las claves y localización de la salida, se observa nuevamente que los individuos comienzan la segunda semana de entrenamiento en valores cercanos al 50 %, pero llegan al final del entrenamiento a un promedio de 90.1 % de respuestas correctas. Esto muestra que sucesivas exposiciones a una regla y claves

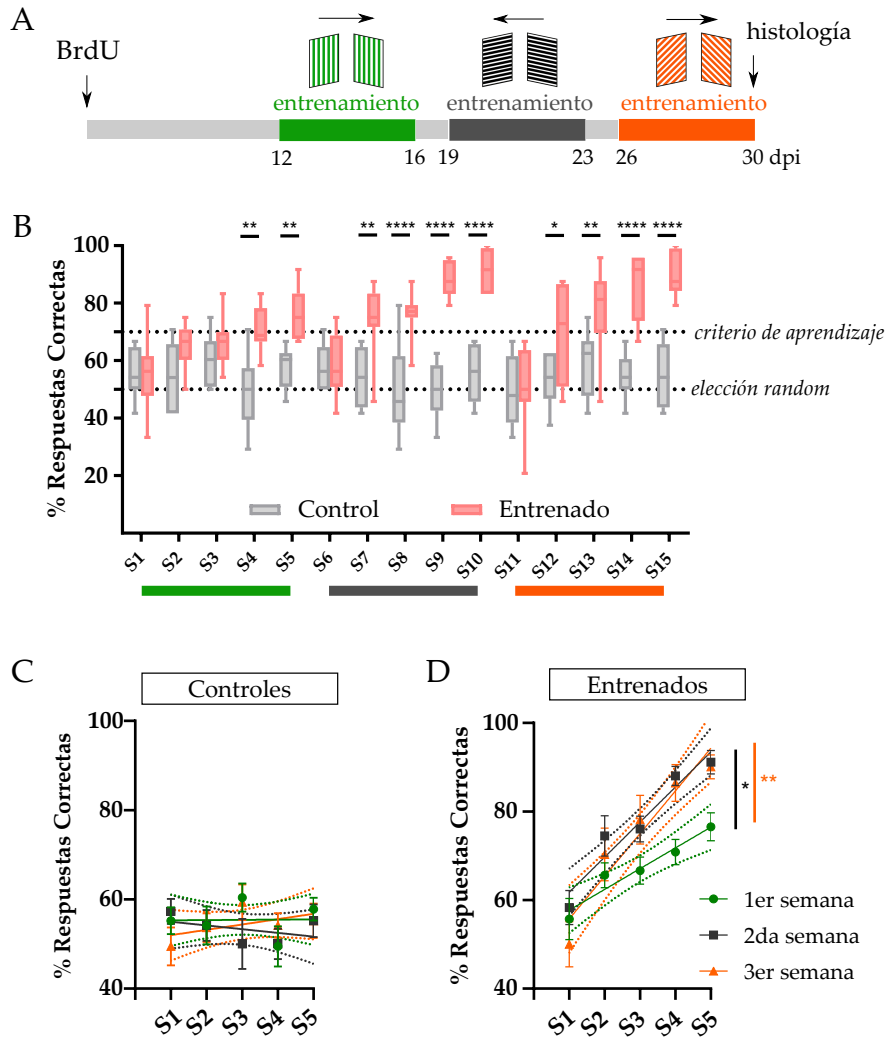


Figura 3.4: A. Cronograma Experimental. Los individuos fueron entrenados durante 15 días, separados tres bloques de 5 sesiones cada uno. Cada 5 sesiones, las claves espaciales y dirección de la salida fueron cambiadas, como se indica arriba del cronograma. Cada bloque de entrenamiento está separado por un intervalo de 48 hs. B. Curvas de aprendizaje para peces Entrenados y Controles. (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto del tratamiento: $F_{(1,14)}=67.76$, efecto de la sesión: $F_{(14,196)}=6.804$, seguido de prueba post-hoc de Bonferroni, * indica $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$, $N=8$ para cada tratamiento). C. Regresión lineal simple para las curvas de aprendizaje individuos Control a lo largo de las semanas de aprendizaje (ANCOVA, 1era vs. 2da semana: $F_{(1,76)}=0.2748$, n.s.; 1era vs. 3era semana: $F_{(1,76)}=0.4916$, n.s., $N=8$ para cada tratamiento). D. Regresión lineal simple para las curvas de aprendizaje individuos Entrenados a lo largo de las semanas de aprendizaje (ANCOVA, 1era vs. 2da semana: $F_{(1,76)}=4.647$, * indica $p<0.05$; 1era vs. 3era semana: $F_{(1,76)}=7.068$, ** indica $p<0.01$. $N=8$ para cada tratamiento). Las líneas punteadas indican intervalo de confianza del 95%.

novedosas los individuos aprenden con mayor rapidez respecto de la primer configuración espacial a la que fueron expuestos ($\text{media}_{S5} \pm \text{ES}=76.56 \pm 3.14$, $\text{media}_{S10} \pm \text{ES}=91.15 \pm 2.66$, $\text{media}_{S15} \pm \text{ES}=90.10 \pm 2.72$) (Figura 3.4 D). Para los Controles,

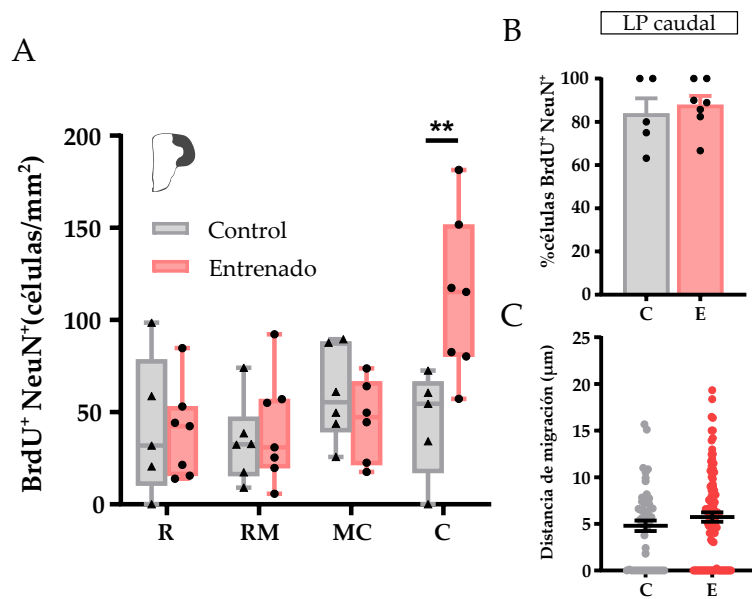


Figura 3.5: A. Células BrdU/NeuN en LP. (ANOVA de dos vías, seguido de test post-hoc de Bonferroni, efecto del Tratamiento $F_{(1,41)} = 2.766$, efecto de la región del *pallium*: $F_{(3,41)} = 4.493$, ** indica $p < 0.01$, Entrenado, $N = 7$; Control, $N = 6$). B. Diferenciación a fenotipo neuronal (% células BrdU⁺NeuN⁺) en LP caudal. (t test no apareado, $t_{(10)} = 0.5091$, n.s., Entrenado, $N = 7$; Control, $N = 5$). C. Migración neuronal en LP caudal (test de Mann Whitney, $U = 2419$, n.s. Entrenado, $N = 7$; Control $N = 6$).

en contraste, en ninguna de las sesiones se observan diferencias significativas respecto de la *elección random*, reforzando la idea de que los individuos genuinamente se orientan utilizando exclusivamente las claves espaciales (Figura 3.4 C).

Estos resultados evidencian la capacidad de re-adaptarse a cambios en la regla de aprendizaje, llegando a un mayor porcentaje de respuestas correctas hacia el final de la segunda y tercera semana de entrenamiento respecto de la primera.

Luego de completado el cronograma experimental, se evaluó el destino celular de los NPs marcados con BrdU mediante inmunodetección del marcador neuronal NeuN. El efecto del aprendizaje sobre la neurogénesis adulta fue evaluado mediante la cuantificación del número de nuevas neuronas (BrdU⁺NeuN⁺) a lo largo del eje rostro-caudal del *pallium*.

Se observó un aumento en la incorporación de nuevas neuronas en las dos subregiones en las que se describió un incremento en la proliferación (rMP y cLP). En el caso de cLP, se observó un incremento del $\sim 250\%$, mientras que no se observaron diferencias en los niveles de neurogénesis en ninguna de las regiones rostro-caudales

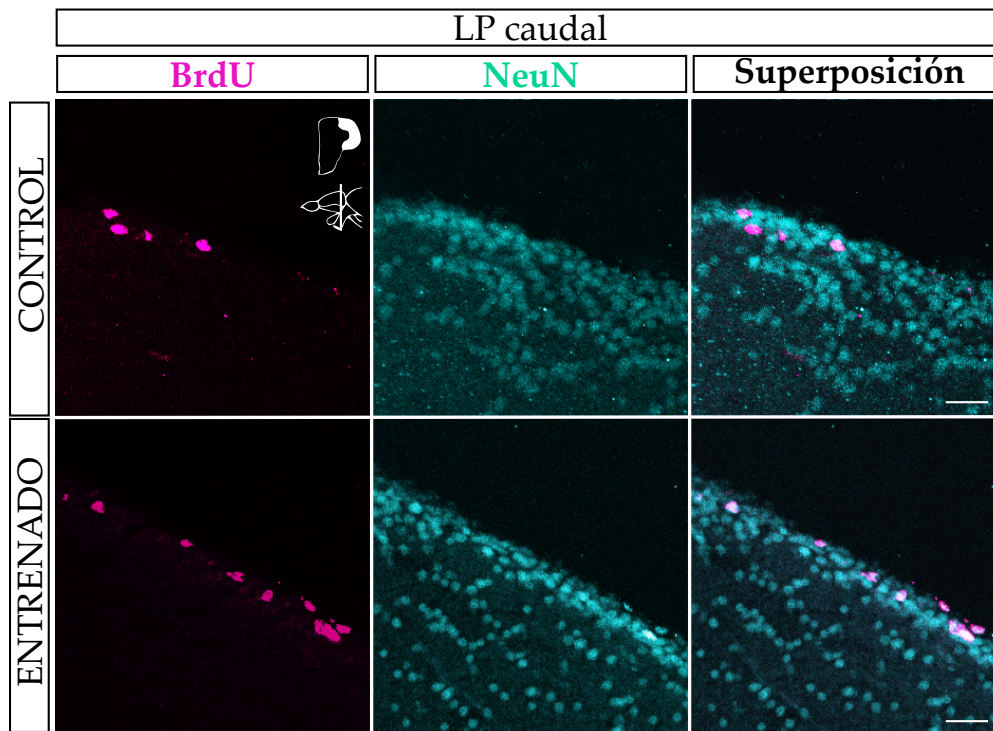


Figura 3.6: Neurogénesis adulta luego de aprendizaje en SCT. Inmunofluorescencia para BrdU (magenta) y NeuN (cyan), y superposición en LP caudal para Controles y Entrenados. Escala: 20 μm .

restantes (media \pm ES: Control 44.39 ± 12.71 , N=5; Entrenado 112.28 ± 16.41 , N=7) (Figura 3.5 A). Por otra parte, se registró un aumento aún más pronunciado de las neuronas marcadas con BrdU ($>300\%$) en rMP (media \pm ES: Control 57.73 ± 26.00 , N=5; Entrenado 204.50 ± 56.36 , N=7) (Figura 3.7 A). Dado que la actividad circuital podría regular el desarrollo de las nuevas neuronas, se decidió evaluar si el aprendizaje afecta la diferenciación neuronal, determinada como el porcentaje de nuevas neuronas adultas ($\text{BrdU}^+\text{NeuN}^+/\text{BrdU}^+$), así como también la distancia de migración de las células marcadas con BrdU, medidas desde el borde de la región periventricular hacia su posición final en el parénquima del *pallium* (ver *Apéndice*, Figura 7.2). En cuanto a la distribución se encontró que prácticamente todas las células se ubican rodeando la zona periventricular (rondan los 0-20 μm), y no exhiben una migración hacia el interior del parénquima (Figura 3.5 C), a excepción de la región rMP, en la que los Controles mostraron un pequeño aumento de la distancia migrada respecto de los Entrenados (Figura 3.7 C). Respecto del porcentaje

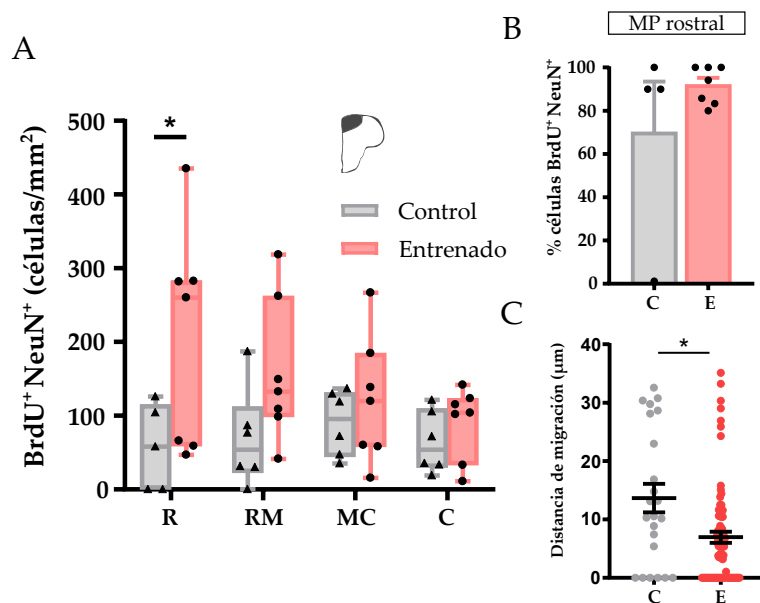


Figura 3.7: A. Células BrdU/NeuN en MP. (ANOVA de dos vías, seguido de test post-hoc de Bonferroni, efecto del Tratamiento $F_{(1,43)} = 9.564$, efecto de la región del *pallium*: $F_{(3,43)} = 0.8889$, * indica $p < 0.05$, Entrenado, N = 7; Control, N = 6). B. Diferenciación a fenotipo neuronal (% células BrdU⁺NeuN⁺) en MP rostral. (test de Mann-Whitney, $U=11.5$, n.s., Entrenado, N = 7; Control, N = 4). C. Migración neuronal en LP caudal (test de Mann-Whitney, $U=602$, * indica $p < 0.05$, Entrenado, N = 7; Control N = 4).

de nuevas neuronas, más del 70 % de las células BrdU⁺ colocalizaron con el marcador de fenotipo neuronal maduro, NeuN, tanto en Entrenados como en Controles (Figuras 3.5 y 3.7, B). Es decir que la gran mayoría de las células progenitoras marcadas inicialmente se diferenciaron a neuronas, y no se registraron diferencias entre tratamientos ni entre regiones.

Los resultados muestran que el número de nuevas neuronas bajo este protocolo es mucho mayor en rMP en comparación con cLP. Por lo tanto, se hipotetizó que los NPs en LP caudal pueden ser susceptibles a la actividad cognitiva en una ventana temporal diferente.

2.3. Período Crítico de la Neurogénesis Adulta inducida por SCT

El proceso neurogénico involucra varios puntos de control o *checkpoints*, donde la actividad circuital y la señalización sistémica regulan distintos procesos del

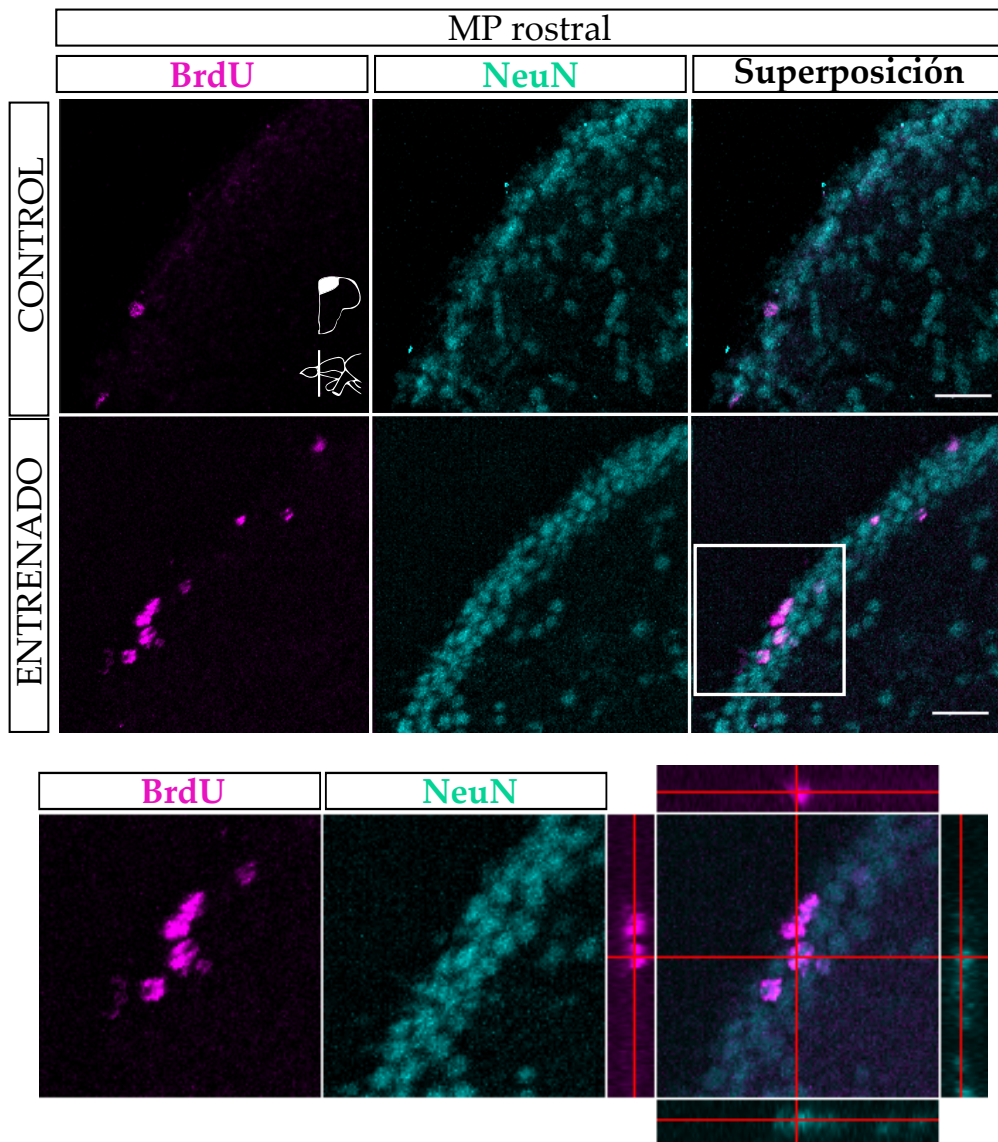


Figura 3.8: Neurogénesis adulta luego de aprendizaje en SCT. Arriba: Inmunofluorescencia para BrdU (magenta) y NeuN (cyan), y superposición en MP rostral para Controles y Entrenados. Escala: 20 μm . Abajo: Magnificación de panel de Superposición. Plano focal y vistas ortogonales luego de reconstrucción tridimensional.

desarrollo, de forma dependiente del tiempo (Mu y col., 2010). Sobre esta base, se evaluó si el entrenamiento tiene un impacto sobre las nuevas neuronas en cLP en diferentes períodos de su maduración.

Inicialmente, se entrenaron peces en un cronograma en el cual las sesiones comenzaron inmediatamente después de la marcación por BrdU⁺ (post días de habituación), y se suspendieron al día 14 (Figura 3.9 A). De esta manera, se analizó el

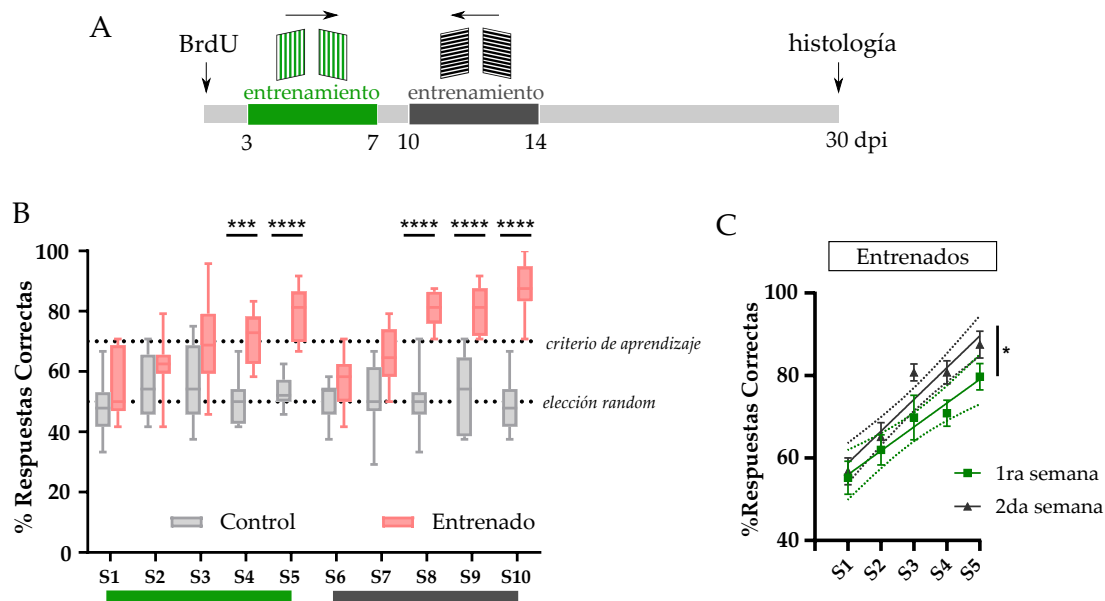


Figura 3.9: A. Diseño experimental. Las células progenitoras de los individuos fueron marcadas con BrdU, y luego el entrenamiento comenzó inmediatamente después. El entrenamiento consistió de 10 sesiones. Cada 5 sesiones, tanto las claves espaciales como la localización de la salida (flechas negras) fueron cambiadas. Los individuos fueron sacrificados a 30 dpi para el análisis histológico. B. Curvas de aprendizaje para individuos Control y Entrenados (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, seguida de test post-hoc de Bonferroni, efecto del tratamiento: $F_{(1,14)} = 126.1$, efecto de la sesión: $F_{(9,126)} = 5.254$, *** indica $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$. Entrenado, $N=8$; Control, $N=8$). C. Regresión lineal simple para cada ventana de entrenamiento para individuos Entrenados (ANCOVA, $F_{(1,76)} = 1.516$, n.s., Entrenado, $N=8$; Control, $N=8$).

efecto del aprendizaje en una ventana temporal que prácticamente no se solapa con el protocolo previo. Las claves y posición de la salida fueron cambiados luego de 5 sesiones consecutivas, y se analizó la colocalización de células $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ a 30 dpi.

Respecto de las curvas de aprendizaje, se observa nuevamente que una primera exposición a una dada configuración espacial genera una mayor adaptación frente a un cambio de regla y claves espaciales. Es decir, luego de un primer bloque de sesiones (S1-S5), los individuos acaban por obtener porcentajes superiores al 85% al finalizar el entrenamiento ($\text{media}_{S10} \pm \text{ES} = 87.5 \pm 3.247$) (Figura 3.9 B y C). Nuevamente, se observó que una única sesión de aprendizaje es suficiente para que la *performance* de los peces se diferencie de la *elección random*, para ambas configuraciones espaciales utilizadas (t de Student de una muestra, $\mu_0=50$, $tS2_{(7)}=3.286$, $p=0.0134$, $tS7_{(7)}=4.408$, $p=0.0031$), y que los Controles no difieren estadísticamente de este valor en ningún momento del entrenamiento.

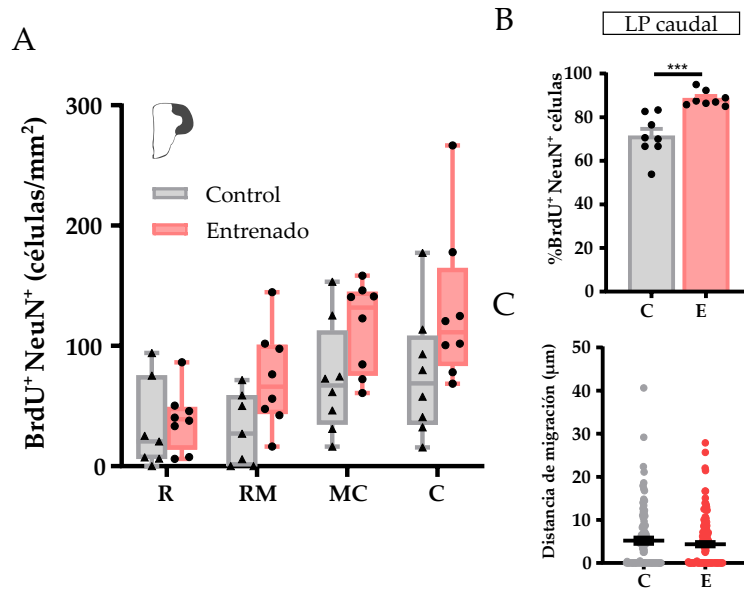


Figura 3.10: A. Células BrdU/NeuN en LP. (ANOVA de dos vías, seguido de test post-hoc de Bonferroni, efecto del Tratamiento $F_{(1,54)} = 10.63$, efecto de la región del *pallium*: $F_{(3,54)} = 8.642$, n.s., Entrenado, N = 8; Control, N = 8). B. Diferenciación a fenotipo neuronal (% células BrdU⁺NeuN⁺) en LP caudal. (t test no apareado, $t_{(14)} = 4.749$, *** indica $p < 0.001$, Entrenado, N = 8; Control, N = 8). C. Migración neuronal en LP caudal (test de Mann Whitney, $U=6492$, n.s., Entrenado, N = 8; Control, N = 8).

El porcentaje de células BrdU⁺/NeuN⁺ se mantuvo alto, en un rango de 70-90% de colocalización, en concordancia con los resultados anteriores (Figuras 3.10 y 3.12 B). Sin embargo, llamativamente, y en contraste con el cronograma inicial, se observó que los individuos Entrenados exhibieron un incremento en la neurogénesis sólo en rMP.

En el caso de cLP, si bien se observa una tendencia a una mayor incorporación de nuevas neuronas en los individuos Entrenados, no se registraron diferencias significativas entre ambos tratamientos en ninguna de las alturas del eje rostro-caudal cuando el entrenamiento se da en una ventana temporal más temprana (Figura 3.10 A). En el caso de rMP, se encontró que el aprendizaje estimula un incremento robusto en los niveles de incorporación de nuevas neuronas ($\sim 200\%$), exhibiendo un gradiente decreciente rostro-caudal (media \pm ES: Control 94.20 ± 17.61 ; Entrenados 188.3 ± 36.01 , N=8)(Figura 3.12 A). Si bien las diferencias observadas en esta región parecen ser muy dispares entre protocolos, el número de nuevas neuronas no varía sustancialmente; lo que sí se observa, en cambio, es un aumento de la

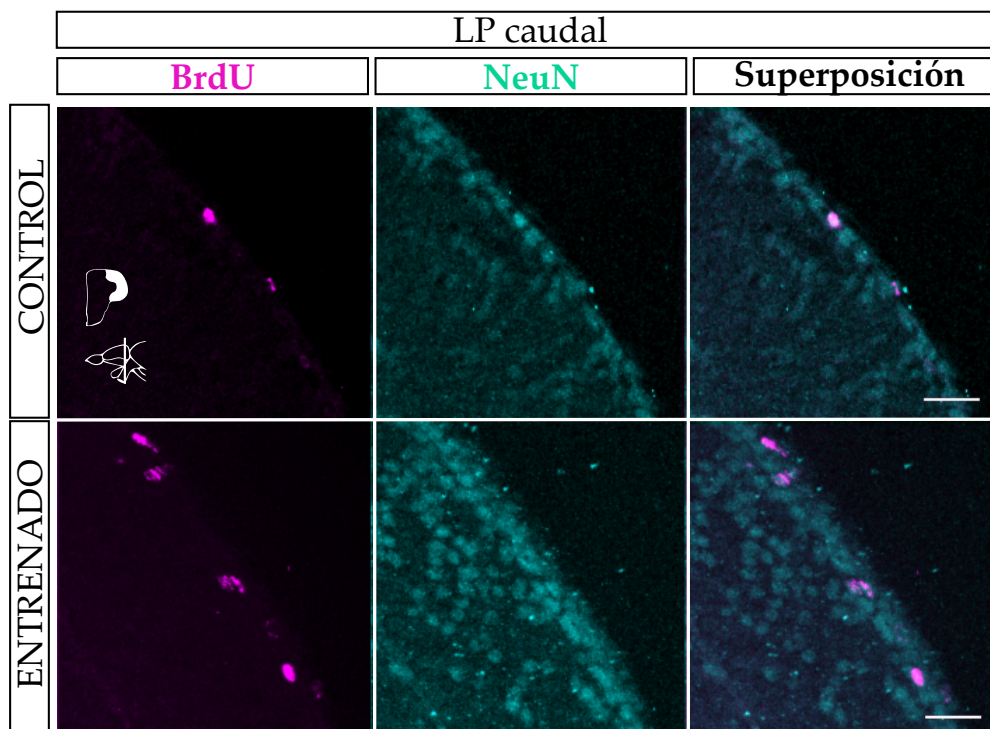


Figura 3.11: Neurogénesis adulta luego de aprendizaje en SCT. Inmunofluorescencia para BrdU (magenta) y NeuN (cyan), y superposición en LP caudal para Controles y Entrenados. Escala: 20 μm .

cantidad de neuronas observadas en el grupo Control, lo cual reduce las diferencias entre tratamientos. Es decir que el tiempo en el cual ocurre el entrenamiento en la SCT es relevante para la sobrevivencia de las nuevas neuronas, en las distintas regiones del *pallium*.

Por otra parte, se evaluó la diferenciación a fenotipo neuronal de las células, y se observó un incremento significativo en el porcentaje de nuevas neuronas sólo en cLP (Figura 3.10 B). Respecto de la migración, en este caso no se observaron diferencias entre tratamientos en ninguna de las regiones y alturas del *pallium*. En todas ellas se observa que las células BrdU⁺ se ubican muy cercanas al ventrículo, en el mismo rango del protocolo anterior. No hay, por lo tanto, cambios en la distancia de la migración de las nuevas neuronas (Figuras 3.10 y 3.12 C).

A continuación, se estudió la neurogénesis adulta luego de un entrenamiento tardío, de 31-42 dpi (Figura 3.14 A). En este caso, ambos grupos experimentales exhibieron niveles similares de neurogénesis tanto en rMP como en cLP (Figura 3.15 A).

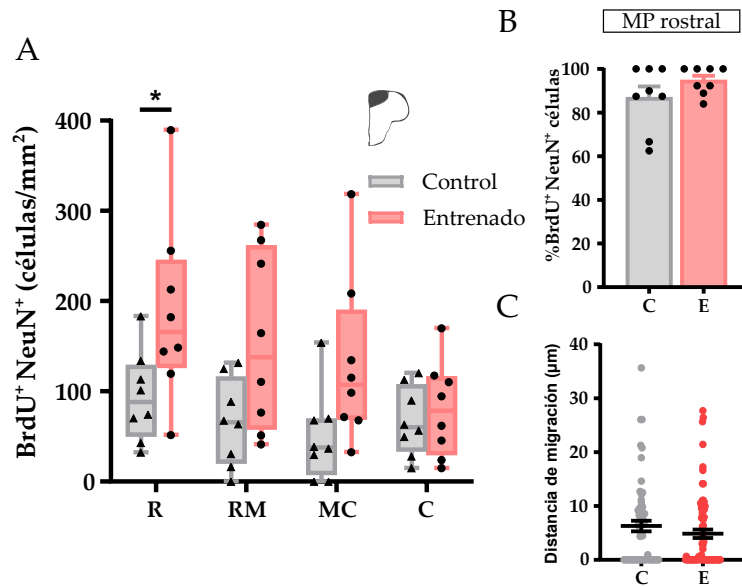


Figura 3.12: A. Células BrdU/NeuN en MP. (ANOVA de dos vías, seguido de test post-hoc de Bonferroni, efecto del Tratamiento $F_{(1,56)} = 15.34$, efecto de la región del *pallium*: $F_{(3,56)} = 2.685$, * indica $p < 0.05$, Entrenado, N = 8; Control, N = 8). B. Diferenciación a fenotipo neuronal (% células BrdU⁺NeuN⁺) en MP rostral. (t test no apareado, $t_{(14)} = 1.396$, n.s., Entrenado, N = 8; Control, N = 8). C. Migración neuronal en MP rostral (test de Mann Whitney, $U = 2088$, n.s., Entrenado, N = 8; Control, N = 8).

Estos resultados evidencian que los NPs rostral y caudal son afectados de manera diferencial por la actividad circuital dada por la tarea comportamental, de acuerdo al momento en el cual dicha tarea es realizada. Realizar la SCT en un período temprano de la maduración genera cambios en los pools de progenitores de MP rostral. Si se lo administra más tardíamente (12-30 dpi), la incorporación de nuevas neuronas se da tanto en rMP como en cLP. En la Figura 3.15 B se resumen los resultados obtenidos para las células BrdU⁺NeuN⁺, mediante la Tasa de Incremento Neuronal (Entrenado/Control) en las tres ventanas temporales analizadas.

Esta modulación de la neurogénesis adulta por actividad circuital puede ser atribuida a dos posibles mecanismos no excluyentes: (a) un incremento asociado a la actividad circuital en la supervivencia de las nuevas neuronas, evitando programas de muerte celular; (b) el reclutamiento encadenado asociado a la actividad circuital de NPs marcados con BrdU, que son producto de divisiones conservativas.

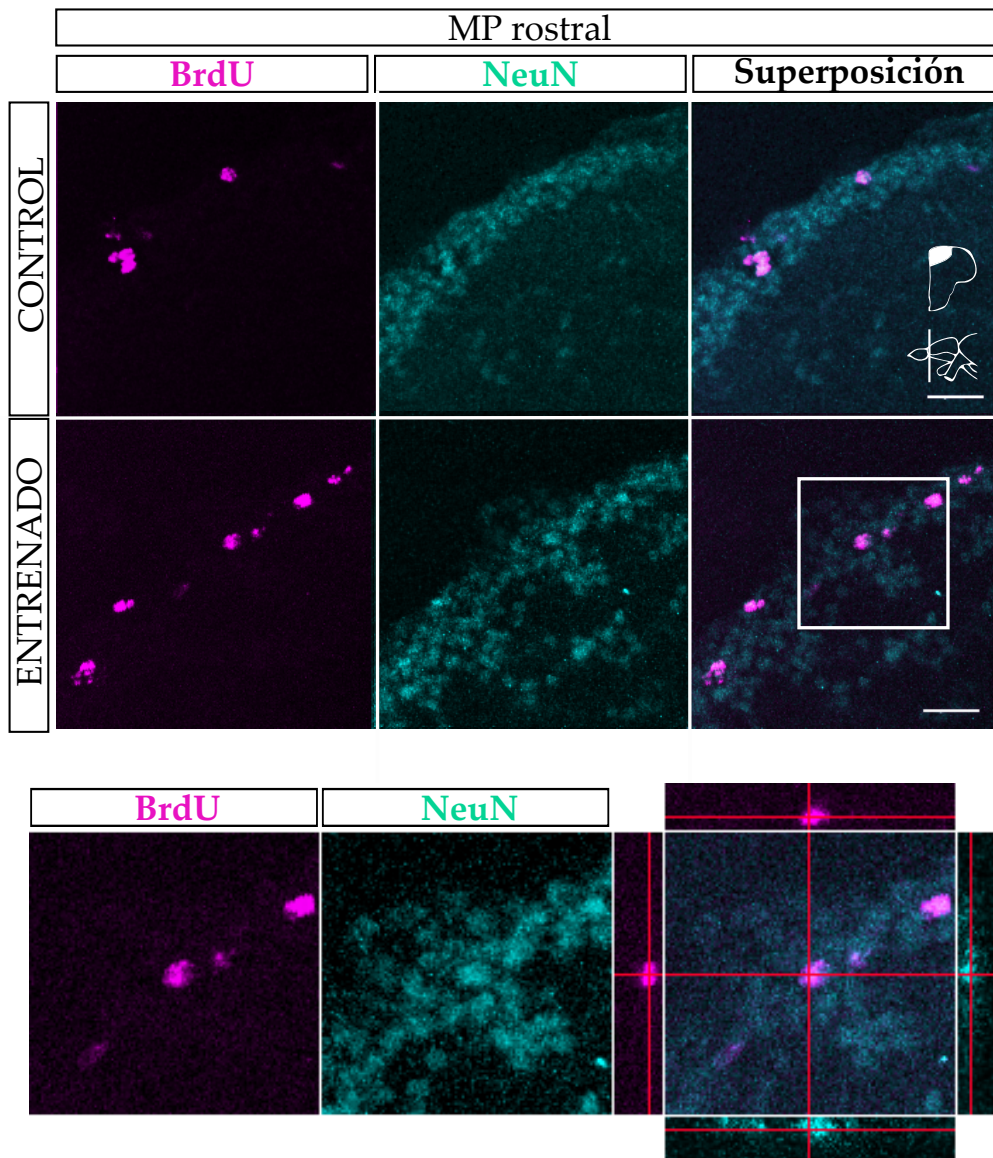


Figura 3.13: Neurogénesis adulta luego de aprendizaje en SCT. Arriba: Inmunofluorescencia para BrdU (magenta) y NeuN (cyan), y superposición en MP rostral para Controles y Entrenados. Escala: 20 μm . Abajo: Magnificación de panel de Superposición. Plano focal y vistas ortogonales luego de reconstrucción tridimensional.

3. Discusión y Conclusiones

Los peces teleósteos crecen a lo largo de toda su vida, y por lo tanto, sus órganos y tejidos deben adaptarse al incremento en el tamaño corporal. La neurogénesis adulta, en particular, aparte de contribuir a este crecimiento, podría estar proveyendo a los circuitos neurales un grado extra de plasticidad para adaptar el cerebro a

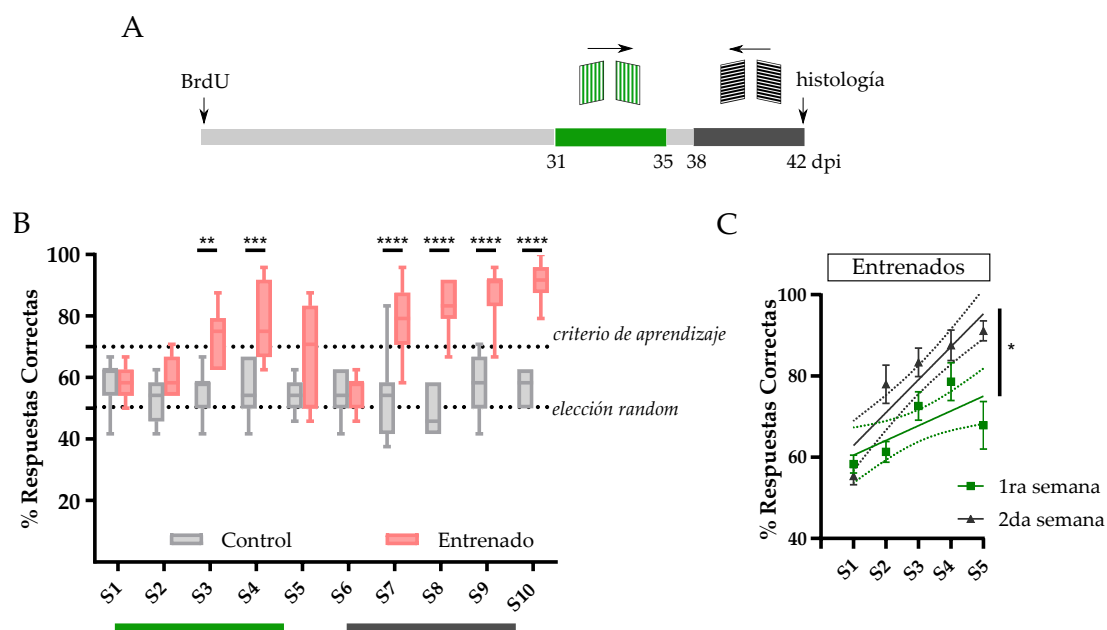


Figura 3.14: A. Diseño experimental. Las células progenitoras de los individuos fueron marcadas con BrdU, y luego el entrenamiento comenzó 31 dpi. El entrenamiento consistió de 10 sesiones. Cada 5 sesiones, tanto las claves espaciales como la localización de la salida (flechas negras) fueron cambiadas. Los individuos fueron sacrificados a 30 dpi para el análisis histológico. B. Curvas de aprendizaje para individuos Control y Entrenados (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, seguida de test post-hoc de Bonferroni, efecto del tratamiento: $F_{(1,12)} = 108.0$, efecto de la sesión: $F_{(9,108)} = 6.800$, ** indica $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ ****, $p < 0.0001$. Entrenado, $N = 7$; Control, $N = 7$). C. Regresión lineal simple para cada ventana de entrenamiento para individuos Entrenados (ANCOVA, $F_{(1,66)} = 5.914$, * indica $p < 0.05$, Entrenado, $N = 7$; Control, $N = 7$).

cambios en el ambiente. En consonancia con esto último, estudios previos muestran que numerosas regiones encefálicas involucradas en el procesamiento de información sensorial son neurogénicas, y la estimulación sensorial sostenida lleva a un incremento en la incorporación de nuevas neuronas en los nichos neurogénicos a los que se encuentran asociados (Labusch y col., 2020; Lindsey y col., 2014; Sato y col., 2016). En el mismo sentido, en roedores y aves se ha visto que los desafíos comportamentales que involucran el procesamiento de información en núcleos encefálicos neurogénicos aumentan la neurogénesis adulta, de manera dependiente del estímulo (A. Barnea y Nottenbhom, 1994; Alonso y col., 2006; Goldman y Nottebohm, 1983; Leuner y col., 2004; Tashiro y col., 2007). Estos trabajos resaltan la relevancia de la neurogénesis adulta en cambios asociados a aprendizaje desde una perspectiva *estructura-función*.

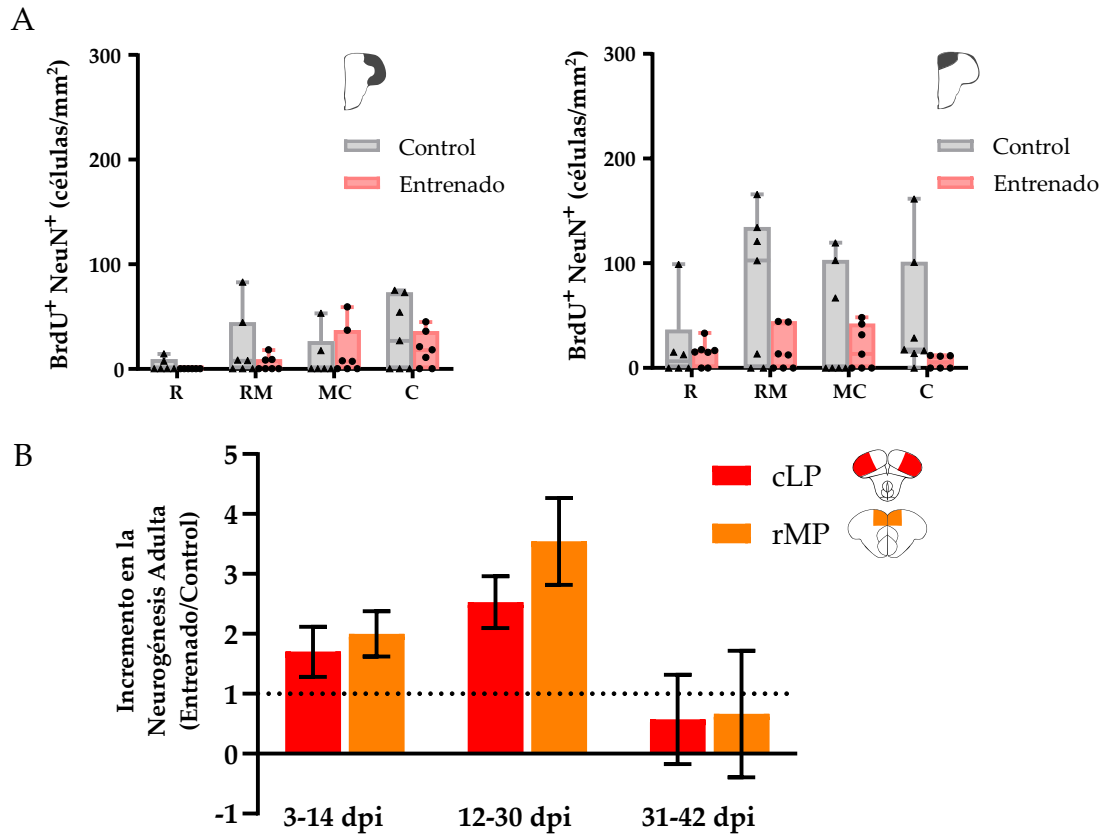


Figura 3.15: A. Células BrdU/NeuN en LP (izquierda) y MP (derecha). (test de Kruskal-Wallis, seguido de test post-hoc de Dunn, LP: K-W st = 9.83, n.s. MP: K-W st = 8.189, n.s., Entrenado, N = 7; Control, N = 7). B. Tasa de incremento neuronal (Entrenado/Control) en rMP y cLP para cada ventana temporal de aprendizaje.

En esta Tesis, se desafió cognitivamente a individuos adultos de pez cebra con un paradigma cognitivo de tipo espacial para explorar la adición de nuevas neuronas a los circuitos del *pallium*. Los resultados muestran que (a) la actividad circuital asociada al aprendizaje incrementa la proliferación celular de NPs en subregiones específicas del *pallium*, el rMP y el cLP, y (b) promueve la incorporación de nuevas neuronas en estas regiones del *pallium*, en diferentes ventanas temporales. Estos hallazgos sugieren que las nuevas neuronas contribuyen a los cambios plásticos en el *pallium* como consecuencia del desafío comportamental. Dado que el tratamiento Control, cuya salida del laberinto está aleatorizada y está sujeto a las mismas manipulaciones experimentales que los Entrenados (aislamiento, manejo, ambiente, exploración y recompensa social), se concluye que las diferencias observadas son una consecuencia directa del aprendizaje. Cabe resaltar que este es el primer trabajo

en reportar plasticidad de los circuitos neuronales, dados por neurogénesis adulta, como resultado de la realización de una tarea cognitiva en pez cebra.

Los resultados indican una especialización rostro-caudal de los circuitos del *pallium*, demostrando la relevancia de cLP (que abarca las porciones caudales del *pallium* dorso-lateral ventral y el dorso-lateral central) y rMP (la porción rostral del *pallium* dorso-medial) durante la ejecución de esta tarea cognitiva.

Proliferación Celular en rMP y cLP

Bajo la hipótesis de que la actividad circuital modula positivamente la integración de nuevas neuronas a dichos circuitos, se analizó la proliferación celular y la neurogénesis adulta de individuos sometidos a la SCT.

En el caso de la proliferación, los resultados mostraron que luego de una semana de entrenamiento, la actividad aumenta el número de células PCNA⁺ para los individuos Entrenados respecto de los Controles, en rMP y cLP. Es decir que el hecho de aprender a orientarse utilizando las claves espaciales aumenta la actividad circuital en las regiones mencionadas, y modula en forma positiva la proliferación celular.

Estudios comportamentales realizados en distintas especies de teleósteos relacionan el LP con la navegación y el aprendizaje espacial (Durán y col., 2010; Elliott y col., 2017; Ocaña y col., 2017). Ambas funciones cognitivas son procesadas por el hipocampo de mamíferos. Más aún, la región LP del pez cebra expresa marcadores moleculares semejantes a los expresados por el hipocampo de mamíferos (Ganz y col., 2015; Mueller y Wullimann, 2009). Los resultados aquí presentados están en concordancia con el involucramiento del LP de teleósteos con el procesamiento de la información espacial y revela una especialización rostro-caudal de esta estructura, dado que, de todo el *pallium* lateral, sólo la región caudal (cLP) es la que presenta un incremento en la proliferación como resultado del aprendizaje en esta tarea. Al respecto, Ocaña y colaboradores reportaron cambios progresivos en la actividad metabólica a lo largo del eje rostro-caudal de LP como respuesta del entrenamiento del pez dorado en el mismo paradigma utilizado en esta Tesis (Ocaña y col., 2017). En su trabajo, se analizó la activación de regiones del *pallium*, medida a través del

metabolismo oxidativo, durante el aprendizaje. Los autores hacen una distinción entre la porción dorsal y ventral de LP, y observan que las secciones rostral y medial del LP ventral (rLP ventral y mLP ventral) exhiben una activación transiente en etapas tempranas del entrenamiento, mientras que la porción caudal (cLP) ventral muestra una actividad sostenida a lo largo de todo el período de entrenamiento. En ninguno de los experimentos desarrollados en este Capítulo se encontraron diferencias entre LP dorsal y ventral. Al respecto, es probable que la señalización implicada en el metabolismo oxidativo durante SCT no necesariamente se corresponda con los factores involucrados en la proliferación de los NPs en LP, explicando esta discrepancia. Sin embargo, sí se observaron efectos asociados al aprendizaje en cLP, en consonancia con lo reportado por Ocaña y colaboradores.

Sorprendentemente, y en comparación con los estudios mencionados en pez dorado, en donde la única región aparentemente involucrada es el LP, se encontró una inducción de la proliferación producto del aprendizaje en rMP. Esta región, como se mencionó anteriormente, ha sido asociada a la amígdala de mamíferos (Durán y col., 2010; Elliott y col., 2017; Portavella y col., 2004; von Trotha y col., 2014). Se podría hipotetizar que el factor de estrés/ansiedad durante los ensayos, o la presencia de conoespecíficos a modo de recompensa social, podrían activar esta región. Sin embargo, las diferencias observadas entre individuos Entrenados y Controles invalidan esta interpretación, dado que ambos están sujetos a las mismas condiciones ambientales durante el desarrollo de SCT (manipulación y exposición a conoespecíficos). Por otro lado, Lau y colaboradores (Lau y col., 2011) han propuesto que el MP actúa como un centro cerebral de decisión, cuya actividad discrimina un comportamiento de elección en pez cebra. En un paradigma de evitación de luz (*light avoidance*), observaron que los animales que evitan activamente los compartimentos iluminados exhiben una activación preferencial de MP (Dm) y Vd (las regiones homólogas a la amígdala y el cuerpo estriado, respectivamente). Sorprendentemente, en animales sometidos a las mismas condiciones e idénticos estímulos visuales, pero que no mostraban una respuesta evitativa, no se observó activación en ninguna de estas dos regiones, a pesar de mostrar niveles similares de activación neuronal en núcleos asociados al procesamiento visual. Cabe destacar que el análisis sólo fue realizado

en un nivel rostral (rMP, sección 71 del *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas* (Wullimann y col., 1996)). Dados los antecedentes de conectividad entre las regiones que procesan la información visual y el MP (Northcutt, 2008; Rink y Wullimann, 1998), se propone que esta zona podría estar implicada en un circuito que determina si el comportamiento de evitación va a ser realizado o no.

Estos resultados sugieren un potencial rol del MP/amígdala en la mediación de la toma de decisiones. Sobre esta base, se hipotetiza que el incremento de la neurogénesis adulta en rMP puede ser atribuida al rol de este centro neuronal en la toma de decisiones. Sin embargo, se deberían realizar futuros experimentos para probar esta idea.

El *pallium* de los peces es considerado una estructura simple, con regiones especializadas a nivel transversal. Sin embargo, aquí se muestra una especialización rostro-caudal en MP y LP en los individuos Control, evidenciado por el gradiente en la expresión de PCNA, con mayor intensidad en rMP y cLP, siendo ambas regiones neurogénicas susceptibles de ser moduladas por aprendizaje. Estos resultados resaltan la especialización de los circuitos neuronales a lo largo del eje rostro-caudal, un concepto que debería ser tenido en cuenta para futuros estudios.

Neurogénesis Adulta en rMP y cLP

Uno de los desafíos planteados en los objetivos de esta Tesis fue la ejecución de un paradigma comportamental que implicara una actividad sostenida de circuitos neuronales. Con este fin, se buscó un protocolo de entrenamiento sostenido, que lograra mantener el desafío cognitivo para los individuos. Se ha observado que frente a un cambio de regla y de claves espaciales, los individuos alcanzan más rápidamente el criterio de aprendizaje (70 % de respuestas correctas), y su desempeño en la última sesión alcanza valores más altos que durante la primer semana de exposición al protocolo experimental. Esto también muestra que los peces poseen una alta capacidad de adaptación a nuevas condiciones ambientales.

Para asegurar que las claves espaciales internas sean la única referencia que utilizan para orientarse, los peces se sometieron a las mismas condiciones que los Entrenados, pero en este caso la barrera de vidrio rotaba en forma aleatoria entre

ambas salidas, de manera que el individuo no tuviera manera de anticipar la localización de la salida. Se vio que, tanto en el protocolo de 5 sesiones como en el de 10 y 15, los Controles nunca mejoran su *performance* a lo largo de las sesiones. Esto demuestra que son incapaces de percibir la barrera de vidrio, y considerando aparte que el dispositivo completo rota cada 5 trials, se puede asegurar que los individuos Entrenados efectivamente están utilizando las claves para orientarse.

Teniendo en cuenta estos resultados comportamentales y los hallazgos mostrados para la proliferación celular, se analizó la integración de nuevas neuronas, restringiendo el análisis a la regiones rostral y caudal. Para ello, se marcaron cohortes de NPs con el análogo de timidina BrdU, y los peces fueron entrenados en tres períodos diferentes luego de la marcación: 3-14, 12-30 y 31-42 dpi). Se encontró un incremento en las neuronas BrdU⁺ en rMP y cLP de los Entrenados respecto de los Controles. Estos resultados apoyan la idea de la neurogénesis adulta como una fuente evolutivamente conservada de plasticidad cerebral asociada al aprendizaje. Curiosamente, la neurogénesis observada en estas regiones del *pallium* difiere en el período crítico de sensibilidad al aprendizaje, y en el grado de susceptibilidad al tratamiento: ambas regiones muestran mayor susceptibilidad en el período comprendido entre 12-30 dpi; sin embargo, en una ventana temporal más temprana, se registraron diferencias sólo en la región rMP. La diferencia en los períodos críticos de ambas regiones puede ser atribuida a poblaciones neuronales con distinta velocidad/ritmo de maduración. En roedores, se han reportado diferentes períodos críticos dependientes de la actividad circuital durante el desarrollo de nuevas neuronas en cerebros adultos (Alvarez y col., 2016; Ge y col., 2007; Tashiro y col., 2007). Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta este resultado en un modelo teleósteo.

El incremento observado en la neurogénesis adulta luego del desafío comportamental puede deberse a dos mecanismos diferentes: (a) el rescate de neuronas inmaduras de muerte celular programada; o (b) la expansión del reservorio de NPs por proliferación encadenada de NPs marcados con BrdU. En roedores, la neurogénesis adulta genera neuronas en abundancia, y su sobrevivencia depende de la integración sináptica dependiente de actividad de las nuevas neuronas para rescatarlas de pro-

gramas de muerte celular (Ryu y col., 2016). En línea con esta idea, Ampatzis y colaboradores mostraron un incremento significativo de la actividad apoptótica, demostrada mediante el método de TUNEL, en diferentes regiones del *pallium* de pez cebra (~ 100 - 200 células TUNEL⁺/mm², un valor cercano a la contribución diaria de nuevas neuronas) (Ampatzis y col., 2012).

Por otra parte, soportando la idea de una proliferación encadenada de NPs, se ha reportado una proliferación persistente de células marcadas con BrdU (~ 40 dpi) en el telencéfalo de pez cebra (Grandel y col., 2006; März y col., 2010). La proliferación encadenada de NPs marcados también ha sido propuesta por Prickaerts y colaboradores (Prickaerts y col., 2004). En sus propias palabras, "*El efecto de la proliferación por sí sola, en todos los días después de la inyección, se agrega al número de células contadas, así como la supervivencia de aquellas células que fueron marcadas más tempranamente en la semana y que no han seguido proliferando*". Esta idea es apoyada por resultados pertenecientes a nuestro laboratorio, desarrollados por la Lic. Fernanda Román, en un ensayo en el que evaluó la sobrevivencia y proliferación de células marcadas con 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) a distintos tiempos: 4, 16, 32 y 64 dpi (Figura 3.16).

La Lic. Román observó un porcentaje de sobrevivencia del $\sim 37\%$ en cLP entre 4 vs. 32 dpi (Número de células EdU⁺ en cLP: 4 dpi 144.7 ± 21.53 , N = 8; 32 dpi 54.16 ± 11.47 , N = 3), mientras que para rMP, la sobrevivencia durante el mismo período fue del $\sim 55\%$ (Número de células EdU⁺ en rMP: 4 dpi 245.6 ± 31.45 , N = 8; 32 dpi 131.8 ± 23.84 , N = 4). El decrecimiento en el número de células marcadas en ambas subregiones del *pallium* podría estar indicando la muerte de una porción de estas células. Por otra parte, se hallaron niveles significativos de células EdU⁺PCNA⁺ tanto en rMP como cLP. Se encontró una fracción de células EdU⁺ mitóticas a 4 dpi en cLP ($44.03 \pm 10.02\%$), que disminuye considerablemente en los puntos temporales posteriores (Figura 3.16, C). En contraste, en rMP se encontró una porción de células EdU⁺PCNA⁺ desde 4 a 32 dpi ($26.54 \pm 6.21\%$). Dicha proliferación deja de observarse a 64 dpi (Figura 3.16, F). Por lo tanto, una porción relevante de células EdU⁺ mitóticas continúan dividiéndose tanto en rMP como cLP. El resumen de estos resultados se puede observar en la Figura 3.17.

Estos hallazgos apuntan a una regulación compleja de la neurogénesis adulta en el *pallium*, donde el balance entre la proliferación encadenada de NPs y la muerte de neuronas inmaduras contribuyen a la adición de nuevas neuronas en estos circuitos. Por otra parte, la diferencia entre las ventanas temporales en las que se hallan estas células proliferativas en ambas subregiones puede ser atribuida a diferencias en la composición celular.

Al respecto, se han reportado una regionalización espacial de los NPs en el *pallium*, pudiéndose identificar dos poblaciones: una correspondiente al dominio medial (MP) y otra al lateral (LP) (Dirian y col., 2014). Por otra parte, dichas poblaciones difieren en la tasa de activación/división en función de su localización: se ha visto que la región del MP presenta una mayor frecuencia de entrada en el ciclo celular de sus progenitores, mientras que la región LP lo hace en una tasa menor (Dray y col., 2015). En el caso de los resultados de la Lic. Román, a 4 dpi las células con doble marcación en rMP y cLP pueden corresponder a células de ciclado rápido que proliferan durante un período de tiempo corto. El decaimiento luego de 4 dpi en la proliferación encadenada observada en cLP podría explicar la ausencia del efecto del aprendizaje sobre la neurogénesis en la ventana temporal de 3-14 dpi. El incremento tardío (12-30 dpi) de la incorporación de nuevas neuronas en esta región podría ser atribuido a un rescate de muerte celular dependiente de la actividad circuital. Por otro lado, el rMP continúa mostrando células EdU⁺PCNA⁺ a 16 y 32 dpi. Estas últimas podrían corresponder a células de ciclado lento, que reingresan al ciclo celular luego de un período de quiescencia (Olivera-Pasilio y col., 2014). Es decir que, en este caso, la proliferación encadenada y el rescate de la muerte celular parecerían actuar de manera sinérgica para la promoción de la neurogénesis adulta asociada al aprendizaje en el período 12-30 dpi.

Por último, el concepto de proliferación actuando en sinergia con la muerte celular también es sustentado por un modelo de *dinámica poblacional de NSCs* desarrollado en nuestro grupo de investigación por el Mg. Julio Castillo Elías. Basándose en las tasas de proliferación de NSCs y diferenciación neuronal descriptas por Than-Trong y colaboradores (Than-Trong y col., 2020) en MP, modeló la adición de nuevas neuronas bajo condiciones Control y Entrenamiento durante las ventanas

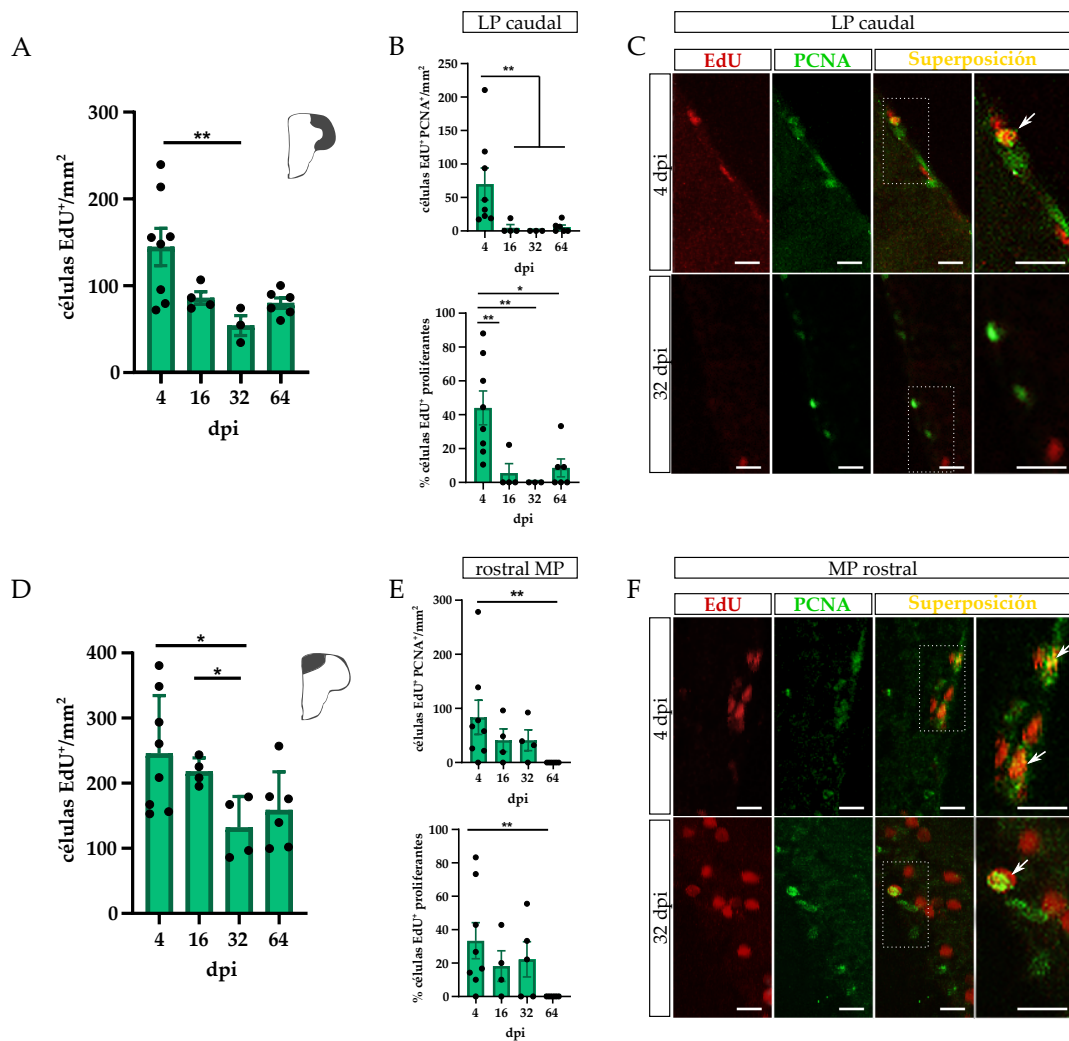


Figura 3.16: A. Cuantificación de células EdU⁺ en cLP a 4, 16, 32 y 64 dpi (test de Kruskal-Wallis, seguido de test posthoc de Dunn, K-W st=9.048, ** indica p<0.01. 4 dpi N=8, 16 dpi N=4, 32 dpi N=3, 64 dpi N=6). B. Número (arriba) y porcentaje (abajo) de células en EdU proliferación (test de Kruskal-Wallis, seguido de test posthoc de Dunn, K-W st=13.80 y K-W st=12.88, respectivamente, * indica p<0.05, **, p<0.01. 4 dpi N=8, 16 dpi N=4, 32 dpi N=3, 64 dpi N=6). C. Células EdU/PCNA en cLP para 4 y 32 dpi. Las flechas blancas indican co-localización de ambos marcadores. Escala, 20 μ m. D. Cuantificación de células EdU⁺ en rMP a 4, 16, 32 y 64 dpi (test de Kruskal-Wallis, seguido de test posthoc de Dunn, K-W st=7.88, ** indica p<0.01. 4 dpi N=8, 16 dpi N=4, 32 dpi N=4, 64 dpi N=6). E. Número (arriba) y porcentaje (abajo) de células en EdU proliferación (test de Kruskal-Wallis, seguido de test posthoc de Dunn, K-W st=9.571 y K-W st=8.827, respectivamente, ** indica p<0.01. 4 dpi N=8, 16 dpi N=4, 32 dpi N=3, 64 dpi N=6). F. Células EdU/PCNA en rMP para 4 y 32 dpi. Las flechas blancas indican co-localización de ambos marcadores. Escala, 20 μ m. Todos los experimentos fueron realizados por la Lic. Fernanda R. Román.

3-14 dpi y 12-30 dpi. Luego de 30 días, el modelo muestra un una proporción del ~60 % de nuevas neuronas a partir de una dada cohorte de NSCs marcados con BrdU en rMP (Figura 3.18, C), un valor que es levemente menor al reportado en

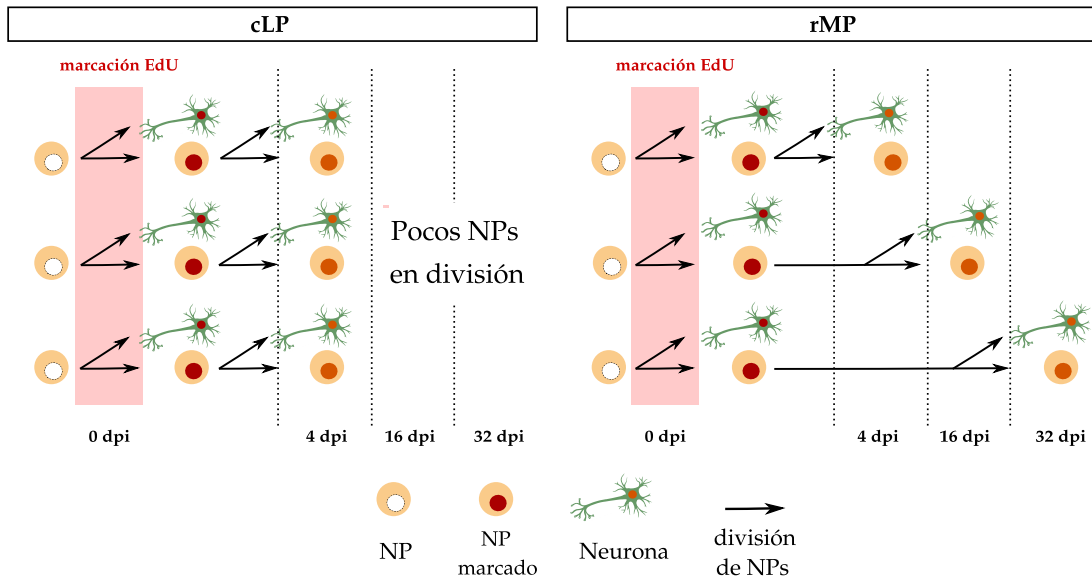


Figura 3.17: Esquema resumiendo los resultados de EdU/PCNA en cLP y rMP realizados por la Lic. Fernanda Román.

los experimentos de este Capítulo (Paneles B de Figuras 3.7, 3.12). Por otra parte, se estimó el número de divisiones encadenadas que cada célula marcada sufre a lo largo de 30 días, mostrando un promedio de ~ 1.7 divisiones (Figura 3.19, A). Este valor refuerza la idea de la proliferación encadenada, descartando una posible dilución de la marca de BrdU en la progenie. Luego, basándose en los resultados de proliferación celular descritos en este Capítulo (Figura 3.3), buscó emular los resultados de neurogénesis adulta luego del aprendizaje, considerando que la realización de este protocolo dispara la activación y ciclado de NSCs marcados con BrdU. En las dos ventanas temporales analizadas (3-14 y 12-30 dpi) la tasa de proliferación es afectada por un factor de aprendizaje (λ). Como se ve en la Figura 3.19 A, el aprendizaje aumenta el número de nuevas neuronas que se adicionan al rMP; sin embargo, a diferencia de los resultados reportado en esta Tesis, no se observan diferencias entre las ventanas temporales. Considerando los resultados de muerte celular descritos en la Figura 3.16 por la Lic. Román, se incorporó al modelo un factor de muerte neuronal a partir de 15 dpi, junto con un rescate inducido por aprendizaje. En condiciones Control, la muerte de nuevas neuronas mantiene un $67.1 \pm 5.4\%$ de sobrevivencia (Figura 3.19, C). En línea con los resultados experimen-

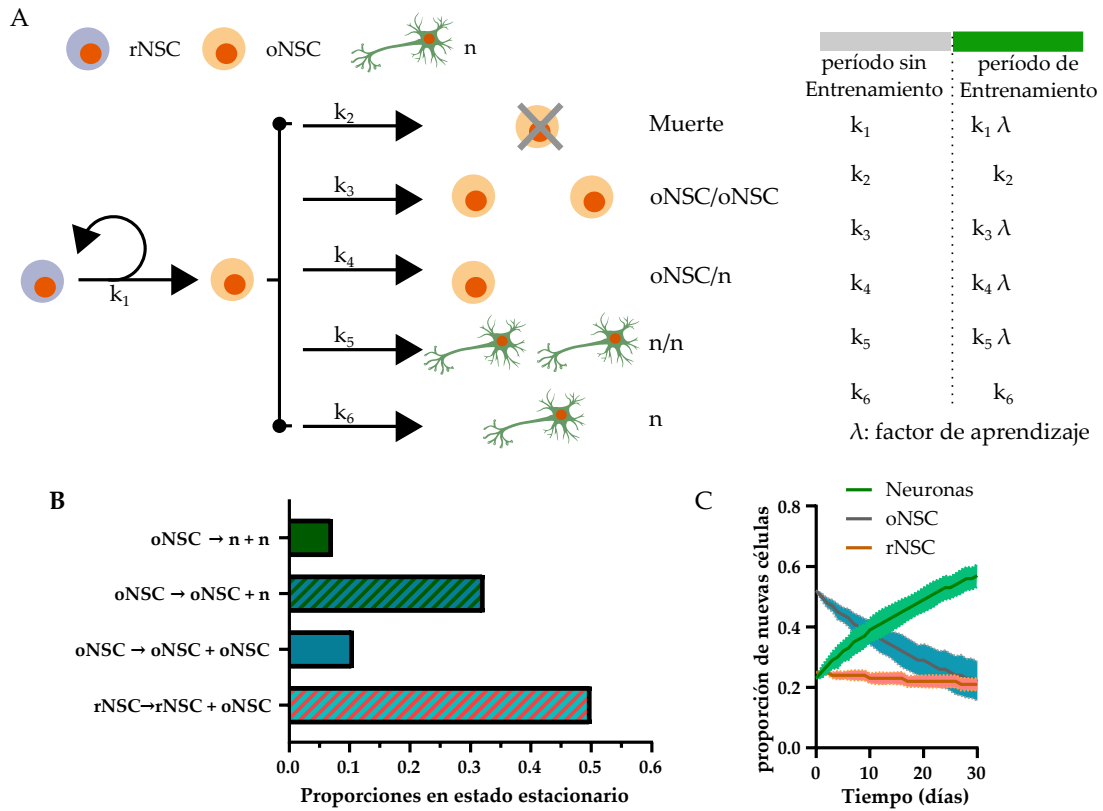


Figura 3.18: A. Esquema indicando el modelo de dinámica poblacional de NSCs. k_i indica las tasas de división/diferenciación. El efecto del aprendizaje sobre la proliferación de NSCs fue simulado mediante la implementación de un factor de aprendizaje (λ) durante las ventanas de aprendizaje. rNSC: NSC de reservorio; oNSC: NSC operativos; n: neuronas. B. Número de divisiones celulares en el estado estacionario, calculado para estimar las poblaciones iniciales de células marcadas con BrdU. C. Dinámica poblacional bajo condiciones Control. El modelo y las simulaciones fueron realizados por el Mg. Julio Castillo Elías.

tales, la incorporación de muerte neuronal aumenta la diferencia en el número de nuevas neuronas que se incorporan entre 12-30 y 3-14 dpi en rMP (Figura 3.19, B). Por último, se simuló la incorporación de las nuevas neuronas bajo distintas condiciones: duplicación del factor de aprendizaje ($2X \lambda$), duplicación de todas las tasas de proliferación/diferenciación ($2X k_i$), $2X \lambda +$ muerte neuronal y $2X k_i +$ muerte neuronal (Figura 3.19, D). Las únicas condiciones en las que el modelo replica los datos experimentales son las que incorporan la muerte neuronal, siendo la más precisa " $2X \lambda +$ muerte neuronal".

En conclusión, considerando la evidencia experimental y el modelo de dinámica poblacional de NSCs, se sugiere que los hallazgos mostrados en este Capítulo son el resultado de la sinergia entre ambos mecanismos: proliferación encadenada de

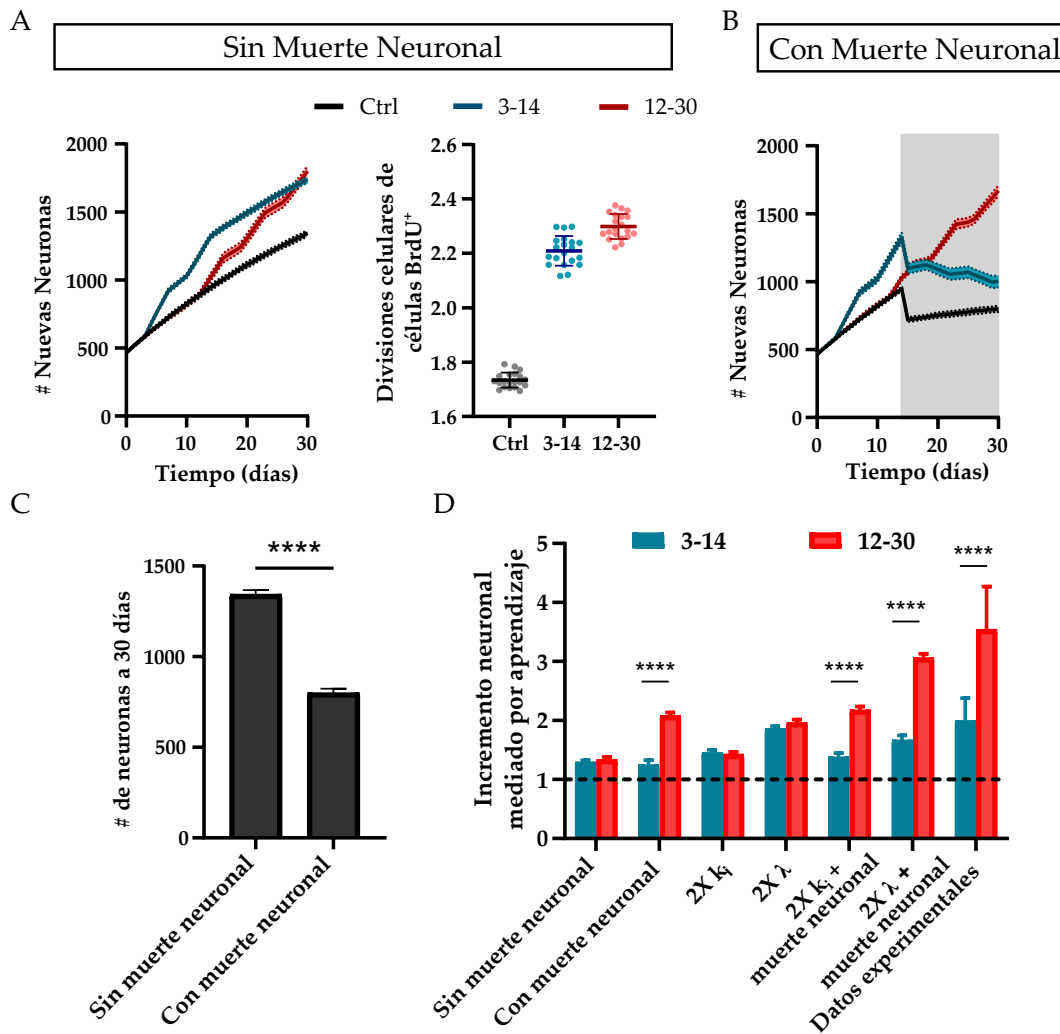


Figura 3.19: A. Izquierda: Simulaciones estocásticas para estimar la población de nuevas neuronas en individuos Control y Entrenados durante las dos ventanas temporales de aprendizaje: 3-14 dpi y 12-30 dpi. Derecha: Divisiones de células marcadas con BrdU bajo condiciones Control y Entrenados. B. Simulaciones estocásticas para estimar la población de nuevas neuronas en individuos Control y Entrenados, considerando un *checkpoint* a 15 dpi para muerte neuronal, junto con un rescate inducido por aprendizaje. C. Número de neuronas adultas para individuos Control a 30 dpi, en presencia y ausencia del factor de muerte neuronal (t-test no pareado, $t_{(38)}=73.10$, **** indica $p<0.0001$). D. Incremento neuronal mediado por aprendizaje bajo distintas condiciones (ANOVA de dos vías, seguido de test posthoc de Sidak, efecto del Período: $F_{(6,239)} = 430.7$, efecto de la Condición: $F_{(1,239)} = 1342$, **** indica $p<0.0001$). El modelo y las simulaciones fueron realizados por el Mg. Julio Castillo Elías.

progenitores neuronales y rescate de muerte celular programada.

Capítulo III. Conectividad Circuital de cLP-rMP

1. Introducción

Los mecanismos que subyacen a la regionalización del sistema nervioso central y la especificación de los distintos tipos neuronales se encuentran altamente conservados a lo largo de la filogenia de los vertebrados (Medina y col., 2005; Wilson y Houart, 2004). Particularmente, en el telencéfalo, si bien existe una gran variabilidad en morfología y extensión de cada uno de los dominios, la organización y los primeros mecanismos de diferenciación desde peces hasta mamíferos presenta homologías entre los distintos grupos. Considerando la importancia del pez cebrá como modelo, urge la necesidad de entender este aspecto en mayor profundidad.

Como se mencionó en la *Introducción General*, el desarrollo embrionario del tubo neural rostral de los amniotas y teleósteos resulta en una organización anatómica muy disímil de sus respectivos telencéfalos, debido a las distintas secuencias de plegamiento: *evaginación* en amniotas y *eversión* en teleósteos. Esta diferencia fundamental fue descrita por primera vez en 1922 por Nils Holmgren (Holmgren, 1922). De acuerdo a estudios recientes, se cree que la eversión consiste en el plegamiento hacia afuera de las paredes laterales del telencéfalo, lo que resulta en un plegamiento lateral de la región dorsal del tubo neural, de modo que el telencéfalo dorsal (*pallium*) se pliega lateralmente sobre el telencéfalo ventral (*subpallium*) (Nieuwenhuys, 2009; Wullimann y Puelles, 1999) (Figura 4.1). Como resultado, la

"placa del techo" del tubo neural se expande sobre los dos lóbulos telencefálicos para convertirse en la *tela coróidea* que recubre la superficie telencefálica, encerrando el espacio ventricular en forma de "T" (Northcutt y Braford, 1980; Wullimann y col., 1996). Esta diferencia resulta en un arreglo diferente de las distintas subregiones del *pallium*, que dificulta la comparación con otros vertebrados, haciendo necesario su estudio con diferentes aproximaciones. Como se discutió extensamente en el *Capítulo II*, diversos trabajos muestran homologías a nivel funcional, utilizando distintos métodos como ablaciones y su relación con tareas comportamentales, análisis de expresión de genes tempranos, etc. Sin embargo, uno de los aspectos vacantes es la descripción de la conectividad sináptica de las distintas subregiones.

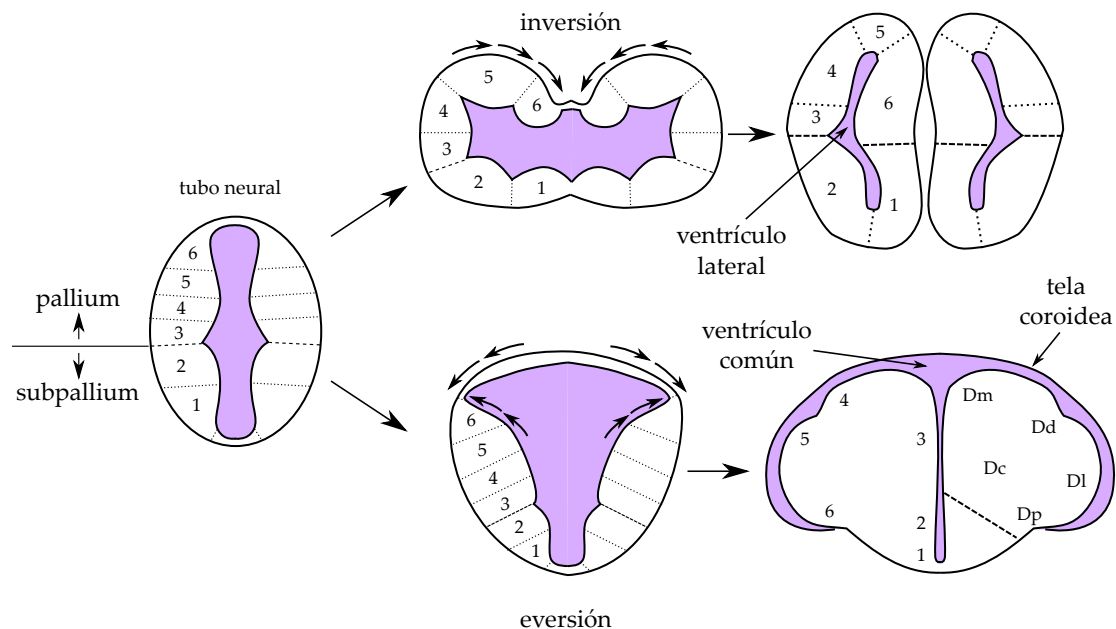


Figura 4.1: Esquema representando el desarrollo telencefálico por inversión (amniotas) y por everción (teleosteos). En color se indica el desarrollo y posición del ventrículo. Extraído y modificado de Yamamoto y col., 2007.

Una serie de estudios realizados por Folgueira y colaboradores han descrito las conexiones del telencefalo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Folgueira y col., 2004a). Utilizando el trazador lipofílico fluorescente DiL, observaron que el telencefalo recibe numerosas aferencias tanto de áreas telencefálicas, como de diencefálicas y del tronco encefálico. Las principales vías aferentes y eferentes intratelencefálicas están resumidas en la Figura 1.2 y Tabla 4.1.

Dentro de las conexiones en las áreas telencefálicas, la región Dm rostral recibe

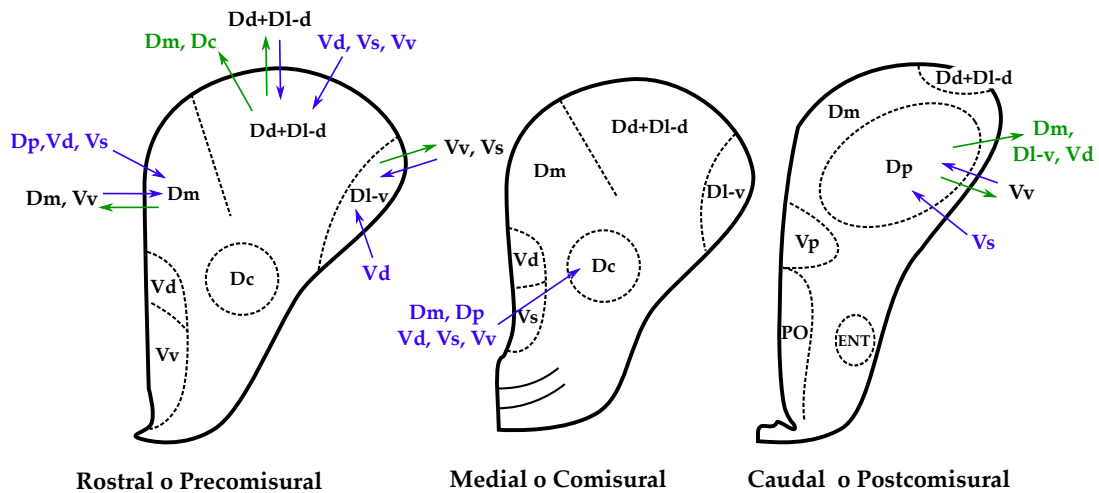


Figura 4.2: Esquemas de secciones coronales de telencéfalo rostral (precomisural), medial (comisural) y caudal (postcomisural) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) indicando las conexiones intratelencefálicas. Las flechas azules muestran aferencias y las verdes, eferencias. La doble flecha indica conexiones recíprocas. Extraído y modificado de Folgueira y col., 2004b. Dc: área dorso-central, Dd: área dorso-dorsal, Dl-d: área dorso-lateral dorsal, Dl-v: área dorso-lateral ventral, Dm: área dorso-medial, Dp: área dorso-posterior, Vd: área ventro-dorsal, Vs: área supracomisural ventral, Vv: área ventro-ventral.

Área telencefálica	Aferencias	Eferencias
Dm precomisural (rostral)	Dm pre y postcomisural, Dp, Vv, Vs, Vd	Dm precomisural, Vv
Dm postcomisural (caudal)	Dc	
Dd + Dl-d	Dd + Dl-d, Vv, Vs, Vd	Dd + Dl-v, Dm, Dc
Dl-v	Vd, Vs, Vv	Vv, Vs
Dc	Dm, Dp, Vv, Vs, Vd	
Dp	Vv, Vs	Dm, Dl-v, Vv, Vd

Tabla 4.1: Resumen de las conexiones intratelencefálicas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) descritas por Folgueira y col., 2004b. Dc: área dorso-central, Dd: área dorso-dorsal, Dl-d: área dorso-lateral dorsal, Dl-v: área dorso-lateral ventral, Dm: área dorso-medial, Dp: área dorso-posterior, Vd: área ventro-dorsal, Vs: área supracomisural ventral, Vv: área ventro-ventral.

aferentes de regiones vecinas, también correspondientes a Dm. En el Dm precomisural (es decir, Dm-rostromedial) la aplicación del trazador DiL muestra como resultado la marcación de células fundamentalmente en Dm postcomisural (o Dm-caudal) tanto del hemisferio ipsilateral como el contralateral. También recibe aferentes del *pallium* ventral (Vv, Vd y Vs) del Dm postcomisural y del *pallium* dorso-posterior (Dp). A su vez, esta región proyecta fibras a través de la comisura anterior hacia el Dm y Vv contralaterales. El Dm postcomisural (o Dm-caudal) recibe aferentes del *pallium* ventral (Vv) y del *pallium* dorso-central (Dc).

Por su parte, la región Dl presenta múltiples conexiones con áreas telencefálicas vecinas. El Dl-dorsal a niveles rostrales recibe numerosas aferencias del *pallium*

ventral (Vv, Vd y Vs), y, por otra parte, muestra conexiones recíprocas con la misma región Dl-d y la zona dorso-dorsal (Dd) pero en el hemisferio contralateral. Más aún, luego de la aplicación del trazador, se observan fibras eferentes que alcanzan la región Dm-rostral (precomisural) y la zona Dc. El Dl-ventral muestra eferencias que cruzan la comisura anterior hacia Dl-v y Vv contralaterales, hacia Dp en ambos hemisferios, y hacia las regiones precomisurales de Dm, Dd, Dl-d y *subpallium*. Por último, la región dorso-posterior, o Dp, en este trabajo considerada parte del *pallium* lateral, presenta proyecciones hacia la región rostral de Dm del hemisferio ipsilateral. Todos los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 4.1.

Estas investigaciones resaltan la funcionalidad del *pallium* en el procesamiento y la modulación de información multisensorial, y particularmente, muestra una vinculación fuerte entre las áreas Dm y Dl, las cuales se encuentran conectadas por fibras aferentes que emergen de Dl. Resultados similares entre Dm-Dl se han descrito para el pez dorado (*Carassius auratus*) (Northcutt, 2006).

Considerando los resultados descritos en el *Capítulo II*, en los cuales se mostró la implicancia de las regiones rMP y cLP en el paradigma de SCT, surge como interrogante si existe una conexión circuital entre ambas regiones. Por lo tanto, el objetivo del presente Capítulo es, en primera instancia, explorar el perfil de activación neuronal luego de realizar la SCT y, posteriormente, determinar la existencia de una vinculación circuital entre las regiones involucradas durante dicho paradigma.

2. Resultados

2.1. Activación Neuronal en Pallium Telencefálico post-SCT

Para estudiar si la realización de la SCT genera una activación neuronal en el *pallium* telencefálico, se estudió la distribución del gen de expresión temprana (IEG, por su sigla en inglés), c-Fos. Los IEGs consisten en un grupo de genes que se expresan de manera dependiente de actividad neuronal y son capaces de desencadenar a su vez la expresión de otros genes (factores de transcripción) o de ejercer modificaciones funcionales y/o estructurales en la función sináptica (efectores). La

expresión de IEGs inducida por actividad ocurre de manera rápida: la síntesis de ARNm ocurre en escasos minutos (2 a 5 minutos) y se mantiene durante unos 30 minutos para luego volver a los valores basales. Luego de 30 minutos, es posible detectar tanto ARNm (mediante hibridación *in situ*) y como proteína (mediante inmunocitoquímica) de estos IEGs. En esta Tesis realizar inmunodetección para la proteína c-Fos, técnica que ya ha sido utilizado exitosamente en teleósteos (Ausas y col., 2018; Bosch y col., 2001; von Trotha y col., 2014).

En el *Capítulo II* se describió un aumento en la proliferación en rMP y cLP luego de un protocolo de entrenamiento en la SCT de 5 días consecutivos. Interesantemente, el LP y MP muestran gradientes opuestos de actividad neuronal (Figura 4.3. Se observa una expresión marcada en el MP de las regiones rostral y rostro-medial que disminuye medialmente hasta llegar a la zona caudal; en el LP, en cambio, la expresión a nivel rostral es muy baja, aumentando progresivamente hacia la región caudal (Figura 4.3, C). Por lo tanto, se observa una fuerte inducción de la expresión de c-Fos, como consecuencia de la SCT, en las dos regiones descritas como sensibles al aprendizaje: rMP y cLP. De manera similar, la marcación por PCNA en peces Control también presenta gradientes similares, siendo rMP y cLP las regiones con mayor actividad proliferativa. Esta observación llevó a la hipótesis de que ambas regiones se encuentran sinápticamente conectadas.

2.2. Análisis de Conectividad de cLP - rMP

Con el objetivo de estudiar la conectividad de las regiones telencefálicas, se utilizó la línea transgénica *Tg(NeuroD1:GCaMP6f)*. Estos peces transgénicos expresan la proteína GCaMP6f, un indicador del calcio (calmodulina) fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), y a M13 (péptido localizado en el músculo esquelético ligero), bajo el promotor NeuroD1 (neuroal differentiation 1). Este gen codifica para el factor de transcripción hélice-bucle-hélice que promueve la diferenciación a fenotipo neuronal en nuevas neuronas. Por lo tanto, este constructo transgénico permite la obtención de señales del calcio, producto de la actividad de poblaciones neuronales.

En este caso, se estudió el patrón de activación de poblaciones neuronales frente

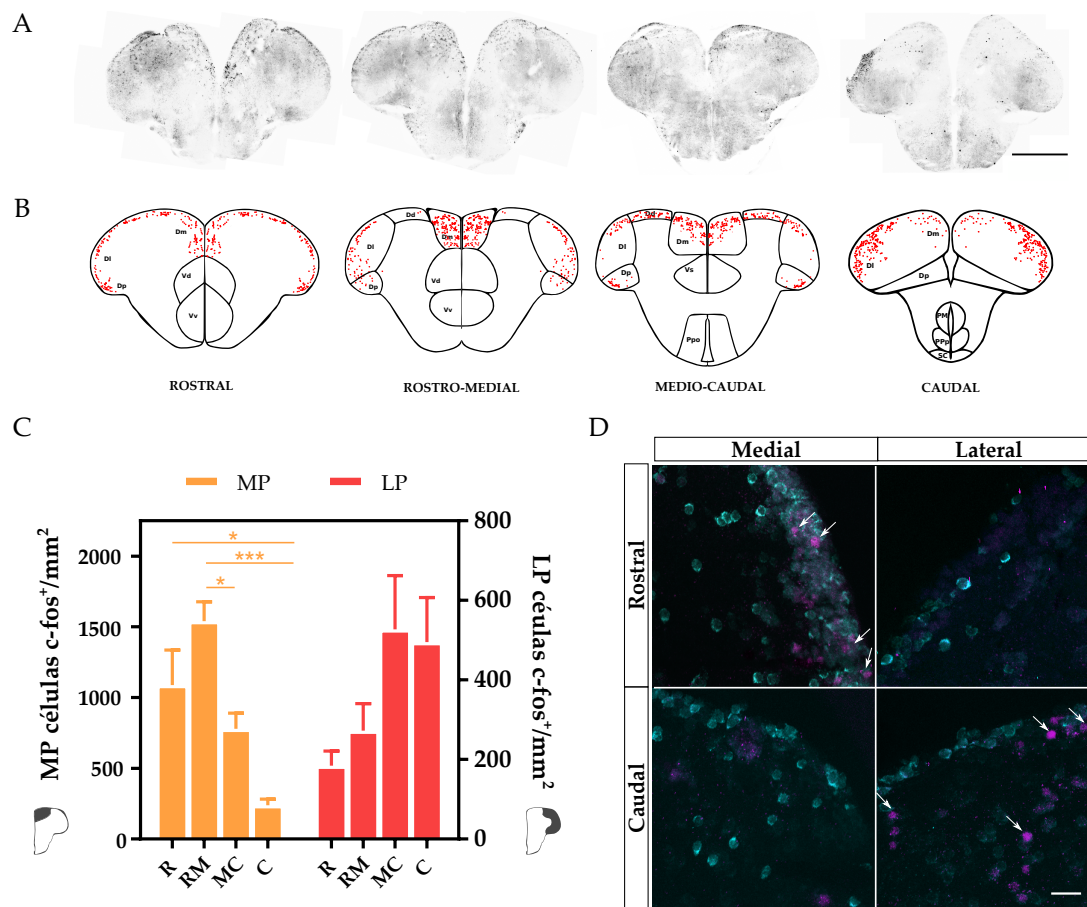


Figura 4.3: A. Secciones coronales representativas mostrando inmunodetección para c-Fos, 90 minutos después de la última sesión de aprendizaje (S5). Escala: 200μ . B. Esquema de secciones coronales, representando el patrón de expresión de c-Fos (puntos rojos) en *pallium* telencefálico. C. Perfil de activación a lo largo del eje rostro-caudal en el MP (barras amarillas) y LP (barras rojas). (ANOVA de una vía, seguido de test posthoc de Bonferroni, MP: $F_{(3,19)}=10.99$, * indica $p<0.05$, *** $p<0.001$. LP: $F_{(3,20)}=3.034$, n.s., $N = 6$). D. Células c-Fos/HuCD en rMP (izquierda-arriba), rLP (derecha-arriba), cMP (izquierda-abajo) y cLP (derecha-abajo) en individuos Control. Escala, $20\mu\text{m}$.

a una estimulación en el LP caudal en preparaciones de cerebro entero. Para la determinación de las regiones MP y LP, se tomó como referencia el trabajo realizado por Dirian y col., 2014 (ver Figura 7.3 en *Apéndice*). Como se observa en la Figura 4.4, la estimulación genera un aumento de la fluorescencia específicamente en la región del MP rostral del hemisferio ipsilateral, junto con actividad en (de mayor a menor): MP medial, MP caudal, LP rostral y habénula. No se observaron señales del calcio en el hemisferio contralateral en condiciones control (ACSF). Por lo tanto, esto muestra que existe una vía de comunicación entre cLP y rMP, dentro del mismo hemisferio telencefálico.

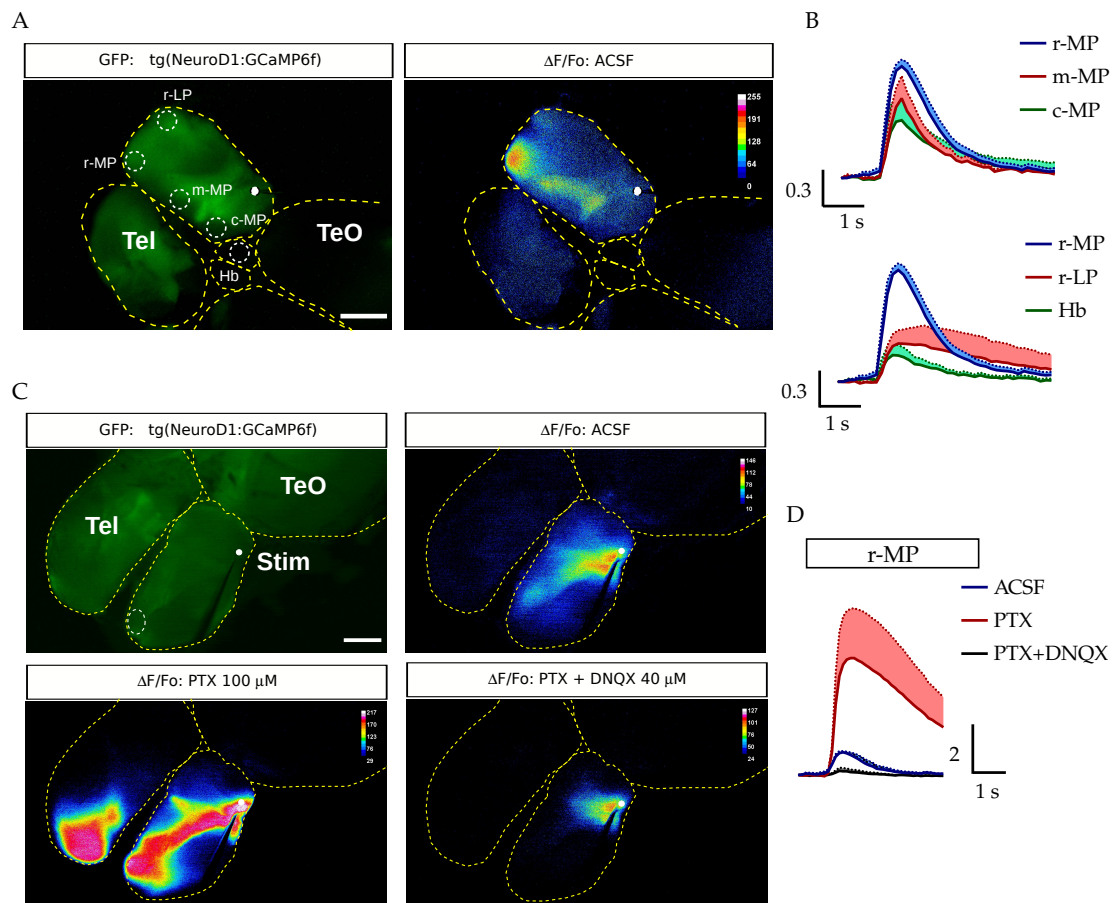


Figura 4.4: A. Izquierda: preparación de cerebro entero de individuos *tg(NeuroD1:GCaMP6f)* indicando sitio de estimulación (punto blanco). Escala, 250 μm . Los círculos en línea punteada indican las Áreas de Interés. Derecha: cambio en los niveles de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) luego de estimulación en cLP en condiciones control (ACSF). B. Secuencia temporal del cambio de la señal fluorescente en rMP, mMP, cMP (arriba) y rMP, rLP y Hb (abajo) luego de la estimulación en cLP ($N = 4$). C. Izquierda-Arriba: preparación de cerebro entero de individuos *tg(NeuroD1:GCaMP6f)* indicando sitio de estimulación (punto blanco). Escala, 250 μm . Derecha-Arriba: $\Delta F/F_0$ luego de estimulación en cLP en condiciones control (ACSF). Izquierda-Abajo: $\Delta F/F_0$ luego de bloqueo de receptores GABA_A (PTX). Derecha-Abajo: $\Delta F/F_0$ luego de bloqueo de receptores GABA_A y AMPA (PTX + DNQX). D. Secuencia temporal del cambio de la señal fluorescente en rMP en condiciones de ACSF (azul), PTX (rojo) y PTX + DNQX (verde) ($N = 4$). La estimulación fue administrada 1 segundo luego del inicio del registro. Stim: estimulación; Tel: telencéfalo; TeO: tectum óptico; Hb: habénula; ACSF: fluido artificial cerebrospinal; PTX: picrotoxina; DNQX: 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona.

Para determinar la naturaleza de esta conexión, se perfundió picrotoxina (PTX), un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A , y con 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), un antagonista competitivo de los receptores AMPA y kainato. Con el agregado de PTX, se observa un aumento significativo de la señal del calcio en comparación con el control (ACSF), indicando que el bloqueo de la inhibición genera una mayor activación de la población neuronal de la región rMP. Más aún, se

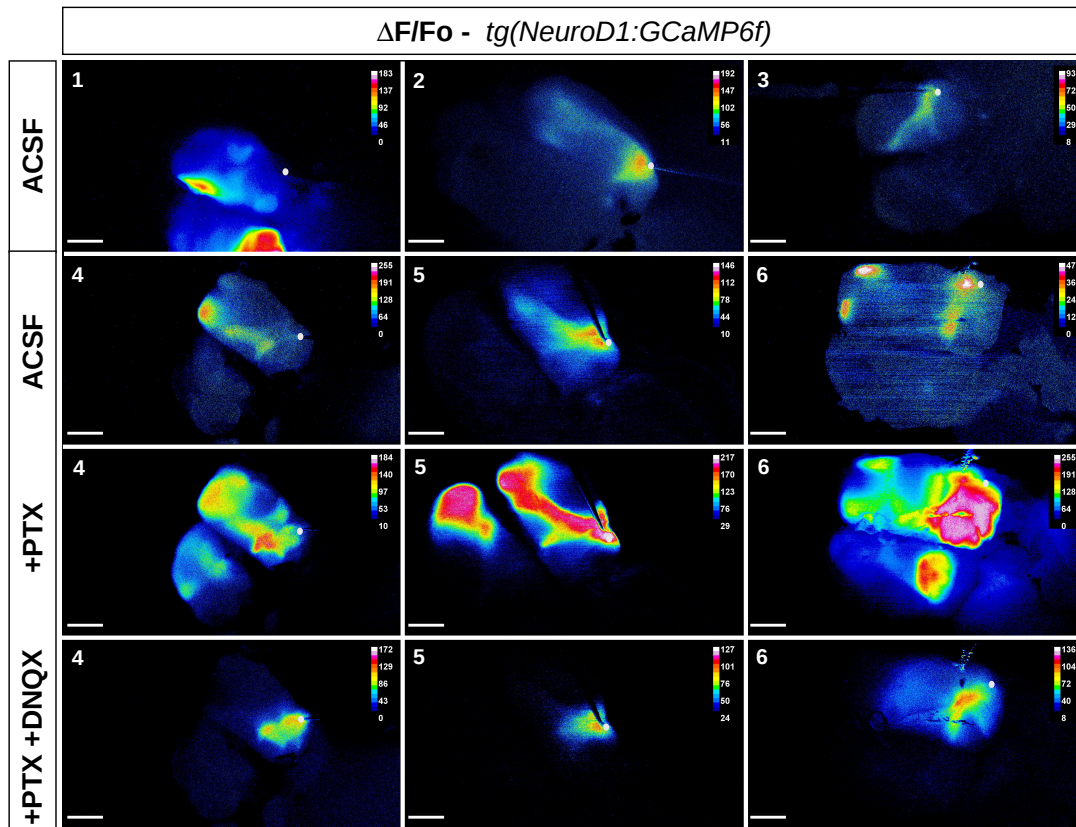


Figura 4.5: Cambio en los niveles de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) luego de estimulación en cLP en individuos *tg(NeuroD1:GCaMP6f)* bajo tres condiciones: control (ACSF), bloqueo de receptores $GABA_A$ (PTX) y bloqueo de receptores $GABA_A$ y AMPA (PTX y DNQX). Los puntos blancos indican el sitio de estimulación. Las columnas representan registros de individuos diferentes. Escala, 250 μm . ACSF: fluido artificial cerebroespinal; PTX: picrotoxina; DNQX: 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona.

observa que la estimulación en cLP genera un aumento en la señal del calcio tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral, indicando que en condiciones control, la conexión entre hemisferios está inhibida por interneuronas gabaérgicas (Figura 4.4, C). En contraste, cuando se incorpora PTX+DNQX, se anula por completo la señal del calcio de rMP. Ambos resultados indican claramente que ambas regiones se encuentran conectadas mediante una vía glutamatérgica.

3. Discusión y Conclusiones

En el presente Capítulo, se intentó determinar si las regiones descriptas como asociadas al aprendizaje durante la SCT presentan una conectividad circuital. Como primera aproximación, se evaluó la expresión de la proteína c-Fos como indicador

de actividad neuronal. Para ello, se sacrificó a los individuos 90 minutos después de la finalización de la última sesión. Este tiempo fue elegido en base a estudios previos en peces (Ausas y col., 2018; Chatterjee y col., 2015; Ruhl y col., 2017) que muestran un aumento de la expresión de esta proteína, al tiempo especificado.

Llamativamente, se detectaron niveles altos de expresión de c-Fos en las regiones rostral y rostro-medial del MP y en la región medio-caudal y caudal del LP. Si observamos el patrón de expresión a lo largo del eje antero-posterior, notamos que la activación a nivel rostral disminuye medialmente y aumenta nuevamente hacia LP caudal. Notoriamente, este patrón de activación está en concordancia con los resultados de proliferación y neurogénesis adulta descritos en el *Capítulo II*. La activación de LP era esperable y coincide con la vasta bibliografía mencionada anteriormente que vincula la región dorso-lateral con el procesamiento de la información espacial; respecto de MP, como se discutió en el *Capítulo II*, se sugiere un potencial rol en la mediación de la toma de decisiones, y podría justificarla fuerte inducción de la expresión de c-Fos en esta estructura luego de nuestro paradigma comportamental.

El aumento de la actividad en rMP y cLP llevó a estudiar si existe una conexión entre ambas regiones. Existen antecedentes de conectividad entre Dm-Dl, pero ninguno muestra una relación a diferentes alturas rostro-caudales. Folgueira y colaboradores describieron las conexiones intratelencefálicas entre MP y LP en trucha arcoíris, mostrando que estas regiones estaban conectadas por "fibras aferentes" que surgían desde LP dorsal (o Dl) (Folgueira y col., 2004a).

En este caso, se abordó esta pregunta utilizando los animales *Tg(NeuroD1:GCaMP6f)* en condición *naïve* (es decir, que no han pasado por el paradigma de aprendizaje). Se observó un aumento en las señales del calcio específicamente en rMP, producto de la estimulación eléctrica en cLP. Más aún, esta correlación entre ambas regiones aumenta al bloquear los canales inhibitorios GABA_A, alcanzando a verse una activación de rMP en el hemisferio contralateral, y se anula por completo al bloquear los canales excitatorios AMPA y kainato, indicando que se trata de una vía excitatoria glutamatérgica.

La naturaleza glutamatérgica de esta conexión ya ha sido descrita previamente

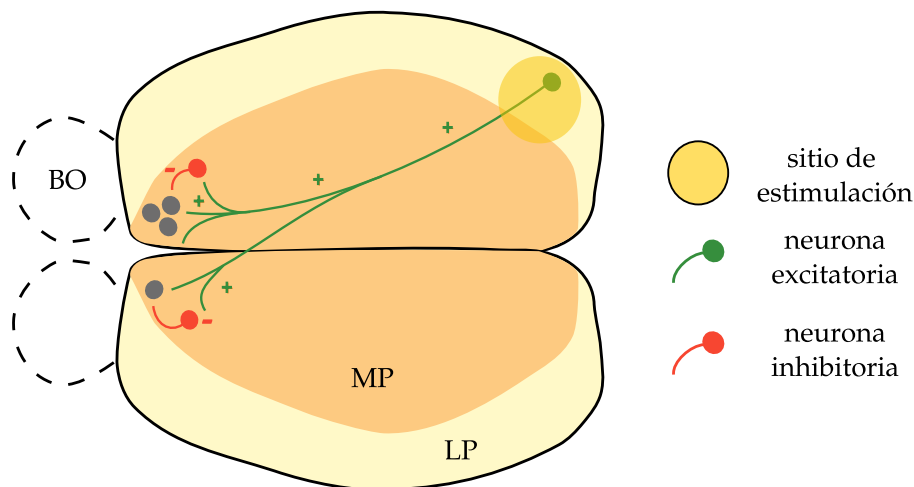


Figura 4.6: Esquema representando el modelo propuesto de la conectividad entre cLP y rMP. Se observa el telencéfalo en vista dorsal. Los axones provenientes de cLP excitan a las neuronas ubicadas en rMP de ambos hemisferios, y a interneuronas inhibitorias, que luego inhiben a las neuronas en rMP (inhibición de tipo "feed-forward"). BO: bulbo olfatorio; Tel: telencéfalo; MP: *pallium* medial; LP: *pallium* lateral.

para pez cebra, aunque a un nivel de conexión lateral (es decir, dentro de una misma sección coronal) (Nam y col., 2004; Ng y col., 2012; Wu y col., 2017). En un estudio realizado por Ng y colaboradores, la estimulación en LP generó un potencial excitatorio postsináptico de campo (fESPS) en MP, que fue asimismo bloqueado con el agregado del antagonista de receptores AMPA/kainato, CNQX. Asimismo, describieron la inducción de potenciación a largo plazo (LTP), que era inhibida con un antagonista de receptor NMDA. Los autores sugieren, entonces, que un componente, mediado por receptores NMDA, que participa en la plasticidad sináptica a largo plazo de la conexión MP-LP, que podría estar involucrada en regular los procesos de aprendizaje y memoria. Esta relación no sólo fue mostrada para el hemisferio ipsilateral, sino también para el contralateral (Wu y col., 2017). Por otro lado, es relevante el aumento de la señal en rMP observado en el hemisferio contralateral con la incorporación de PTX. Este resultado sugiere que los axones de la vía excitatoria proveniente de cLP hacen sinapsis sobre dendritas de las neuronas ubicadas en rMP de ambos hemisferios, pero a su vez, también sobre dendritas de interneuronas inhibitorias, que luego inhiben a las neuronas en rMP, ejerciendo una

inhibición de tipo *feed-forward* (Figura 4.6).

Los resultados muestran, entonces, que existe una conexión circuital entre dos regiones distantes rostro-caudalmente, rMP y cLP, las cuales se conectan mediante una vía excitatoria glutamatérgica que surge de cLP. Sin embargo, no se puede discernir aún si esta conexión es de tipo directa o multisináptica. Interesantemente, estos hallazgos resaltan nuevamente la especialización de los circuitos neuronales a lo largo del eje rostro-caudal.

Conclusiones

La adición de nuevas neuronas en individuos adultos representa una importante fuente de plasticidad cerebral. Si bien el pez cebra posee altos niveles de neurogénesis adulta, ampliamente distribuida a lo largo del eje rostro-caudal encefálico, la adición de nuevas neuronas como un mecanismo de plasticidad asociado al aprendizaje o cognición aún no había sido explorado. El *pallium* telencefálico del pez cebra, el cual es crítico para la ejecución de distintas tareas de aprendizaje tanto espaciales como emocionales, posee numerosos nichos neurogénicos bien descritos. En esta Tesis, se probó la capacidad de aprendizaje de los individuos en un paradigma de aprendizaje denominado Tarea de Constancia Espacial. Luego de 5 sesiones diarias, se observa una mejora en su rendimiento, indicando la habilidad de orientarse en el espacio a través del uso de claves espaciales. A su vez, este desafío cognitivo induce un aumento de la proliferación de NPs específicamente en dos regiones restringidas del *pallium*: el *pallium* lateral caudal (cLP) y el *pallium* medial rostral (rMP). Más aún, en protocolos sostenidos en el tiempo se observa que el aprendizaje genera la incorporación de nuevas neuronas en rMP y cLP, la cual difiere en ambas subregiones en el grado de extensión y en el período crítico de susceptibilidad a la actividad cognitiva. Finalmente, se evaluó si estas regiones del *pallium* están comunicadas, y se encontró que cLP y rMP se encuentran sinápticamente conectadas mediante una vía glutamatérgica.

Estos hallazgos destacan el rol de la neurogénesis adulta como una fuente de plasticidad conservada a lo largo de la evolución, y por otra parte, contribuyen al entendimiento de la especialización rostro-caudal de las regiones del *pallium* en peces cebra adultos.

Materiales y Métodos

1. Animales

Los experimentos fueron realizados con peces cebra (*Danio rerio*) de la línea AB *wild-type*, la línea *tg(NeuroD1:GCaMP6f)* y, para algunos experimentos de NOR, se utilizaron animales obtenidos de un acuario local. Los peces fueron criados hasta la adultez en un sistema de recirculación (ZS560, Aquaneering, San Diego, CA), con agua filtrada y aireada a $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.0-7.5$, y un ciclo de luz-oscuridad 14:10, en una densidad de 5 peces adultos/litro. Los peces fueron alimentados 3 veces al día con alimento balanceado (pellets y escamas) y *Artemia salina*. Para los experimentos se utilizaron adultos de ambos sexos de entre 10 ± 1 y 21 ± 1 meses de edad, según indicado. Durante todo el período de experimentación, los peces fueron alojados en peceras individuales de 1.4 litros. No se detectaron diferencias estadísticas entre sexos en ninguno de los datos obtenidos (tanto comportamentales como histológicos), por lo cual ambos fueron utilizados de manera indistinta en todos los experimentos de esta Tesis.



Figura 6.1: Sistema de recirculación de agua utilizado para la cría de pez cebra (*Danio rerio*). ZS560, Aquaneering, San Diego, CA.

2. Paradigmas Comportamentales

2.1. Reconocimiento de Objetos Novedosos

Dispositivo Experimental

Los animales utilizados para comportamiento fueron de peces comerciales de acuario e individuos de la línea AB *wild-type*.

Los peces fueron entrenados en una pecera cuadrada de acrílico (26 x 26 x 20, largo, ancho, alto) y en pecera rectangular de vidrio (30 x 15 x 18, largo, ancho, alto), según indicado en el texto. Ambas fueron revestidas internamente por placa de alto impacto blanca, para facilitar el trackeo de la trayectoria. Los objetos utilizados fueron fabricados con ladrillos Lego®, los cuales fueron fijados al fondo de la pecera utilizando un velcro.

Procedimiento Experimental

Entrenamiento

Los individuos fueron expuestos primeramente a objetos idénticos (T1), y luego a uno de los objetos previamente exhibido en T1, junto con un objeto novedoso (T2). Entre T1 y T2, se estableció un intervalo de retención (RI, por sus siglas en inglés), en el cual el individuo fue colocado en una pecera individual hasta iniciar T2. Esto constituyó una sesión de aprendizaje. Tanto T1, RI y T2 tuvieron una duración de 5 minutos cada uno. En los protocolos en los que se realizaron dos sesiones por día, estas fueron distribuidas una por la mañana y otra por la tarde.

Las habituaciones fueron realizadas en forma individual, durante 20 minutos o 24 horas, según indicado en el texto.

Tracking y Análisis de Trayectorias

Las trayectorias fueron detectadas con un software gratuito desarrollado por el Instituto Cajal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España), *IdTracker* (Pérez-Escudero, 2014). Una vez obtenidas las trayectorias, fueron ana-

lizadas con un programa diseñado *ad hoc*, escrito en MatLab®(ver *Apéndice*). Para el caso de la pecera cuadrada, se dividió a la pecera en cuatro cuadrantes, y se tomó como regiones de análisis los cuadrantes en los que se encontraban los objetos. En el caso de la pecera rectangular, se consideró un área de 40 píxeles respecto del centro del objeto.

Para analizar el tiempo de permanencia en cercanía de uno y otro objeto, se utilizó un Índice de Discriminación (I_D) definido como:

$$I_D = \frac{t_{Obj.Fam.} - t_{Obj.Nov.}}{t_{Obj.Fam.} + t_{Obj.Nov.}}.$$

2.2. Tarea de Constancia Espacial

Dispositivo Experimental

Todos los animales utilizados para comportamiento fueron de la línea AB *wild-type*.

Los peces fueron entrenados en una pecera cuadrada de vidrio de 30 x 30 cm, la cual fue totalmente cubierta externamente por plástico verde para evitar estímulos externos al dispositivo experimental. En su interior, se ubicó el dispositivo para la tarea de aprendizaje, el cual está formado por paneles de PVC verdes que delimitan una arena central en forma de rombo de 10 x 10 cm, a la cual se accede por dos compartimentos de entrada circulares, opuestos diagonalmente. Dichos compartimentos están delimitados por puertas removibles de PCV. Las dos esquinas restantes sirven de salida. Durante el entrenamiento, sólo una de ellas se mantiene abierta, mientras que la otra es bloqueada por una barrera transparente de vidrio (ver *Capítulo I*, Figura 2.9). En cada sesión, de manera aleatoria, solo uno de los compartimentos de inicio es usado, mientras que el acceso al otro es bloqueado con una barrera opaca. Las claves visuales consisten en dos paneles removibles idénticos que presentan distintos patrones de rayas (vertical, horizontal o diagonal) y colores (verde-blanco, negro-blanco, naranja-blanco). Los mismos fueron colocados en dos de las paredes del dispositivo. En las esquinas de la pecera, detrás de los compartimentos de inicio, se dispusieron dos recintos delimitados por barreras de vidrio donde se colocaron

conespecíficos a modo de recompensa (2 peces en cada compartimento). El sujeto no podía observar a los individuos en los recintos hasta tanto no saliera del dispositivo experimental. La pecera fue iluminada con dos lámparas LED, ubicadas en lados opuestos del tanque.

Procedimiento Experimental

Habitación

Dos días antes del entrenamiento, los peces fueron habituados a la pecera experimental. Durante la habitación, se les permitió a los individuos nadar libremente por todo el dispositivo, incluyendo las dos salidas. Durante esta etapa no se utilizaron claves, barrera de vidrio ni puertas a los compartimentos. La primer sesión de habitación fue de a grupos de 8, y una duración de 4hs. La segunda sesión fue individual, y para ésta fueron colocados los conespecíficos en los recintos. Para habitar a los peces a la manipulación y captura, se sometió a los individuos a 5 minutos de exploración 5 minutos de pesca 5 minutos de descanso 5 minutos de pesca (20 minutos totales). Para evitar estrés respiratorio en el individuo, no se utilizaron redes de pesca sino que la captura de los peces se realizó mediante el uso de un recipiente.

Entrenamiento

Los individuos fueron entrenados en grupos de 4. El entrenamiento consistió de sesiones diarias de 24 pruebas/trials cada una, divididas en dos turnos de 12 trials (mañana y tarde). Para cada trial, el individuo fue colocado en alguno de los compartimentos de entrada, en forma pseudorandom (es decir, siempre se mantuvo una proporción 50:50 para cada compartimento), y se le permitió el acceso a la arena romboidal mediante la remoción de la puerta. Una vez en la arena, se registró la primer decisión del individuo: si salía por la salida abierta se lo consideraba un acierto, y si chocaba contra la pared de vidrio, una falla. De manera que la variable utilizada para evaluar el aprendizaje fue el porcentaje de respuestas correctas durante cada sesión diaria. Una vez fuera del dispositivo, al individuo se le permitió explorar los recintos con conespecíficos durante 10 segundos. Luego de eso, fue

capturado y colocado en un recipiente hasta su próximo trial. Los peces del grupo de Entrenamiento fueron colocados en la pecera experimental en forma secuencial, de manera que entre trial y trial de cada individuo transcurre al menos un minuto.

Se estableció como criterio de aprendizaje una performance con al menos 70 % de respuestas correctas en la última sesión. El dispositivo experimental, las claves visuales y la barrera de vidrio fueron rotadas en forma consistente cada 5 trials, para evitar el uso de claves externas durante el entrenamiento. Para el grupo Control, la barrera de vidrio fue colocada en forma random en alguna de las dos salidas del dispositivo, de manera que los individuos no pudieran anticipar la localización de la salida. El resto de las condiciones fueron idénticas a las del grupo Entrenado.

3. Marcación con BrdU

Para la marcación de células en división, se colocó a los peces en una solución 5 mM de 5-bromo-2-desoxiuridina (Sigma) en agua de acuario, durante 24hs, pH=6.5-7.0. Los peces fueron colocados en grupos de hasta 16 individuos, a una razón de 50ml de solución/individuo durante 24 hs. Luego de ello, se los sometió a sucesivos recambios de agua durante los dos días subsiguientes, hasta que finalmente fueron reincorporados al sistema de recirculación.

4. Histología

4.1. Preparación del Tejido

Noventa minutos después de la última sesión de aprendizaje, los individuos fueron anestesiados en una solución de tricaina metanosulfonato 0.02 % (MS222, Sigma), y los cerebros fueron disecados y fijados en una solución de paraformaldehído (PFA) 4 % en buffer fosfato salino (PBS) 10mM durante 24hs. El tejido fue enjuagado en PBS, luego deshidratado en una solución de sacarosa 30 % en PBS durante 48 hs, y finalmente congelado en nitrógeno líquido, utilizando el medio de montaje para congelación Cryoplast®(Biopack). Los tejidos fueron almacenados a -20°C has-

ta su utilización. Se realizaron cortes coronales de telencéfalo de 20 μm , utilizando un crióstato entre $-16^{\circ}\text{C}/-20^{\circ}\text{C}$ (Microm, HM 550), los cuales fueron montados en portaobjetos cargados positivamente.

4.2. Inmunofluorescencia

El protocolo de inmunofluorescencia consistió en:

1. 3 lavados de 5 minutos en buffer tris salino (TBS) 1X, $\text{pH}=7.4$, a temperatura ambiente (T_{amb}).
2. 20 minutos de incubación en cloruro de amonio 100mM a T_{amb} .
3. 3 lavados de 5 minutos en 0.3 %-TritonX-100 TBS 1X a T_{amb}
4. 60 minutos de incubación en solución de bloqueo (Solución de bloqueo: 6 % seroalbúmina bovina, 6 % suero normal de cabra en 0.3 %-TritonX-100 TBS 1X) a T_{amb} .
5. 24hs incubación con anticuerpos primarios en solución de bloqueo a 4°C .
6. 4 lavados de 5 minutos en 0.3 %-TritonX-100 TBS 1X a T_{amb} .
7. 2hs incubación con anticuerpos secundarios en solución de bloqueo a T_{amb} .
8. 3 lavados de 5 minutos en 0.3 %-TritonX-100 TBS 1X a T_{amb} .
9. Montaje con Fluorescence Mounting Medium (Abcam).

Los vidrios fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

Para la detección de los antígenos BrdU y PCNA, se realizó un protocolo de recuperación de antígeno previo a la incubación en solución de bloqueo que consistió en:

1. 30 minutos de incubación en HCl 2N a 37°C .
2. 10 minutos de neutralización en buffer borato 0.1M ($\text{pH}=8.5$) a T_{amb} .

Para la detección de EdU se realizó, previo al montaje, un protocolo de revelado que consistió en:

1. Incubación de 30 minutos con cocktail de EdU: TBS 1X, CuSO_4 (4 mM), Sulfo-Cianina 3 Azida ($4\mu\text{M}$), Ascorbato de Sodio (100 mM).
2. 4 lavados de 5 minutos con TBS 1X con agitación a Tamb

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo policlonal de conejo anti-c-fos 1:1000 (sc-253, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anticuerpo monoclonal de rata anti-BrdU 1:500 (ab6326, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA 1:300 (PC10, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN 1:500 (ab104224, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuroD1 1:500 (ab60704, Abcam).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anticuerpos policlonales anti-Rata IgG Alexa Fluor 488 (ab150165, Abcam), anti-Ratón IgG Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam), anti-Conejo IgG Alexa Fluor 594 (ab150084, Abcam) y anti-Ratón IgG Alexa Fluor 594 (ab150120, Abcam), todos hechos en burro y utilizados en una dilución 1:500.

5. Análisis de Imágenes

Se tomaron 4 secciones por telencéfalo: rostral, rostro-medial, medio-caudal. Las secciones fueron elegidas de acuerdo al atlas topológico *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain* (Wullimann, 1996). La cuantificación de las distintas marcaciones se realizó a lo largo de todo el pallium telencefálico, a lo largo del eje rostro-caudal. Para delimitar las subdivisiones del pallium, se utilizó como referencia el estudio realizado por Ganz et. al, 2014. El área definida como pallium dorso-medial (Dm), fue considerada como pallium medial (MP). Las regiones descritas como pallium dorso-lateral (Dl) dorsal, ventral y posterior fueron consideradas en este trabajo como pallium lateral (LP).

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon (Eclipse e800) equipado con una cámara CCD (Leica DC350, FX). Para la co-

localización, se tomaron imágenes en un microscopio de excitación de dos fotones, ensamblado en el Laboratorio de Fotónica y Optoelectrónica (Centro Atómico Bariloche, CNEA). Las figuras fueron reconstruidas con el software Adobe Photoshop CS6, y el análisis fue realizado con el software FIJI (ImageJ v1.53).

6. Imágenes del Calcio

Los experimentos fueron realizados en preparados de telencéfalo completo, en los cuales se evaluó el cambio en la señal del calcio en respuesta a la estimulación de cLP. El setup para monitorear los cambios en las señales del calcio está compuesto por: microscopio motorizado (SOM, Sutter Instruments, Co.), equipado con un objetivo de 2.5X (Plan NeoFLUAR, Zeiss), una cámara sCMOS (Scientific CMOS, Quantalux, Thor Labs Inc.), una fuente de luz LED de alta intensidad (Lambda HPX-L5, Sutter Instruments, Inc.) y un set de filtros para GFP (MDF-GFP, ThorLabs, Inc.). La adquisición de imágenes y la administración del estímulo fueron sincronizados con el software SutterPatch 2.1.1 (Sutter Instruments, Co.) y adquiridos con el software ThorCam 3.2.0 (ThorLabs, Inc.) a 9 Hz. Los individuos fueron anestesiados en una solución de tricaina metanosulfonato 0.02 % (MS222, Sigma), colocados en una solución a 0°C de ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*, en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.3 ascorbato de Na⁺, 10 dextrosa) y posteriormente decapitados. Luego el encéfalo fue cuidadosamente extraído y pegado con cianocrilato a la cámara de registro. El tejido fue continuamente perfundido con ACSF con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂, y mantenido a temperatura ambiente. La estimulación en cLP fue administrada con un electrodo unipolar de acero, y consistió de un tren de 5 pulsos a 20Hz (70-90 μ A, 100 μ s). Los cambios en la señal del calcio luego de la estimulación en cLP fueron calculados como $\Delta F/F_0$, donde F_0 es la fluorescencia basal y ΔF es el cambio en la fluorescencia dependiente del tiempo, utilizando el software FIJI (ImageJ v1.53). Para la determinación de los dominios medial y lateral del *pallium*, se tomó como referencia la regionalización descrita por Dirian y col., 2014 (ver Figura 7.3 en *Apéndice*). Para cada subregión, se tomó un área circular sobre la cual se analizó el cambio en

la señal del calcio.

7. Análisis Estadístico

Los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados con los softwares GraphPad Prism 8 y R Studio. En todos ellos se graficó la media \pm el error estándar (ES). En el caso de gráficos de caja, se muestra la mediana, percentiles 25-75 % y valores mínimo y máximo. Para datos paramétricos, se realizaron t-test, tests de ANOVA de dos vías, en este último seguido de post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples. En el caso de que los datos no fueran paramétricos, se utilizó el test de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para muestras no pareadas, según correspondiese, y para muestras pareadas, el test de Wilcoxon de rangos. Los datos comportamentales se analizaron con regresiones lineales, y las diferencias en las pendientes de las mismas fueron analizadas con un test de ANCOVA. La normalidad de las muestras fue analizada con el test de Shapiro-Wilk, y la igualdad de las varianzas con el test de Levene. Todos los tests estadísticos tuvieron un intervalo de confianza del 95 % en los dos extremos la distribución de los datos.

Apéndice

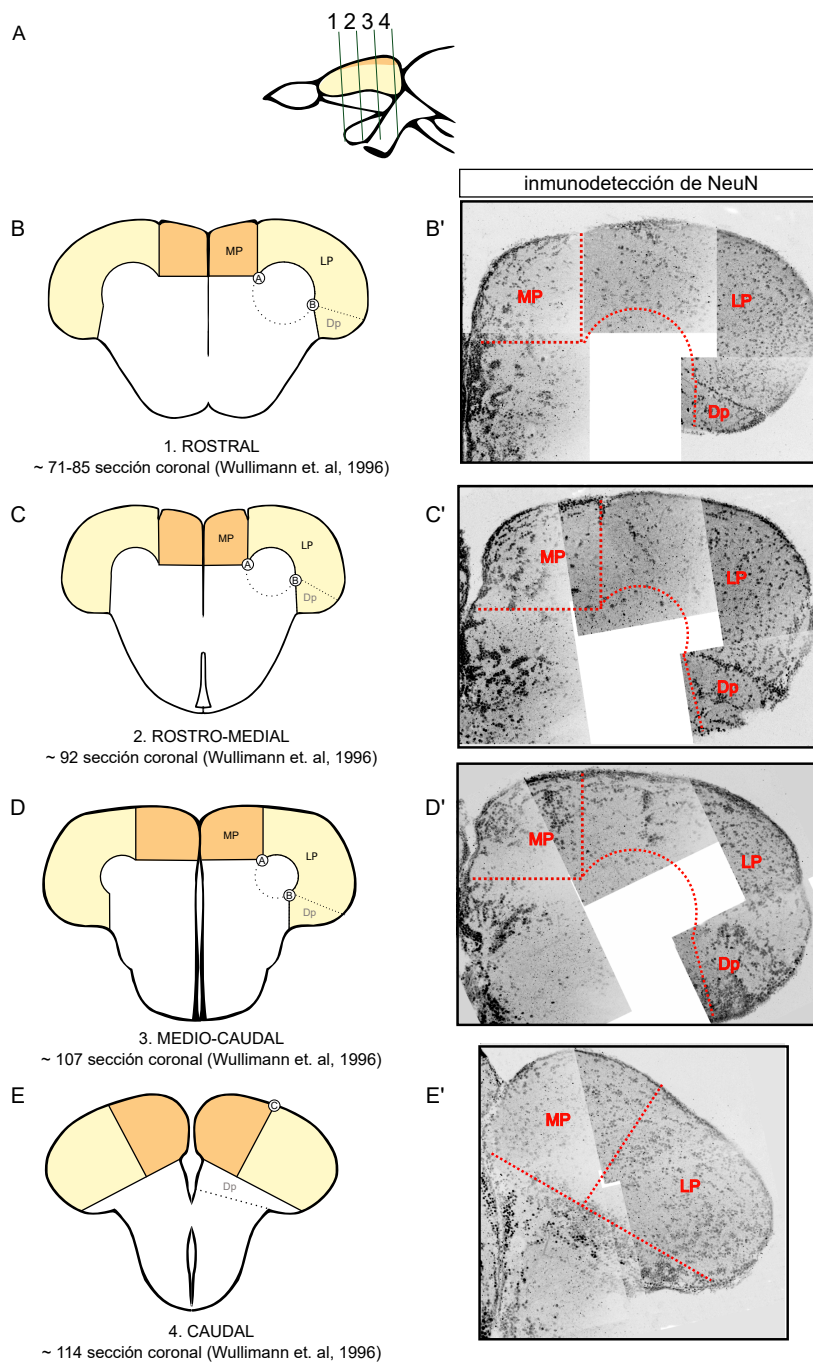


Figura 7.1: Vista esquemática sagital del encéfalo anterior del pez cebra, indicando la posición de las secciones coronales rostral (1), rostromedial (2), mediocaudal (3) y caudal (4). B-D. Secciones coronales esquemáticas rostral, rostromedial y mediocaudal, indicando las subregiones pallium medial (MP) y pallium lateral (LP). Los puntos de referencia A y B delimitan el borde paranquimal de LP. E. Sección coronal esquemática caudal. El punto de referencia C delimita el borde MP/LP. B'-E'. Secciones representativas de cada altura rostro-caudal, con inmunodetección del marcador de fenotipo neuronal maduro, NeuN. La línea punteada indica las subregiones MP y LP. A: punto de referencia definido como el borde ventro-parenquimal de MP; B: punto de referencia definido como el borde parenquimal del pallium dorso-posterior (Dp); C: punto de referencia para el borde de MP, definido como el 40 % del largo total del pallium caudal.

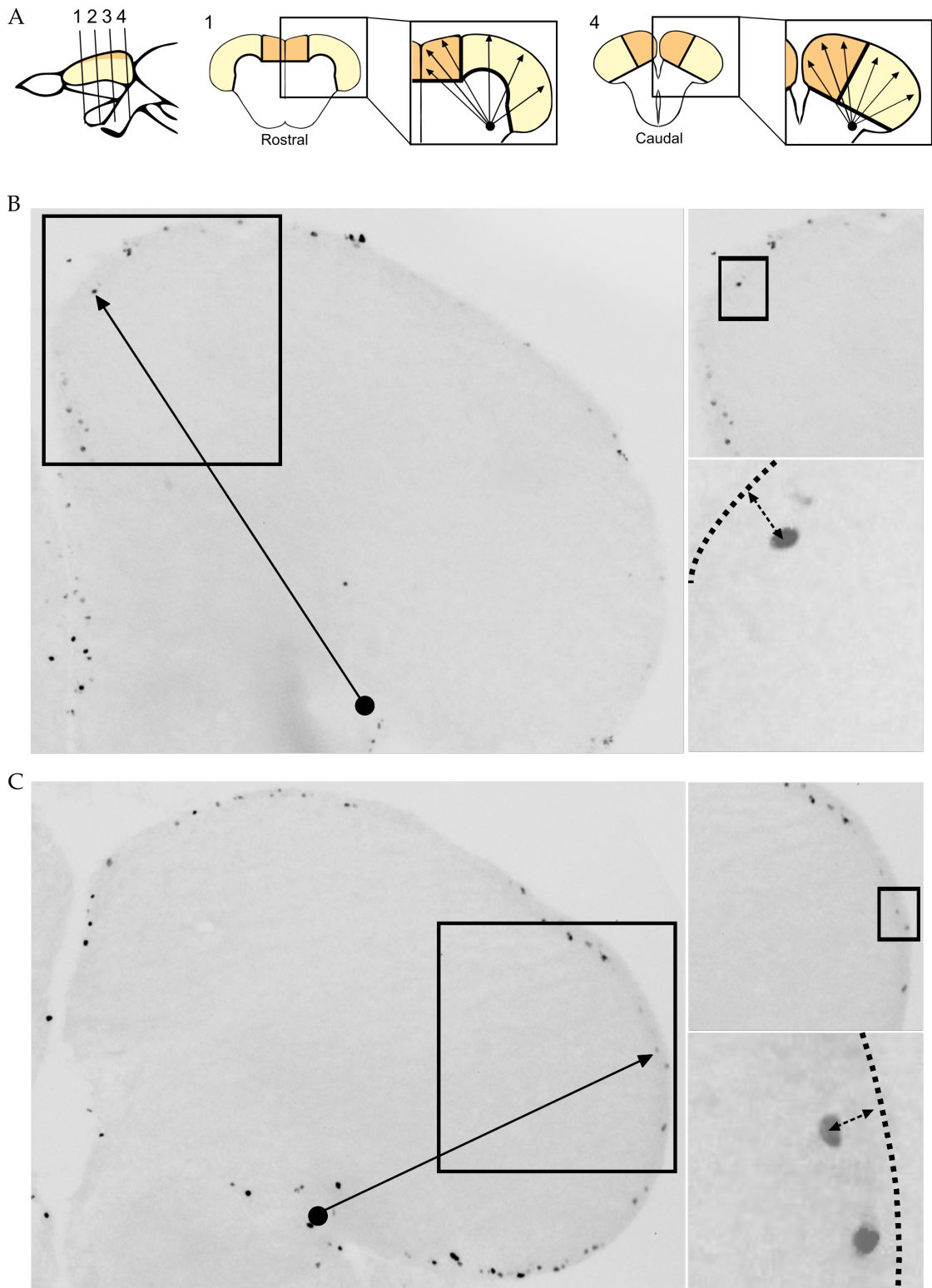


Figura 7.2: Vista esquemática sagital del encéfalo anterior del pez cebra (izquierda), indicando la posición de las secciones coronales rostral (1) y caudal (4) (derecha). Las magnificaciones de secciones esquemáticas indican el punto de referencia (punto negro) a partir del cual se extienden líneas virtuales radialmente hacia cada una de las células BrdU⁺. B-C. Secciones representativas de inmunofluorescencia para BrdU rostral (B) y caudal (C). Las flechas indican las líneas virtuales que unen las células BrdU⁺ y el punto de referencia para cada sección. Las cajas negras indican las sucesivas magnificaciones. Las flechas de doble punta representan la distancia de migración desde el borde del pallium.

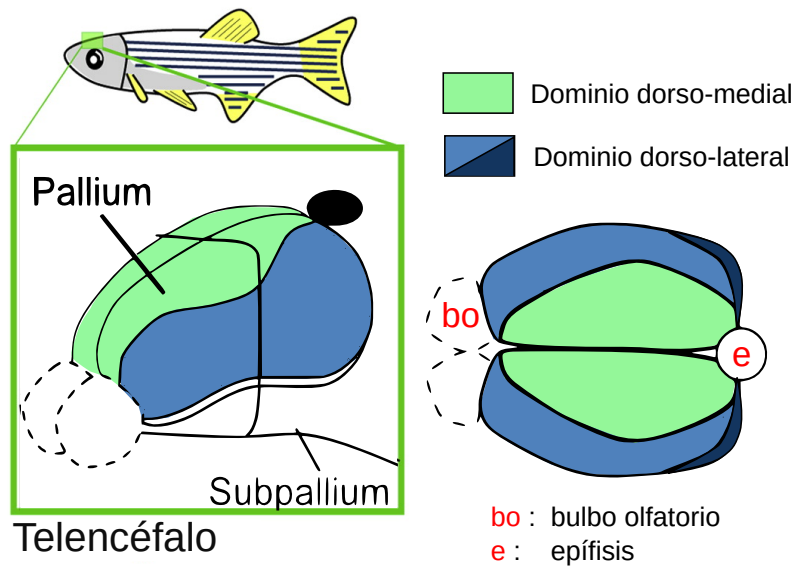


Figura 7.3: Dominios dorso-medial y dorso-lateral del pallium telencefálico, en vista lateral (izquierda) y dorsal (derecha). Extraído de Dirian y col., 2014.

Código para Análisis de Trayectorias del software IdTracker

```
1 clear all;
2 close all;
3 clc
4
5 while 1
6
7 directorio = uigetdir;
8 filePattern = fullfile(directorio, 'trajectories.mat');
9 matFiles = dir(filePattern);
10
11 for k = 1:length(matFiles)
12     baseFileName = matFiles(k).name;
13     fullFileName = fullfile(directorio, baseFileName);
14     storedStructure = load(fullFileName);
15 end
16
17 load(fullFileName)
18
19 x=trajectories(:, :, 1);
20 y=trajectories(:, :, 2);
21
22 [m, index] = max(~isnan(x), [], 1);
23 x(1:index)=[];
24 [m, index] = max(~isnan(y), [], 1);
25 y(1:index)=[];
26
27     prompt = 'Tiempo de Video (seg):';
28     size=inputdlg(prompt);
29     size=cell2mat(size);
30     size=str2num(size);
31     size=size*30;
32
33     i = 1:size;
34
```

```

35     x = x(i,1);
36     y = y(i,1);
37
38     figure(1)
39     N=ndhist(x,y,'numbins',8,'filt',15); % Heatmap
40     saveas(1, strcat(directorio, '\HeatMap'), 'fig')
41
42     while 1
43 for i = 2:size;
44     k = find(isnan(x));
45     x(k) = x(k-1);
46     continue
47 end
48
49 for i = 2:size;
50     k = find(isnan(y));
51     y(k) = y(k-1);
52     continue
53 end
54
55 i=1:size;
56
57 filePattern = fullfile(directorio, '*.png');
58 matFiles = dir(filePattern);
59 for k = 1:length(matFiles)
60     baseFileName = matFiles(k).name;
61     fullFileName = fullfile(directorio, baseFileName);
62     figure
63     storedStructure = imshow(fullFileName);
64 end
65 hold on
66 message = sprintf('Dibujar rectángulo sobre imagen.\n1ř Objeto ...
        FAMILIAR, 2ř Objeto NOVEDOSO');
67 uiwait(msgbox(message));
68 rect=imrect;
69 vector1=rect.getPosition;
70 rect=imrect;

```

```

71 vector2=rect.getPosition;
72
73 mat1 = vec2mat(vector1,4)
74 mat2 = vec2mat(vector2,4)
75
76 vectorfam=[mat1(1,1) mat1(1,2) mat1(1,3)+ mat1(1,1) mat1(1,4)+ ...
    mat1(1,2)];
77 vectornov=[mat2(1,1) mat2(1,2) mat2(1,3)+ mat2(1,1) mat2(1,4)+ ...
    mat2(1,2)];
78
79 Centroide1=[(vectorfam(1,1)+vectorfam(1,3))/2, ...
    (vectorfam(1,2)+vectorfam(1,4))/2]
80 Centroide2=[(vectornov(1,1)+vectornov(1,3))/2, ...
    (vectornov(1,2)+vectornov(1,4))/2]
81
82 %%%
83 prompt = 'Extensión en píxeles desde centro del Rectángulo (eje ...
    x) :';
84 extension= inputdlg(prompt);
85 extension=cell2mat(extension);
86 extension=str2num(extension);
87
88 vectorF=[Centroide1(1,1)-extension ...
    Centroide1(1,2)-(extension*1.5) 2*extension 3*extension];
89 vectorN=[Centroide2(1,1)-extension ...
    Centroide2(1,2)-(extension*1.5) 2*extension 3*extension];
90
91 rectangle('Position', [vectorF]);
92 rectangle('Position', [vectorN]);
93
94 vectorfam=[Centroide1(1,1)-extension ...
    Centroide1(1,2)-(extension*1.5) Centroide1(1,1)+extension ...
    Centroide1(1,2)+(extension*1.5)]
95 vectornov=[Centroide2(1,1)-extension ...
    Centroide2(1,2)-(extension*1.5) Centroide2(1,1)+extension ...
    Centroide2(1,2)+(extension*1.5)]
96

```

```

97 FAMILIAR=0;NOVEDOSO=0;TRAYECTORIA = 0;FAM1=0;
98 FAM2=0;FAM3=0;FAM4=0;FAM5=0;FAM6=0;FAM7=0;
99 FAM8=0;FAM9=0;FAM10=0;NOV1=0;NOV2=0;NOV3=0;
100 NOV4=0;NOV5=0;NOV6=0;NOV7=0;NOV8=0;NOV9=0;NOV10=0;
101
102 index = find(x > vectorfam(1,1) & x < vectorfam(1,3) & y > ...
    vectorfam(1,2) & y < vectorfam(1,4));
103 FAMILIAR = length(index);
104
105 index = find(x > vectornov(1,1) & x < vectornov(1,3) & y > ...
    vectornov(1,2) & y < vectornov(1,4));
106 NOVEDOSO = length(index);
107
108 if size ≥ 1800
109 index = find(x(1:1800) > vectorfam(1,1) & x(1:1800) < ...
    vectorfam(1,3) & y(1:1800) > vectorfam(1,2) & y(1:1800) < ...
    vectorfam(1,4));
110 FAM1 = length(index);
111 index = find(x(1:1800) > vectornov(1,1) & x(1:1800) < ...
    vectornov(1,3) & y(1:1800) > vectornov(1,2) & y(1:1800) < ...
    vectornov(1,4));
112 NOV1 = length(index);
113 end
114
115 if size ≥ 3600
116 index = find(x(1801:3600) > vectorfam(1,1) & x(1801:3600) < ...
    vectorfam(1,3) & y(1801:3600) > vectorfam(1,2) & ...
    y(1801:3600) < vectorfam(1,4));
117 FAM2 = length(index);
118 index = find(x(1801:3600) > vectornov(1,1) & x(1801:3600) < ...
    vectornov(1,3) & y(1801:3600) > vectornov(1,2) & ...
    y(1801:3600) < vectornov(1,4));
119 NOV2 = length(index);
120 end
121
122 if size ≥ 5400

```

```

123 index = find(x(3601:5400) > vectorfam(1,1) & x(3601:5400) < ...
        vectorfam(1,3) & y(3601:5400) > vectorfam(1,2) & ...
        y(3601:5400) < vectorfam(1,4));
124 FAM3 = length(index);
125 index = find(x(3601:5400) > vectornov(1,1) & x(3601:5400) < ...
        vectornov(1,3) & y(3601:5400) > vectornov(1,2) & ...
        y(3601:5400) < vectornov(1,4));
126 NOV3 = length(index);
127 end
128
129 if size ≥ 7200
130 index = find(x(5401:7200) > vectorfam(1,1) & x(5401:7200) < ...
        vectorfam(1,3) & y(5401:7200) > vectorfam(1,2) & ...
        y(5401:7200) < vectorfam(1,4));
131 FAM4 = length(index);
132 index = find(x(5401:7200) > vectornov(1,1) & x(5401:7200) < ...
        vectornov(1,3) & y(5401:7200) > vectornov(1,2) & ...
        y(5401:7200) < vectornov(1,4));
133 NOV4 = length(index);
134 end
135
136 if size ≥ 9000
137 index = find(x(7201:9000) > vectorfam(1,1) & x(7201:9000) < ...
        vectorfam(1,3) & y(7201:9000) > vectorfam(1,2) & ...
        y(7201:9000) < vectorfam(1,4));
138 FAM5 = length(index);
139 index = find(x(7201:9000) > vectornov(1,1) & x(7201:9000) < ...
        vectornov(1,3) & y(7201:9000) > vectornov(1,2) & ...
        y(7201:9000) < vectornov(1,4));
140 NOV5 = length(index);
141 end
142
143 if size ≥ 10800
144 index = find(x(9001:10800) > vectorfam(1,1) & x(9001:10800) < ...
        vectorfam(1,3) & y(9001:10800) > vectorfam(1,2) & ...
        y(9001:10800) < vectorfam(1,4));
145 FAM6 = length(index);

```

```

146 index = find(x(9001:10800) > vectornov(1,1) & x(9001:10800) < ...
      vectornov(1,3) & y(9001:10800) > vectornov(1,2) & ...
      y(9001:10800) < vectornov(1,4));
147 NOV6 = length(index);
148 end
149
150 if size ≥ 12600
151 index = find(x(10801:12600) > vectorfam(1,1) & x(10801:12600) < ...
      vectorfam(1,3) & y(10801:12600) > vectorfam(1,2) & ...
      y(10801:12600) < vectorfam(1,4));
152 FAM7 = length(index);
153 index = find(x(10801:12600) > vectornov(1,1) & x(10801:12600) < ...
      vectornov(1,3) & y(10801:12600) > vectornov(1,2) & ...
      y(10801:12600) < vectornov(1,4));
154 NOV7 = length(index);
155 end
156
157 if size ≥ 14400
158 index = find(x(12601:14400) > vectorfam(1,1) & x(10801:12600) < ...
      vectorfam(1,3) & y(10801:12600) > vectorfam(1,2) & ...
      y(10801:12600) < vectorfam(1,4));
159 FAM8 = length(index);
160 index = find(x(10801:12600) > vectornov(1,1) & x(10801:12600) < ...
      vectornov(1,3) & y(10801:12600) > vectornov(1,2) & ...
      y(10801:12600) < vectornov(1,4));
161 NOV8 = length(index);
162 end
163
164 if size ≥ 14400
165 index = find(x(12601:14400) > vectorfam(1,1) & x(10801:12600) < ...
      vectorfam(1,3) & y(10801:12600) > vectorfam(1,2) & ...
      y(10801:12600) < vectorfam(1,4));
166 FAM8 = length(index);
167 index = find(x(10801:12600) > vectornov(1,1) & x(10801:12600) < ...
      vectornov(1,3) & y(10801:12600) > vectornov(1,2) & ...
      y(10801:12600) < vectornov(1,4));
168 NOV8 = length(index);

```

```

169 end
170
171 if size ≥ 16200
172 index = find(x(14401:16200) > vectorfam(1,1) & x(14401:16200) < ...
        vectorfam(1,3) & y(14401:16200) > vectorfam(1,2) & ...
        y(14401:16200) < vectorfam(1,4));
173 FAM10 = length(index);
174 index = find(x(14401:16200) > vectornov(1,1) & x(14401:16200) < ...
        vectornov(1,3) & y(14401:16200) > vectornov(1,2) & ...
        y(14401:16200) < vectornov(1,4));
175 NOV10 = length(index);
176 end
177
178 if size ≥ 18000
179 index = find(x(16201:18000) > vectorfam(1,1) & x(16201:18000) < ...
        vectorfam(1,3) & y(16201:18000) > vectorfam(1,2) & ...
        y(16201:18000) < vectorfam(1,4));
180 FAM10 = length(index);
181 index = find(x(16201:18000) > vectornov(1,1) & x(16201:18000) < ...
        vectornov(1,3) & y(16201:18000) > vectornov(1,2) & ...
        y(16201:18000) < vectornov(1,4));
182 NOV10 = length(index);
183 end
184
185 for i = 2:size;
186     a = x(i,1)- x(i-1,1);
187     b = y(i,1)-y(i-1,1);
188     c = sqrt(a^2 + b^2);
189     TRAYECTORIA = TRAYECTORIA + c;
190 end
191
192 figure(3)
193 plot(x,y);
194 hold on
195 rectangle('Position', [vectorF])
196 rectangle('Position', [vectorN])
197 hold off

```

```

198 saveas(3, strcat(directorio, '\Plot'), 'fig')
199
200 DI = (FAMILIAR - NOVEDOSO)/(FAMILIAR + NOVEDOSO);
201
202 msgbox(sprintf('Objeto Familiar: %d / Objeto Novedoso: ...
    %d\nObjeto Familiar (minuto 1): %d / Objeto Novedoso (minuto ...
    1): %d\nObjeto Familiar (minuto 2): %d / Objeto Novedoso ...
    (minuto 2): %d\nObjeto Familiar (minuto 3): %d / Objeto ...
    Novedoso (minuto 3): %d\nObjeto Familiar (minuto 4): %d / ...
    Objeto Novedoso (minuto 4): %d\nObjeto Familiar (minuto 5): ...
    %d / Objeto Novedoso (minuto 5): %d\nObjeto Familiar (minuto ...
    6): %d / Objeto Novedoso (minuto 6): %d\nObjeto Familiar ...
    (minuto 7): %d / Objeto Novedoso (minuto 7): %d\nObjeto ...
    Familiar (minuto 8): %d / Objeto Novedoso (minuto 8): ...
    %d\nObjeto Familiar (minuto 9): %d / Objeto Novedoso (minuto ...
    9): %d\nObjeto Familiar (minuto 10): %d / Objeto Novedoso ...
    (minuto 10): %d\n Trayectoria: %f\n Indice de ...
    discriminacion: %f', ...
    FAMILIAR, NOVEDOSO, FAM1, NOV1, FAM2, NOV2, FAM3, NOV3,
203 FAM4, NOV4, FAM5, NOV5, FAM6, NOV6, FAM7, NOV7, FAM8, NOV8,
204 FAM9, NOV9, FAM10, NOV10, TRAYECTORIA, DI));
205
206 path_file=fullfile(directorio, 'NOR-Rectángulos.txt')
207 fileID = fopen(path_file, 'w');
208 fprintf(fileID, '\t %s\t %s\r\n', 'Familiar', 'Novedoso');
209 fprintf(fileID, ' %s\t %d\t %d\r\n', 'Total', FAMILIAR, NOVEDOSO);
210 fprintf(fileID, ' %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r
211 \n %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r
212 \n %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r\n %s\t %d\t %d\r\n', 'Intervalo ...
    1', FAM1, NOV1, 'Intervalo 2', FAM2, NOV2, 'Intervalo ...
    3', FAM3, NOV3, 'Intervalo 4', FAM4, NOV4, 'Intervalo ...
    5', FAM5, NOV5, 'Intervalo 6', FAM6, NOV6, 'Intervalo ...
    7', FAM7, NOV7, 'Intervalo 8', FAM8, NOV8, 'Intervalo ...
    9', FAM9, NOV9, 'Intervalo 10', FAM10, NOV10);
213 fprintf(fileID, ' %s\t %f\r\n %s\t %f\r\n', 'Trayectoria', TRAYECTORIA',
214 'Indice de Discriminacion', DI);

```



```
215 fprintf(fileID, '%s\t%f\t%f\r\n%s\t%f\t%f\r\n', 'Objeto Familiar ...  
    (coordenadas)', Centroidel(1,1), Centroidel(1,2), 'Objeto ...  
    Novedoso (coordenadas)', Centroide2(1,1), Centroide2(1,2));  
216 fprintf(fileID, '%s\t%d\r\n', 'Extensión desde el centro del ...  
    Objeto', extension);  
217 fclose(fileID);
```

Abreviaturas

NOR: Reconocimiento de Objeto Novedoso (*Novel Object Recognition*)

SCT: Tarea de Constancia Espacial (*Spatial Constancy Task*)

BrdU: 5-Bromo-2'-deoxiuridina

EdU: 5-Etínil-2'-deoxiuridina

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

NeuN: Antígeno Nuclear Neuronal (*Neuronal Nuclear Antigen*)

NSC: Célula madre neuronal (Neural Stem Cell)

rNSC: NSC de reservorio

oNSC: NSC operativas

MP: pallium medial

LP: pallium lateral

rMP: pallium medial-rostral

cLP: pallium lateral-caudal

Dm: telencéfalo dorso-medial

Dl: telencéfalo dorso-lateral

Dc: telencéfalo dorso-central

Dp: telencéfalo dorso-posterior

dpi: días post inmersión

Referencias

- A. Barnea & Nottenbhom, F. (1994). Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *PNAS*, *91*, 11217-11221.
- Aasebø, I. E. J., Kasture, A. S., Passeggeri, M. & Tashiro, A. (2018). A behavioral task with more opportunities for memory acquisition promotes the survival of new neurons in the adult dentate gyrus. *Scientific reports*, *8*(7369), 1-11.
- Adams, M. M. & Kafaligonul, H. (2018). Zebrafish A Model Organism for Studying the Neurobiological Mechanisms Underlying Cognitive Brain Aging and Use of Potential Interventions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*, 1-5.
- Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M. & Bally-Cuif, L. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental biology*, *295*(1), 278-93.
- Agetsuma, M., Aizawa, H. & Aoki, T. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nature neuroscience*, *13*(11), 1354-1356.
- Alonso, M., Gabellec, M.-m., Meas-yedid, V. & Lledo, P.-m. (2006). Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, *26*(41), 10508-10513.
- Altman, J. & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of post-natal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, *124*(3), 319-336.
- Alvarez, D. D., Giacomini, D., Yang, S. M., Trincherro, M. F., Temprana, S. G., Büttner, K. A., Beltramone, N. & Schinder, A. F. (2016). A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells, *459*(March).
- Alvarez-buylla, A., Kirn, J. R. & Notrebohm, F. (1990). Birth of Projection Neurons in Adult Avian Brain May Be Related to Perceptual or Motor Learning. *Science*, *249*(4975), 1444-1446.
- Ampatzis, K., Makantasi, P. & Dermon, C. R. (2012). Cell proliferation pattern in adult zebrafish forebrain is sexually dimorphic. *Neuroscience*, *226*, 367-381.
- Anderson, M. L., Sisti, H. M., Ii, D. M. C. & Shors, T. J. (2011). Associative learning increases adult neurogenesis during a critical period. *European Journal of Neuroscience*, *33*, 175-181.

- Antunes, M. & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory : neurobiology , test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13, 93-110.
- Aoki, T., Kinoshita, M., Aoki, R., Agetsuma, M., Aizawa, H., Yamazaki, M., Takahoko, M., Amo, R., Arata, A., Higashijima, S. I., Tsuboi, T. & Okamoto, H. (2013). Imaging of neural ensemble for the retrieval of a learned behavioral program. *Neuron*, 78(5), 881-894.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. & Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature medicine*, 8(9), 963-70.
- Ausas, M. S., Mazzitelli-Fuentes, L., Ruth, F., Crichigno, S. A., De Vincenti, A. P. & Mongiat, L. A. (2018). Social isolation impairs active avoidance performance and decreases neurogenesis in the dorsomedial telencephalon of rainbow trout Maria. *Physiology & Behavior*, 198, 1-10.
- Avdesh, A., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Chen, M., Askraba, S., Morgan, N., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G. & Martins, R. N. (2012). Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2), 459-469.
- Barnes, C. A. (1979). Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93, 74-104.
- Bault, Z. A., Peterson, S. M. & Freeman, J. L. (2015). Directional and color preference in adult zebrafish: Implications in behavioral and learning assays in neurotoxicology studies. *Journal of Applied Toxicology*, 35(12), 1502-1510.
- Bellenchi, G. C., Volpicelli, F., Piscopo, V., Perrone-Capano, C. & Di Porzio, U. (2013). Adult neural stem cells: An endogenous tool to repair brain injury? *Journal of Neurochemistry*, 124(2), 159-167.
- Bizon, J. L. & Gallagher, M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan : relation to cognitive decline. *European Journal of Neuroscience*, 18, 215-219.
- Blank, M., Guerim, L. D., Cordeiro, R. F. & Vianna, M. R. M. (2009). A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(4), 529-534.
- Bonfanti, L., Rossi, F. & Zupanc, G. (2011). Towards a comparative understanding of adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 845-846.
- Bosch, T. J., Maslam, S. & Roberts, B. L. (2001). Fos-Like Immunohistochemical Identification of Neurons Active During the Startle Response of the Rainbow Trout. *Journal of Comparative Neurology*, 439, 306-314.
- Braida, D., Ponzoni, L., Martucci, R. & Sala, M. (2014). A new model to study visual attention in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, 80-86.
- Broglio, C., Rodríguez, F., Gómez, A., Arias, J. L. & Salas, C. (2010). Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behavioural Brain Research*, 210, 191-201.

- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S. & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, *56*(2), 337-344.
- Chapouton, P., Jagasia, R. & Bally-Cuif, L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays*, *29*, 745-757.
- Chapouton, P., Skupien, P., Hesel, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N. D. & Bally-Cuif, L. (2010). Notch Activity Levels Control the Balance between Quiescence and Recruitment of Adult Neural Stem Cells. *Journal of Neuroscience*, *30*(23), 7961-7974.
- Chatterjee, D., Tran, S., Shams, S. & Gerlai, R. (2015). A Simple Method for Immunohistochemical Staining of Zebrafish Brain Sections for c-fos Protein Expression. *Zebrafish*, *12*(6), 1-7.
- Chou, M. Y., Amo, R., Kinoshita, M., Chheng, B. W., Shimazaki, H., Agetsuma, M., Shiraki, T., Aoki, T., Takahoko, M., Yamazaki, M., Ichi Higashijima, S. & Okamoto, H. (2016). Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science*, *352*(6281), 87-90.
- Clint, S. C. & Zupanc, G. (2001). Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia. *130*, 15-23.
- Daggett, J. M., Brown, V. J. & Brennan, C. H. (2019). Food or friends? What motivates zebrafish (*Danio rerio*) performing a visual discrimination. *Behavioural Brain Research*, *359*(October 2018), 190-196.
- Dirian, L., Galant, S., Coolen, M., Chen, W., Bedu, S., Houart, C., Bally-Cuif, L. & Foucher, I. (2014). Spatial Regionalization and Heterochrony in the Formation of Adult Pallial Neural Stem Cells. *Developmental Cell*, *30*(2), 123-136.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aourousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.-V. & Abrous, D. N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(24), 14385-14390.
- Dray, N., Bedu, S., Vuillemin, N., Alunni, A., Coolen, M., Krecsmarik, M., Supatto, W., Beaurepaire, E. & Bally-Cuif, L. (2015). Large-scale live imaging of adult neural stem cells in their endogenous niche. *Development*, *142*(20), 3592-3600.
- Durán, E., Ocaña, F. M., Broglio, C., Rodríguez, F. & Salas, C. (2010). Lateral but not medial telencephalic pallium ablation impairs the use of goldfish spatial allocentric strategies in a "hole-board" task. *Behavioural Brain Research*, *214*(2), 480-487.
- Durán, E., Ocaña, F. M., Gómez, A., Jiménez-Moya, F., Broglio, C., Rodríguez, F. & Salas, C. (2008). Telencephalon ablation impairs goldfish allocentric spatial learning in a "hole-board" task. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *68*(4), 519-525.
- Ekström, P., Hohnsson, C.-M. & Ohlin, L.-M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres

- and migration (secondary matrix) zones. *Journal of Comparative Neurology*, *436*(1), 92-110.
- Elliott, S. B., Harvey-Girard, E., Giassi, A. C. C. & Maler, L. (2017). Hippocampal-like circuitry in the pallium of an electric fish: Possible substrates for recursive pattern separation and completion. *Journal of Comparative Neurology*, *525*(1), 8-46.
- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats . 1 : Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*, 47-59.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, a. M., Nordborg, C., Peterson, D. a. & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, *4*(11), 1313-1317.
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. a., Morgenstern, N. a., Ferrari, C. C., Pittossi, F. J. & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(44), 10074-10086.
- Faillace, M., Pisera-Fuster, A., Medrano, M., Bejarano, A. & Bernabeu, R. (2017). Short- and long-term effects of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish. *Psychopharmacology*, *234*(6), 943-955.
- Farmer, J., Zhao, X., Van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H. & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague-dawley rats in vivo. *Neuroscience*, *124*(1), 71-79.
- Folgueira, M., Anadón, R. & Yáñez, J. (2004a). An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: Olfactory bulb and ventral area. *Journal of Comparative Neurology*, *480*(2), 180-203.
- Folgueira, M., Anadón, R. & Yáñez, J. (2004b). Experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: Dorsal area and preoptic region. *Journal of Comparative Neurology*, *480*(2), 204-233.
- Folgueira, M., Bayley, P., Navratilova, P., Becker, T. S., Wilson, S. W. & Clarke, J. D. (2012). Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Development*, *7*(1), 32.
- Furlan, G., Cuccioli, V., Vuillemin, N., Dirian, L., Muntasell, A. J., Coolen, M., Dray, N., Bedu, S., Houart, C., Beaurepaire, E., Foucher, I. & Bally-Cuif, L. (2017). Life-Long Neurogenic Activity of Individual Neural Stem Cells and Continuous Growth Establish an Outside-In Architecture in the Teleost Pallium. *Current Biology*, *27*(21), 3288-3301.e3.
- Ganz, J., Kaslin, J., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M. & Brand, M. (2014). Subdivisions of the adult zebrafish pallium by molecular marker analysis. *Journal of Comparative Neurology*, *520*(3), 633-655.
- Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., Kaslin, J. & Brand, M. (2015). Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000 Research*, *3*(3), 1-18.

- Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. a., Kitabatake, Y., Ming, G.-l. & Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, *439*(7076), arXiv NIHMS150003, 589-593.
- Ge, S., Yang, C. H., Hsu, K. S., Ming, G. L. & Song, H. (2007). A Critical Period for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain. *Neuron*, *54*(4), arXiv NIHMS150003, 559-566.
- Gilbert, S. (2003). *Developmental Biology* (7th), 1-881.
- Goldman, S. A. & Nottebohm, F. (1983). Neuronal Production, Migration, and Differentiation in a Vocal Control Nucleus of the Adult Female Canary Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(8), 2390-2394.
- Gómez, Y., Vargas, J. P., Portavella, M. & López, J. C. (2006). Spatial learning and goldfish telencephalon NMDA receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*(3), 252-262.
- Gould, E., Beylin, a., Tanapat, P., Reeves, a. & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, *2*(3), 260-265.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I. & Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental Biology*, *295*(1), 263-277.
- Hamilton, T. J., Myggland, A., Duperreault, E., May, Z., Gallup, J., Powell, R. A., Schalomon, M. & Digweed, S. M. (2016). Episodic-like memory in zebrafish. *Animal Cognition*, *19*(6), 1071-1079.
- Holmgren, N. (1922). Points of view concerning forebrain morphology in lower vertebrates. *J Comp Neurol*, *34*, 391-459.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498-503.
- Ingle, D. & Sahagian, D. (1973). Solution of a spatial constancy problem by goldfish. *Physiological Psychology*, *1*(1 (1)), 83-84.
- Karnik, I. & Gerlai, R. (2012). Can zebrafish learn spatial tasks? An empirical analysis of place and single CSUS associative learning. *Behavioural Brain Research*, *233*(2), 415-421.
- Kaslin, J., Ganz, J. & Brand, M. (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *363*(1489), 101-122.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.
- Kempermann, G. (2002). Why New Neurons ? Possible Functions for Adult Hippocampal. *The Journal of Neuroscience*, *22*(3), 635-638.
- Kempermann, G. (2012). New neurons for 'survival of the fittest'. *Nature reviews. Neuroscience*, *13*(10), 727-36.

- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *16*(6), 2027-2033.
- Labusch, M., Mancini, L., Morizet, D. & Bally-Cuif, L. (2020). Conserved and Divergent Features of Adult Neurogenesis in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(June), 1-28.
- Lamprecht, R. & Ledoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*, 45-54.
- Lange, C., Rost, F., Machate, A., Reinhardt, S., Lesche, M., Weber, A., Kuscha, V., Dahl, A., Rulands, S. & Brand, M. (2020). Single cell sequencing of radial glia progeny reveals the diversity of newborn neurons in the adult zebrafish brain. *Development (Cambridge, England)*, *147*(1).
- Lau, B. Y. B., Mathur, P., Gould, G. G. & Guo, S. (2011). Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *PNAS*, *108*(6), 2581-2586.
- Lepousez, G., Nissant, A. & Lledo, P. M. (2015). Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. *Neuron*, *86*(2), 387-401.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E. & Shors, T. J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(34), 7477-7481.
- Leuner, B., Gould, E. & Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, *16*(3), 216-224.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. a., Ming, G.-l. & Gage, F. H. (2004). Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *44*(1), 399-421.
- Lindsey, B. W., Di Donato, S., Kaslin, J. & Tropepe, V. (2014). Sensory-specific modulation of adult neurogenesis in sensory structures is associated with the type of stem cell present in the neurogenic niche of the zebrafish brain. *European Journal of Neuroscience*, *40*(11), 3591-3607.
- Lledo, P.-M., Alonso, M. & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*(3), 179-193.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, a. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(5), 2074-2077.
- López, J. C., Broglio, C., Rodríguez, F., Thinus-Blanc, C. & Salas, C. (2000). Reversal learning deficit in a spatial task but not in a cued one after telencephalic ablation in goldfish. *Behavioural Brain Research*, *109*(1), 91-98.
- Lucon-Xiccato, T. & Dadda, M. (2014). Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behavioural Processes*, *106*, 1-4.
- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E. G., Bolwig, T. G. & Wörtwein, G. (2003). Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*, *119*(3), 635-642.

- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., Lam, C. S., Kah, O., Bally-Cuif, L. & Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia*, *58*(7), 870-88.
- May, Z., Morrill, A., Holcombe, A., Johnston, T., Gallup, J., Fouad, K., Schalomon, M. & Hamilton, T. J. (2016). Object recognition memory in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, *296*, 199-210.
- Medina, L., Brox, A., Legaz, I., Garc, M. & Puelles, L. (2005). Expression patterns of developmental regulatory genes show comparable divisions in the telencephalon of *Xenopus* and mouse : insights into the evolution of the forebrain. *Brain Research Bulletin*, *66*, 297-302.
- Miller, M. W. & Nowakowski, R. S. (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Research*, *457*(1), 44-52.
- Mongiati, L. A., Ausas, M. S. & Mazzitelli Fuentes, L. (2015). Neurogénesis Adulta: La Capacidad de Generar Nuevas Neuronas. *Desde la Patagonia, Difundiendo Saberes*, *12*(19), 10-21.
- Mongiati, L. A. & Schinder, A. F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *The European journal of neuroscience*, *33*(6), 1055-61.
- Moretz, J. A., Martins, E. P. & Robison, B. D. (2007). Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology*, *18*(3), 556-562.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *11*(1), 47-60.
- Mu, Y., Lee, S. W. & Gage, F. H. (2010). Signaling in adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, *20*(4), 416-423.
- Mueller, T. & Wullmann, M. F. (2009). An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain, behavior and evolution*, *74*(1), 30-42.
- Nam, R.-h., Kim, W. & Lee, C.-j. (2004). NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. *Neuroscience Letters*, *370*, 248-251.
- Ng, M. C., Tang, T. H., Ko, M. C., Wu, Y. J., Hsu, C. P., Yang, Y. L. & Lu, K. T. (2012). Stimulation of the lateral division of the dorsal telencephalon induces synaptic plasticity in the medial division of adult zebrafish. *Neuroscience Letters*, *512*(2), 109-113.
- Nieuwenhuys, R. (2009). The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain, Behavior and Evolution*, *73*, 229-252.
- Northcutt, R. G. (2006). Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *Journal of Comparative Neurology*, *494*(6), 903-943.
- Northcutt, R. G. (2008). Forebrain evolution in bony fishes. *Brain Research Bulletin*, *75*(2-4), 191-205.
- Northcutt, R. G. & Braford, M. R. (1980). New Observations on the Organization and Evolution of the Telencephalon of Actinopterygian Fishes (S. Ebbesson,

- Ed.). En S. Ebbesson (Ed.), *Comparative Neurology of the Telencephalon*. Springer, Boston, MA.
- Ocaña, F. M., Uceda, S., Arias, J. L., Salas, C. & Rodríguez, F. (2017). Dynamics of Goldfish Subregional Hippocampal Pallium Activity throughout Spatial Memory Formation. *Brain, Behavior and Evolution*, *90*, 154-170.
- Oliveira, J., Silveira, M., Chacon, D. & Luchiari, A. (2015). The Zebrafish World of Colors and Shapes: Preference and Discrimination. *Zebrafish*, *00*(00), 150212075251004.
- Opendak, M. & Gould, E. (2015). Adult neurogenesis: A substrate for experience-dependent change. *Trends in Cognitive Sciences*, 1-11.
- Overstreet, L. S., Hentges, S. T., Bumashny, V. F., de Souza, F. S. J., Smart, J. L., Santangelo, A. M., Low, M. J., Westbrook, G. L. & Rubinstein, M. (2004). A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(13), 3251-3259.
- Parent, J. M. & Lowenstein, D. H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: Are more new neurons good for an adult brain? *Progress in Brain Research*, *135*, 121-131.
- Paton, J. a. & Nottebohm, F. N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science (New York, N.Y.)*, *225*(4666), 1046-1048.
- Peeters, B. W., Moeskops, M. & Veenliet, A. R. (2016). Color Preference in Danio rerio: Effects of Age and Anxiolytic Treatments. *Zebrafish*, *13*(4), 330-334.
- Pinheiro-da-Silva, J., Silva, P. F., Nogueira, M. B. & Luchiari, A. C. (2017). Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (Danio rerio). *Animal Cognition*, *20*(2), 159-169.
- Portavella, M., Salas, C., Vargas, J. P. & Papini, M. R. (2003). Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Physiology and Behavior*, *80*(1), 49-56.
- Portavella, M., Torres, B. & Salas, C. (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(9), 2335-2342.
- Prickaerts, J., Koopmans, G., Blokland, A. & Scheepens, A. (2004). Learning and adult neurogenesis : Survival with or without proliferation? *Neurobiology of Learning and Memory*, *81*, 1-11.
- Purves, D. (2004). *Neuroscience* (D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara & S. M. Williams, Eds.; Third). Sunderland, Massachusetts, USA.
- Pushchina, E. V., Varaksin, a. a. & Romanov, N. S. (2003). Neuronal organization of the telencephalon in the chum salmon *Onchorhynchus keta*. *Russian Journal of Marine Biology*, *29*(6), 362-367.
- Rakic, P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science*, *227*(4690), 1054-1056.
- Reynolds, B. a. & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*(5052), 1707-10.

- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J. & Bartlett, P. F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(September), 8591-8595.
- Rink, E. & Wullimann, M. F. (1998). Some Forebrain Connections of the Gustatory System in the Goldfish *Carassius Auratus* Visualized by Separate DiI Application to the Hypothalamic Inferior Lobe and the. *The Journal of comparative neurology*, 170, 152-170.
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-d. & Lledo, P.-m. (2002). Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory, *22*(7), 2679-2689.
- Rodríguez, F., López, J. C., Vargas, J. P., Gómez, Y., Broglio, C. & Salas, C. (2002). Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), 2894-2903.
- Rothenaigier, I., Kreksmarik, M., Hayes, J. a., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Götz, M., Jagasia, R. & Bally-Cuif, L. (2011). Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development (Cambridge, England)*, 138(8), 1459-1469.
- Ruhl, T., Zeymer, M. & von der Emde, G. (2017). Cannabinoid modulation of zebrafish fear learning and its functional analysis investigated by c-Fos expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 153, 18-31.
- Ryu, J. R., Hong, C. J., Kim, J. Y., Kim, E. K., Sun, W. & Yu, S. W. (2016). Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Molecular Brain*, 9(1), 1-20.
- Sailor, K. A., Schinder, A. F. & Lledo, P.-m. (2016). Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 111-117.
- Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., Yamaguchi, M., Fishell, G., Mori, K., Kageyama, R. & Imayoshi, I. (2014). Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *Journal of Neuroscience*, 34(17), 5788-5799.
- Salas, C., Broglio, C., Durán, E., Gómez, A., Ocaña, F. M., Jiménez-Moya, F. & Rodríguez, F. (2006). Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish*, 3(2), 157-171.
- Sato, Y., Yano, H., Shimizu, Y., Tanaka, H. & Ohshima, T. (2016). Optic Nerve Input-Dependent Regulation of Neural Stem Cell Proliferation in the Optic Tectum of Adult Zebrafish. *Developmental Biology*, 77, 474-482.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, a. D. R., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R. & Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17501-17506.

- Schoenfeld, T. J. & Gould, E. (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology*, *233*(1), 12-21.
- Seki, T. & Arai, Y. (1993). Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *13*(June), 2351-2358.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories, *410*(MARCH).
- Sidman, R. L., Miale, I. L. & Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental Neurology*, *1*(4), 322-333.
- Sison, M. & Gerlai, R. (2010). Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research*, *207*(1), 99-104.
- Sison, M. & Gerlai, R. (2011). Behavioral performance altering effects of MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, *220*(2), 331-337.
- Smith, D. M. & Mizumori, S. J. Y. (2006). Hippocampal Place Cells , Context, and Episodic Memory. *Hippocampus*, *16*, 716-729.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. & Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, *130*(4), 843-852.
- Spence, R. & Smith, C. (2008). Innate and learned colour preference in the zebrafish, *Danio rerio*. *Ethology*, *114*(6), 582-588.
- Strobl-Mazzulla, P. H., Nuñez, A., Pellegrini, E., Gueguen, M. M., Kah, O. & Sommoza, G. M. (2010). Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain, Behavior and Evolution*, *76*(1), 20-31.
- Sweatt, J. D. (2010). *Rodent Behavioral Learning and Memory Models* (Second Edi). Elsevier Inc.
- Tashiro, A., Makino, H. & Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(12), 3252-3259.
- Than-Trong, E., Kiani, B., Dray, N., Ortica, S., Simons, B., Rulands, S., Alunni, A. & Bally-cuif, L. (2020). Lineage hierarchies and stochasticity ensure the long-term maintenance of adult neural stem cells, *2*(April), 26-29.
- Toda, T., Gage, F. H. & Gage, F. H. (2017). Adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research*, *373*, 693-709.
- Uceda, S., Ocaña, F. M., Martín-Monzón, I., Rodríguez-Expósito, B., Durán, E. & Rodríguez, F. (2015). Spatial learning-related changes in metabolic brain activity contribute to the delimitation of the hippocampal pallium in goldfish. *Behavioural Brain Research*, *292*, 403-408.
- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J. & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13427-13431.

- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D. & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, *415*(6875), 1030-4.
- Vargas, J. P., Rodríguez, F., López, J. C., Arias, J. L. & Salas, C. (2000). Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Research*, *865*(1), 77-84.
- von Trotha, J. W., Vernier, P. & Bally-Cuif, L. (2014). Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, *40*(July), 3302-3315.
- Wilson, S. W. & Houart, C. (2004). Early Steps in the Development of the Forebrain. *Developmental Cell*, *6*(2), 167-181.
- Wood, L. S., Desjardins, J. K. & Fernald, R. D. (2011). Effects of stress and motivation on performing a spatial task. *Neurobiology of Learning and Memory*, *95*(3), 277-285.
- Wright, D., Nakamichi, R., Krause, J. & Butlin, R. K. (2006). QTL Analysis of Behavioral and Morphological Differentiation Between Wild and Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Behavior Genetics*, *36*(2), 271-284.
- Wright, D., Rimmer, L. B., Pritchard, V. L., Krause, J. & Butlin, R. K. (2003). Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). *Naturwissenschaften*, *90*(8), 374-377.
- Wu, Y.-j., Chen, Y.-l., Tang, T.-h., Ng, M.-c. & Amstislavskaya, T. G. (2017). Unilateral stimulation of the lateral division of the dorsal telencephalon induces synaptic plasticity in the bilateral medial division of zebrafish. *Scientific Reports*, *7*(9096), 1-8.
- Wullimann, M. F. & Puelles, L. (1999). Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Anatomy and embryology*, *329*, 329-348.
- Wullimann, M. F., Rupp, B. & Reichert, H. (1996). *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas* (1st). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Yamamoto, N., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., Xue, H.-g., Bahaxar, N., Sawai, N., Yang, C.-y., Ozawa, H. & Ito, H. (2007). A New Interpretation on the Homology of the Teleostean Telencephalon Based on Homology and a New Eversion Model. *Brain, Behavior and Evolution*, *69*, 96-104.
- Yang, P., Kajiwara, R., Tonoki, A. & Itoh, M. (2017). Successive and discrete spaced conditioning in active avoidance learning in young and aged zebrafish. *Neuroscience Research*, *130*, 1-7.
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L. & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(1), 3-11.
- Zupanc, G. K. H. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience*, *58*, 250-275.
- Zupanc, G. K. H., Hinsch, K. & Gage, F. H. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *488*(3), 290-319.

- Zupanc, G. K. H. & Sîrbulescu, R. F. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience*, *34*(6), 917-929.
- Zupanc, G. K. (2008). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *Journal of Physiology Paris*, *102*(4-6), 357-373.



Spatial Learning Promotes Adult Neurogenesis in Specific Regions of the Zebrafish Pallium

Laura S. **Mazzitelli-Fuentes**^{1,2,3}, Fernanda R. **Román**^{1,2,4}, Julio R. **Castillo Elías**^{1,5}, Emilia B. **Deleglise**^{1,2,3} and Lucas A. **Mongiat**^{1,2*}

¹Departamento de Física Médica, Centro Atómico Bariloche, Comisión Nacional de Energía Atómica, San Carlos de Bariloche, Argentina, ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina, ³Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina, ⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires, Aires, Argentina, ⁵Centro Atómico Bariloche, Instituto Balseiro, San Carlos de Bariloche, Argentina

OPEN ACCESS

Edited by:

Ma Salomé Sirerol Piquer,
Center for Biomedical Research on
Neurodegenerative Diseases
(CIBERNED), Spain

Reviewed by:

Kenji Shimamura,
Kumamoto University, Japan
María Esmeralda Castelló,
Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable (IIBCE), Uruguay

*Correspondence:

Lucas A. Mongiat
lucas.mongiat@cab.cnea.gov.ar

Specialty section:

This article was submitted to
Stem Cell Research,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 21 December 2021

Accepted: 29 March 2022

Published: XX XX 2022

Citation:

Mazzitelli-Fuentes LS, Román FR, Castillo Elías JR, Deleglise EB and Mongiat LA (2022) Spatial Learning Promotes Adult Neurogenesis in Specific Regions of the Zebrafish Pallium. Front. Cell Dev. Biol. 10:840964. doi: 10.3389/fcell.2022.840964

Adult neurogenesis could be considered as a homeostatic mechanism that accompanies the continuous growth of teleost fish. As an alternative but not excluding hypothesis, adult neurogenesis would provide a form of plasticity necessary to adapt the brain to environmental challenges. The zebrafish pallium is a brain structure involved in the processing of various cognitive functions and exhibits extended neurogenic niches throughout the periventricular zone. The involvement of neuronal addition as a learning-related plastic mechanism has not been explored in this model, yet. In this work, we trained adult zebrafish in a spatial behavioral paradigm and evaluated the neurogenic dynamics in different pallial niches. We found that adult zebrafish improved their performance in a cue-guided rhomboid maze throughout five daily sessions, being the fish able to relearn the task after a rule change. This cognitive activity increased cell proliferation exclusively in two pallial regions: the caudal lateral pallium (cLP) and the rostral medial pallium (rMP). To assess whether learning impinges on pallial adult neurogenesis, mitotic cells were labeled by BrdU administration, and then fish were trained at different periods of adult-born neuron maturation. Our results indicate that adult-born neurons are being produced on demand in rMP and cLP during the learning process, but with distinct critical periods among these regions. Next, we evaluated the time course of adult neurogenesis by pulse and chase experiments. We found that labeled cells decreased between 4 and 32 dpl in both learning-sensitive regions, whereas a fraction of them continues proliferating over time. By modeling the population dynamics of neural stem cells (NSC), we propose that learning increases adult neurogenesis by two mechanisms: driving a chained proliferation of labeled NSC and rescuing newborn neurons from death. Our findings highlight adult neurogenesis as a conserved source of brain plasticity and shed light on a rostro-caudal specialization of pallial neurogenic niches in adult zebrafish.

Keywords: neural stem/progenitor cells, plasticity, telencephalon, danio rerio (zebrafish), spatial learning and memory

Q9 INTRODUCTION

Brain plasticity allows neuronal circuits to adapt to environmental demands, promoting the ability to cope with the surrounding world. Adult neurogenesis, the generation and integration of new neurons in the brain of adult organisms, constitute a major source of brain plasticity (Mongiati and Schinder, 2011; Sailor et al., 2017; Toda and Gage, 2018). The occurrence of neurogenesis in adult brains extends throughout the vertebrate subphylum, although its magnitude varies greatly along phylogeny (Kaslin et al., 2008; Grandel and Brand, 2013; Alunni and Bally-Cuif, 2016; Zupanc, 2021). In mammals, adult neurogenesis is restricted mostly to the hippocampal dentate gyrus and the olfactory bulb (Lledo et al., 2006), whereas in teleost fish adult-born neurons are generated throughout their brain (Kaslin et al., 2008).

The zebrafish (*Danio rerio*) possesses a great neurogenic potential evidenced by constitutive neural stem cell (NSC) proliferation in almost all subdivisions of their brain, generating a variety of adult-born neurons (Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). One of the main brain regions in which adult neurogenesis has been studied in zebrafish is the dorsal telencephalon, or pallium. In contrast to other vertebrates, the telencephalon of ray-finned fish develops by an eversion of the neural tube (Folgueira et al., 2012). In consequence, both pallial hemispheres are separated and enclosed by a T-shaped ventricle. In this structure, the neuronal progenitors are localized in the periventricular zone (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). In the zebrafish pallium, there are different kinds of neural progenitor subtypes. Some of them, notably radial glia (RG) of the pallium, are considered NSCs, resembling the pallial RG in the mouse adult neurogenic niches (Than-Trong and Bally-cuif, 2015). These NSCs can be classified according to their proliferation activity, such as quiescent and active NSCs. At any time, the active NSCs correspond to ~5% of total radial glia in the periventricular zone (März et al., 2010). In turn, the active NSCs can suffer symmetric or asymmetric divisions to maintain the NSC reservoir and give rise to progeny with neurogenic potential (Than-Trong et al., 2020). Moreover, there is a different subset of neuronal progenitors in the pallial periventricular zone. These cells are negative for astroglial markers and exhibit intense mitotic activity with neurogenic commitment (Rothenaigner et al., 2011; Than-Trong et al., 2020). Previous studies proposed that this neuronal progenitor population resembles the Transit Amplifying Progenitors described in rodents (März et al., 2010).

After adopting neuronal phenotype, the new neurons migrate radially a few micrometers into the pallial parenchyma and become integrated into the adult pallial networks. This neurogenic process leads to an outside-in architecture, where neurons generated in early development are positioned at the center of the pallium, while a layered gradient of newer neurons is distributed towards the periphery (Furlan et al., 2017). The new neurons mature and integrate into the pallial neuronal networks (Grandel et al., 2006; Rothenaigner et al., 2011; Lange et al., 2020; Than-Trong et al., 2020). Recently, Lange and coworkers performed single-cell sequencing of NSC's progeny to

characterize the intrinsic heterogeneity of adult-born neurons in the zebrafish telencephalon, revealing a striking homology with the neuronal types found in the mammalian forebrain (Lange et al., 2020). Therefore, adult neurogenesis contributes to a continuous rearrangement of zebrafish's pallial networks.

Several studies have been conducted to decipher the organization of the teleost pallium based on anatomical characterization and the expression of molecular markers (Wullimann and Mueller, 2004; Vargas et al., 2009; Mueller, 2011; Harvey-Girard et al., 2012; Ganz et al., 2015). Current knowledge on the functional role of the different pallial regions, is complemented with a series of functional studies involving distinct learning paradigms in combination with the detection of neuronal activity (by different proxies) and/or lesions on specific regions (Portavella et al., 2004; Durán et al., 2010; Trotha et al., 2014; Elliott et al., 2017; Lal et al., 2018; Ausas et al., 2019). All these works indicate that the teleost dorsomedial telencephalic region (medial pallium, MP) is homologous to the basolateral amygdala of mammals, whereas the dorsolateral telencephalic region (lateral pallium, LP) is homologous to the mammalian hippocampus. From these studies emerge a strong relation between the teleost pallium and cognitive activity, suggesting plastic changes on pallial networks. In particular, adult neurogenesis could play a relevant role by shaping the neuronal circuits during learning. In rodents, it is known that behavioral paradigms such as odor-related and hippocampus-dependent learning increase the survival of immature adult-born neurons (Lledo et al., 2006; Anderson et al., 2011; Aasebø et al., 2018). However, to our knowledge, the role of cognitive activity on pallial network remodeling has not been explored in teleosts yet.

In this study, we trained adult zebrafish in a cognitive task to evaluate the impact of sustained neuronal activity on pallial adult neurogenesis. We found that learning may lead to plastic network remodeling driven by adult neurogenesis, specifically in the rostral MP and caudal LP regions.

RESULTS

Adult Zebrafish Learn in the Cue-Guided Rhomboid Maze

We hypothesized that sustained pallial neuronal activity, triggered as a consequence of a learning routine, would enhance the rate of adult neurogenesis in the circuits underlying the cognitive function. For this purpose, we looked for a learning paradigm involving the function of specific pallial structures, together with a sustained cognitive challenge. We adapted a cue-guided rhomboid maze, developed for goldfish, in order to train adult zebrafish in learning a spatial task by relating external cues with their internal-directional information. Otherwise noticed, 10 ± 1 months-old adult AB-wild type zebrafish (*Danio rerio*) were used throughout this work. During training, fish were located randomly at one of the two possible start sites in each trial. The fish had to learn the relationship between the cues' position and the exit to solve the maze; for example, turn right if cues are located at the same

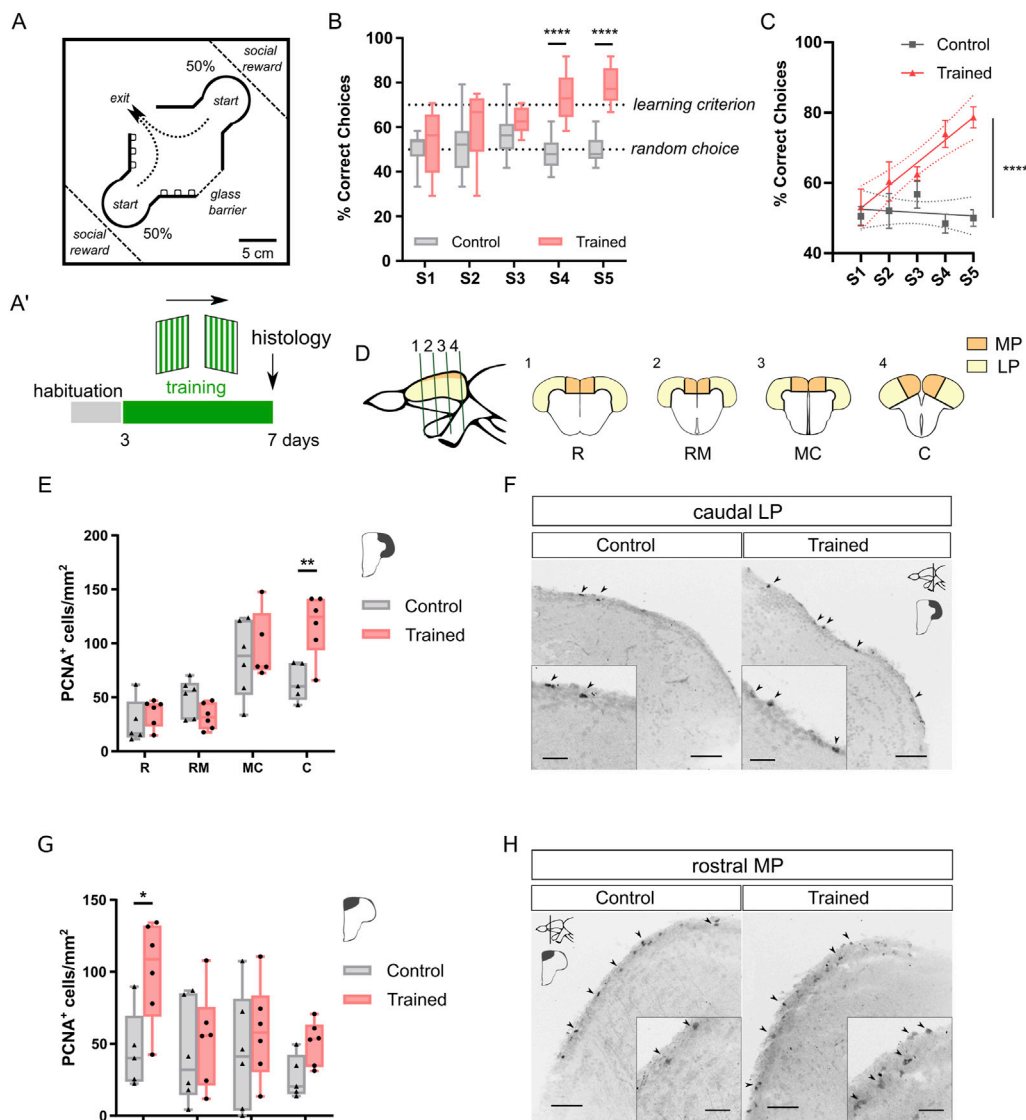


FIGURE 1 | Training adult zebrafish in a rhomboid maze boosts cell proliferation in the rMP and the cLP. **(A)** Experimental device. The maze contains two starting boxes, and two possible exits, one of which is blocked with a glass barrier. Fish were trained to find the correct exit, orientating themselves with cues placed on two walls. On the edges of the tank, two glass enclosures contained fish's conspecifics as social reward. On each trial, fish were placed in a start box, and, once they reached the central arena, a correct choice was scored if they swam through the exit, and a failure if they bumped against the glass barrier. Each daily session consisted of 24 trials. **(A')** Behavioral schedule. Cue patterns and exit position (arrow) are specified above. Fish were habituated to the experimental tank for 2 days, and subsequently trained for five consecutive days. **(B)** Learning curves for Trained and Control individuals. Trained fish reach the learning criterion after five consecutive sessions. Controls do not exhibit a learning curve (Two-way RM ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 14)} = 25.78$ with $p = 0.0002$, Session effect: $F_{(4, 56)} = 3.422$ with $p = 0.0143$. Bonferroni's multiple comparisons test, **** depicts $p < 0.0001$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). Dashed line at 70% correct choices depicts learning criterion; dashed line at 50% correct choices indicates random choice. **(C)** Simple linear regression for Trained and Control individuals (ANCOVA, $F_{(1, 77)} = 9.010$. **** depicts $p < 0.0001$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). Dashed line indicates 95% confidence intervals. **(D)** Left: Sagittal schematic view of zebrafish forebrain, indicating the position of the cross sections on the right. Right: Cross sections of zebrafish telencephalon along rostro-caudal axis (R: rostral, RM: rostro-medial, MC: medio-caudal, C: caudal). The colored regions depict MP and LP. **(E)** PCNA⁺ cells in LP. (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 37)} = 3.873$ with $p = 0.0566$, Pallium region effect: $F_{(3, 37)} = 20.27$ with $p < 0.0001$. Bonferroni's multiple comparisons test, ** denotes $p < 0.001$. Trained, $N = 6$; Control, $N = 6$). **(F)** Cross sections of telencephalic pallium stained for PCNA in cLP of Trained and Control individuals. Scale bar, 50 μm . Scale bar in higher magnifications, 20 μm . Black arrows indicate representative PCNA⁺ cells. **(G)** PCNA⁺ cells in MP. (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 38)} = 7.796$ with $p = 0.0082$, Pallium region effect: $F_{(3, 38)} = 2.332$ with $p = 0.0895$. Bonferroni's multiple comparisons test, * denotes $p < 0.05$. Trained, $N = 6$; Control, $N = 6$). **(H)** Cross sections of telencephalic pallium stained for PCNA in rMP of Trained and Control individuals. Scale bar, 50 μm . Scale bar in higher magnifications, 20 μm . Black arrows indicate representative PCNA⁺ cells.

Q19
Q22

side of the start compartment and turn left if they are at the opposite side (Figure 1A). Thus, on each trial the fish must take a left-right decision based on cues' position. To encourage the

completion of the task, we placed several conspecifics in outer compartments as social reward. To assess the ability of zebrafish to learn the task, fish were trained for five consecutive sessions (1

session/day, 24 trials/session, **Figure 1A'**). The Control group consisted on fish which were subjected to the same training routine, with the exception that the glass barrier was randomly placed in any of the exits to avoid learning. The Control group exhibited a ~50% correct choices throughout the sessions, remaining close to the chance level (**Figure 1B,C, Supplementary Video S1**). In contrast, the Trained group increased their performance in a daily manner until they exceeded a 75% of correct choices (Percentage of correct choices for Session 5, Mean \pm SE: Control 50.00 ± 2.362 ; Trained 78.65 ± 2.992 ; $N = 8$, **Supplementary Video S2**). It should be noticed that all trained subjects accomplished the learning criterion and were included in further analysis. Here, we introduce the cue-guided rhomboid maze as a novel behavioral paradigm to assess spatial learning ability in adult zebrafish.

Learning-Induced Cell Proliferation in Adult Zebrafish Pallium

Previous studies in goldfish reported that learning in the cue-guided rhomboid maze induces a selective increase of metabolic activity in the LP of trained subjects (Durán et al., 2015; Ocaña et al., 2017). Thus, we aimed to test whether learning in the rhomboid maze task would have any effect on cell proliferation in this neurogenic niche. It must be noticed that the Control group is subjected to manipulations, environment conditions and social reward in the same way as Trained subjects. Hence, changes in proliferation and/or neurogenesis should be related to the learning process.

To evaluate mitotic activity, we determined the expression of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) throughout the rostro-caudal axis of the pallium (**Figures 1D–H, Supplementary Figures S1A–E**). Expression of PCNA in the pallium was detected from the rostral to the caudal regions, in the periventricular zone. Supporting our hypothesis we found a learning-related increase in the PCNA detection in the LP, only restricted to its caudal region (cLP, ~180%; **Figures 1E,F**). Unexpectedly, we also observed a relevant learning-related gain in PCNA levels in the rostral region of MP (rMP, ~220%, **Figures 1G,H**).

It is known that senescence leads to cognitive deterioration, a fact that has also been proven for zebrafish (Ruhl et al., 2015; Adams and Kafaligonul, 2018; Yang et al., 2018). Thus, we explored whether aged zebrafish (21 months-old) could learn in the cue-guided rhomboid maze and, consequently, increase proliferation rates in the pallium. As observed for adult-young zebrafish, senescent individuals improve their task performance in a daily manner (**Supplementary Figure S2**). In agreement with our previous observations, aged fish exhibit an enhancement of PCNA expression exclusively in the rMP (~180%) and the cLP (~250%) of Trained fish (**Supplementary Figure S2**). Interestingly, we observed a slight improvement in the learning curve and in the basal levels of proliferation, in the aged zebrafish (**Figure 1** and **Supplementary Figure S2**).

Our results indicate that cognitive activity, carried out on the cue-guided rhomboid maze, induces an increase in cell

proliferation in two delimited neurogenic regions of the pallium of adult zebrafish.

Enhanced Adult Neurogenesis by Learning in the Rhomboid Maze

Adult neurogenesis is a plastic phenomenon that can be modulated by network activity at different levels, such as NSCs proliferation, migration, differentiation and survival of new neurons. However, the role of cognitive activity on adult neurogenesis modulation has not been explored in zebrafish, yet. We hypothesized that sustained neuronal activity triggered as a consequence of learning impinges on immature adult-born neurons to promote pallial network remodeling. To approach this question we treated adult fish (~10 months-old) with BrdU, a thymidine analogue, to label NSCs during the S-phase of mitotic cell division. We allowed BrdU-labeled neurons to develop over a 12-day period. Then, fish were randomly divided into Trained and Control (mocked) groups, and subjected to sustained training in the rhomboid maze from 12 to 30 dpl, a period in which we estimate that adult-born neurons are maturing (**Figure 2A**). To maintain the cognitive challenge during the training period, we changed the cues and the learning rule at the beginning of each week. Trained subjects exhibited a good learning curve, reaching the established criterion at the fifth session of the first week, and were able to relearn the task after the rule shift during the following weeks (**Figure 2B**, Percentage of correct choices for Session 5, Mean \pm SE: Control 57.81 ± 2.54 ; Trained 76.56 ± 3.14 , $N = 8$). Notably, after the first week of training, the subjects showed a better performance when relearning the task, evidenced by an increase in the learning curve slope of Trained fish (**Figure 2C**, Simple linear regression, 1st week vs. 2 weeks: $p = 0.0343$; 1st week vs. 3rd week: $p = 0.0096$).

After completing the training schedule, we assessed the fate of BrdU-labeled cells by immunodetection of the neuronal marker NeuN. The effect of learning on adult neurogenesis was evaluated by quantifying the number of adult-born neurons (BrdU⁺NeuN⁺) throughout the pallial rostro-caudal axis. We found that the cLP of Trained subjects exhibited an increase (~250%) in the number of 30 dpl BrdU-labeled neurons as compared to Control group, whereas the other rostro-caudal LP regions shown similar levels of 30 dpl adult-born neurons between both experimental groups (**Figures 2D,F**, BrdU⁺NeuN⁺ in cLP, Mean \pm SE: Control 44.39 ± 12.71 , $N = 5$; Trained 112.28 ± 16.41 , $N = 7$). Similarly, in the MP we observed an increase of BrdU-labeled neurons (> 300%) exclusively in the rostral region of the MP (**Figures 2G,I**, BrdU⁺NeuN⁺ in rMP, Mean \pm SE: Control 57.73 ± 26.00 , $N = 5$; Trained 204.50 ± 56.36 , $N = 7$). Since network activity may regulate adult-born neurons development, we decided to evaluate if learning affects neuronal differentiation, assessed as the percentage of labeled cells which adopt neuronal phenotype (BrdU-labeled cells that express the neuronal marker NeuN, BrdU⁺NeuN⁺/BrdU⁺), as well as the migration distance of BrdU-labeled cells, measured from the ventricular boundary into the final position in the pallial parenchyma (**Supplementary Figure S3**). We analyzed only the regions in

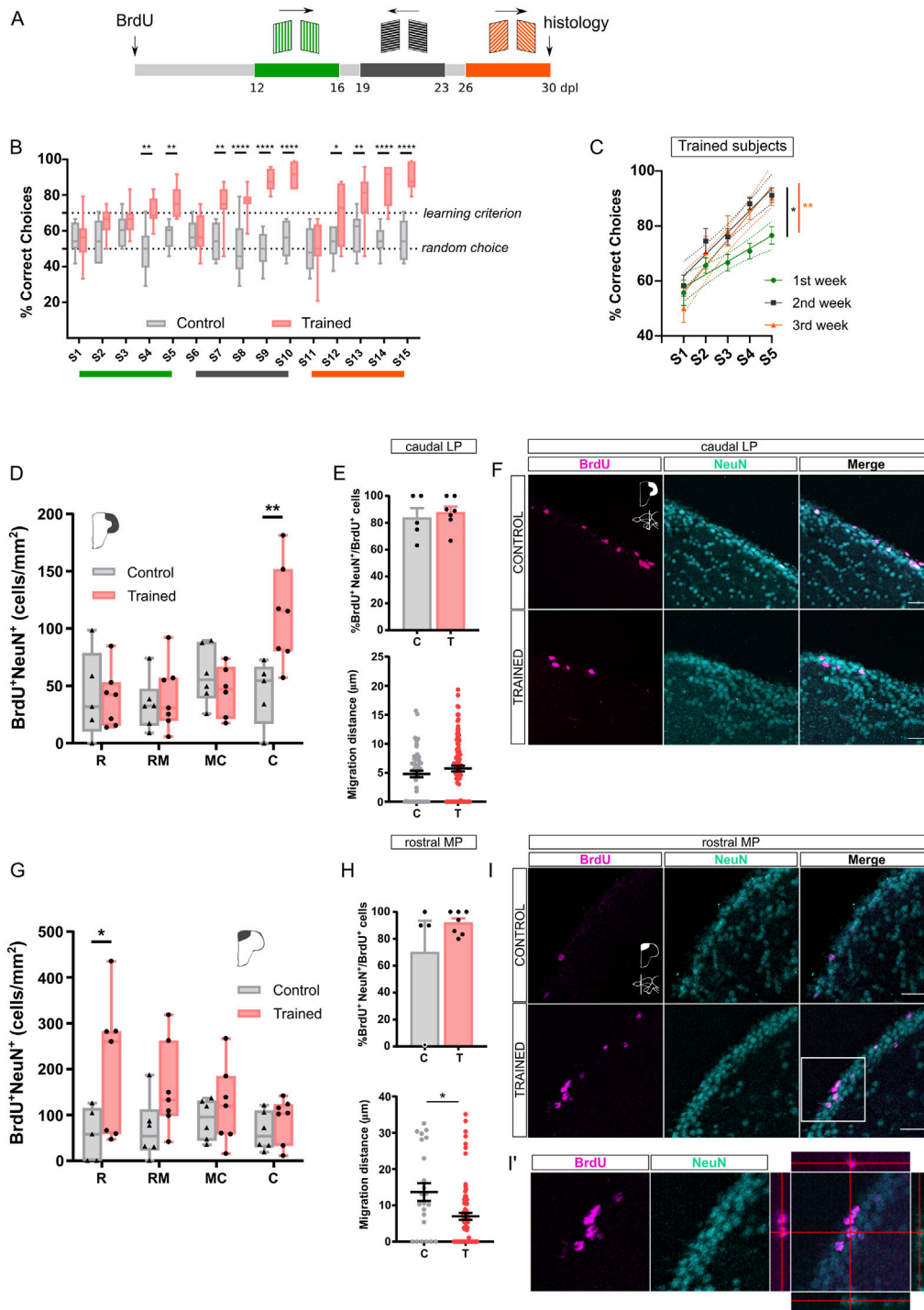


FIGURE 2 | Sustained training of zebrafish from 12–30 dpl increases adult neurogenesis exclusively in the rMP. **(A)** Experimental schedule. Fish were immersed in BrdU, and training started at 12 dpl. Training consisted of 15 sessions, distributed in three slots. Every five sessions both cues and exit position were changed. A 2-day interval was fixed between slots. At 30 dpl fish were euthanised for histology. **(B)** Learning curves for Trained and Control individuals (Two-way RM ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 14)} = 67.71$ with $p < 0.0001$, Session effect: $F_{(14, 196)} = 6.805$ with $p < 0.0001$. Bonferroni's multiple comparisons test, * depicts $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(C)** Simple linear regression for each training window for Trained fish (ANCOVA, first vs. 2nd week: $F_{(1, 76)} = 4.647$; 1st vs. 3rd week: $F_{(1, 76)} = 7.068$, * indicates $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(D)** BrdU⁺NeuN⁺ cell quantification in LP (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 41)} = 2.766$ with $p = 0.103$, Pallium region effect: $F_{(3, 41)} = 4.493$ with $p = 0.0098$. Bonferroni's multiple comparisons test, ** $p < 0.01$. Trained, $N = 7$; Control $N = 6$). **(E)** Top: Neuronal fate (%BrdU⁺NeuN⁺/BrdU⁺ cells) in caudal LP (Unpaired *t* test, $t_{(10)} = 0.5091$, n. s. Trained, $N = 7$; Control $N = 5$). Bottom: Cell migration in caudal LP (Mann Whitney test, $U = 2419$, n. s. Trained, $N = 7$; Control $N = 6$). **(F)** Adult-born neurons (BrdU/NeuN) in cLP for Trained and Control individuals. Scale bar, 20 μ m. **(G)** BrdU⁺NeuN⁺ cell quantification in rMP (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 41)} = 2.766$ with $p = 0.103$, Pallium region effect: $F_{(3, 41)} = 4.493$ with $p = 0.0098$. Bonferroni's multiple comparisons test, * depicts $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(H)** Top: Neuronal fate (%BrdU⁺NeuN⁺/BrdU⁺ cells) in rostral MP (Unpaired *t* test, $t_{(10)} = 0.5091$, n. s. Trained, $N = 7$; Control $N = 5$). Bottom: Cell migration in rostral MP (Mann Whitney test, $U = 2419$, n. s. Trained, $N = 7$; Control $N = 6$). **(I)** Adult-born neurons (BrdU/NeuN) in rMP for Trained and Control individuals. Scale bar, 20 μ m. **(I')** High-magnification view of neurons in rMP. (Continued)

FIGURE 2 | BrdU⁺NeuN⁺ cell quantification in MP. (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 43)} = 9.564$ with $p = 0.0035$, Pallium region effect: $F_{(3, 43)} = 0.889$ with $p = 0.455$. Bonferroni's multiple comparisons test, * $p < 0.05$. Trained, N = 7; Control N = 6). **(H)**. Top: Neuronal fate (%BrdU⁺NeuN⁺/BrdU⁺ cells) in rMP (Mann-Whitney test, $U = 11.5$, n. s. Trained, N = 7; Control N = 4). Bottom: Cell migration in rMP (Mann-Whitney test, $U = 602$, * depicts $p < 0.05$. Trained, N = 7; Control, N = 4). **(I)**. Adult-born neurons (BrdU/NeuN) in rMP for Trained and Control individuals. Scale bar, 20 μ m. **(J)**. Higher magnification of the boxed square in I (merge panel). Single focal plane and orthogonal views after three-dimension reconstruction.

which learning promotes adult neurogenesis. Neither of these parameters were affected by learning, except for the migration distance in rMP, which was lower in Trained subjects (**Figures 2E,H**). The difference in migration distance may account for late recruited BrdU-labeled progenitors, which were product of conservative division and now are being activated by learning, a concept that we are exploring below. Thus, it is expected that younger BrdU-labeled neurons remains close to the periventricular zone. These results indicate that training in the rhomboidal maze task during a 12–30 dpl time frame promotes adult neurogenesis in the cLP and in the rMP, shedding light on the potential relevance of these pallial regions during learning.

Critical period for learning-induced adult neurogenesis.

Our previous results indicate that learning has an immediate effect on cell proliferation in the cLP and rMP neurogenic regions (**Figure 1**). Also we found a learning-related increase of adult-born neurons in the in the same pallial regions after a 12–30 dpl training. The neurogenic process involves several checkpoints where network activity and systemic signaling regulate distinct developmental processes in a time-dependent manner (Mu et al., 2010). On these basis, we evaluated if learning has an impact on adult-born neurons at different maturation periods. We did not observe significant changes between the Control and Trained groups at any rostrocaudal region of LP when training occurred during an earlier maturation stage of adult-born neurons (3–14 dpl, **Figures 3D,F**). On the other hand, we found that learning stimulates an increase (~200%) in the levels of rMP 30 dpl adult-born neurons (**Figures 3G,I**, BrdU⁺NeuN⁺ in rMP, Mean \pm SE: Control 94.20 ± 17.61 ; Trained 188.30 ± 36.01 , N = 8). Furthermore, we evaluated neuronal fate and observed a significant increase in the percentage of newborn neurons only in the cLP. Whereas, the final position of the labeled neurons (migration distance) showed no differences at any region (**Figures 3E,H**).

Next, we assessed adult neurogenesis after training fish during a late period, at 31–42 dpl (**Figures 4A–C**). Both experimental groups exhibited similar levels of neurogenesis (**Figure 4D**). Our results indicate that adult neurogenesis in the rMP and the cLP is sensitive to training in the rhomboid maze, during restricted periods (**Figure 4E**). The critical period for learning-induced adult neurogenesis is slightly shorter in the cLP as compared to the rMP. This modulation of adult neurogenesis by network activity could be attributed to two possible non-excluding mechanisms: 1) activity-related increase in the survival of adult-born neurons, avoiding cell death programs; 2) activity-related chained recruitment of BrdU-labeled cells, which were product of conservative divisions.

Chained proliferation of labeled NSCs and adult-born cell death modulate adult neurogenesis in the pallium.

In rodents, it is well established that network activity promotes synaptic integration of adult-born neurons and, in consequence, favor the neuronal survival (Ryu et al., 2016). Hitherto, this hypothesis has not been explored in teleost fish, yet. On the other hand, Than-Trong and coworkers (2020) proposed that adult neurogenesis relies on different kinds of NSCs, a reservoir pool involved in the self-renewal of NSCs (rNSC), and an operational group with neurogenic function (oNSC) (Than-Trong et al., 2020). The oNSCs can divide either in a symmetric or asymmetric way to produce new neurons and to preserve the NSC pool. In this context, our adult neurogenesis results would rely on learning-induced sequential recruitment of BrdU-labeled cells or, alternatively, on an activity-dependent rescue from death. Therefore, we assessed a time course for neuronal survival and proliferation of EdU-labeled cells at four temporal points: 4, 16, 32 and 64 dpl (**Figure 5A**).

We found a ~37% neuronal survival in the cLP when comparing 4 vs. 32 dpl (**Figures 5B,D**, Number of EdU⁺ cells in cLP: 4 dpl 144.7 ± 21.53 , N = 8; 32 dpl 54.16 ± 11.47 , N = 3), whereas for rMP the survival of EdU-labeled cells during the same period was ~55% (**Figures 5E,G**, Number of EdU⁺ cells in rMP: 4 dpl 245.6 ± 31.45 , N = 8; 32 dpl 131.8 ± 23.84 , N = 4). The decrease in the number of labeled cells in both pallial regions could indicate the death of a portion of these cells. Furthermore, we assessed the sequential recruitment of EdU-labeled cells by PCNA expression. We found a relevant fraction ($44.03 \pm 10.02\%$) of mitotic EdU-labeled cells at 4 dpl in the cLP (**Figure 5C**), which diminished considerably at later times. In contrast, in the rMP we found a portion of EdU⁺ proliferating cells from 4 to 32 dpl ($26.54 \pm 6.21\%$), while we observed scarce proliferation in labeled cells at 64 dpl. (**Figure 5F**). Hence, a considerable portion of proliferating cells retain EdU labeling and continues dividing in the cLP and the rMP (**Figure 5H**). Our results point to a complex regulation of adult neurogenesis in the pallium of zebrafish, where chained proliferation of NSCs and death of immature neurons are balanced to contribute to the neuronal addition on these networks.

A population dynamics model mimics the learning-induced adult neurogenesis in the MP.

Recently, Than-Trong and coworkers (2020) performed an *intra-vital* imaging analysis to track the fate of NSCs in the MP. Based on the experimental results and a computational model, the authors estimated the proportions of symmetric and asymmetric divisions, and possible fates adopted by activated NSCs. Based on the division rates observed by Than-Trong and coworkers, we adapted the minimal model to assess the dynamics of neuronal addition under different conditions: Control and Trained at different learning periods (**Figures 6A,B**). After 30 days, the model evolves to a proportion ~60% of adult-born neurons from the initial cohort of “labeled” NSCs in the rMP

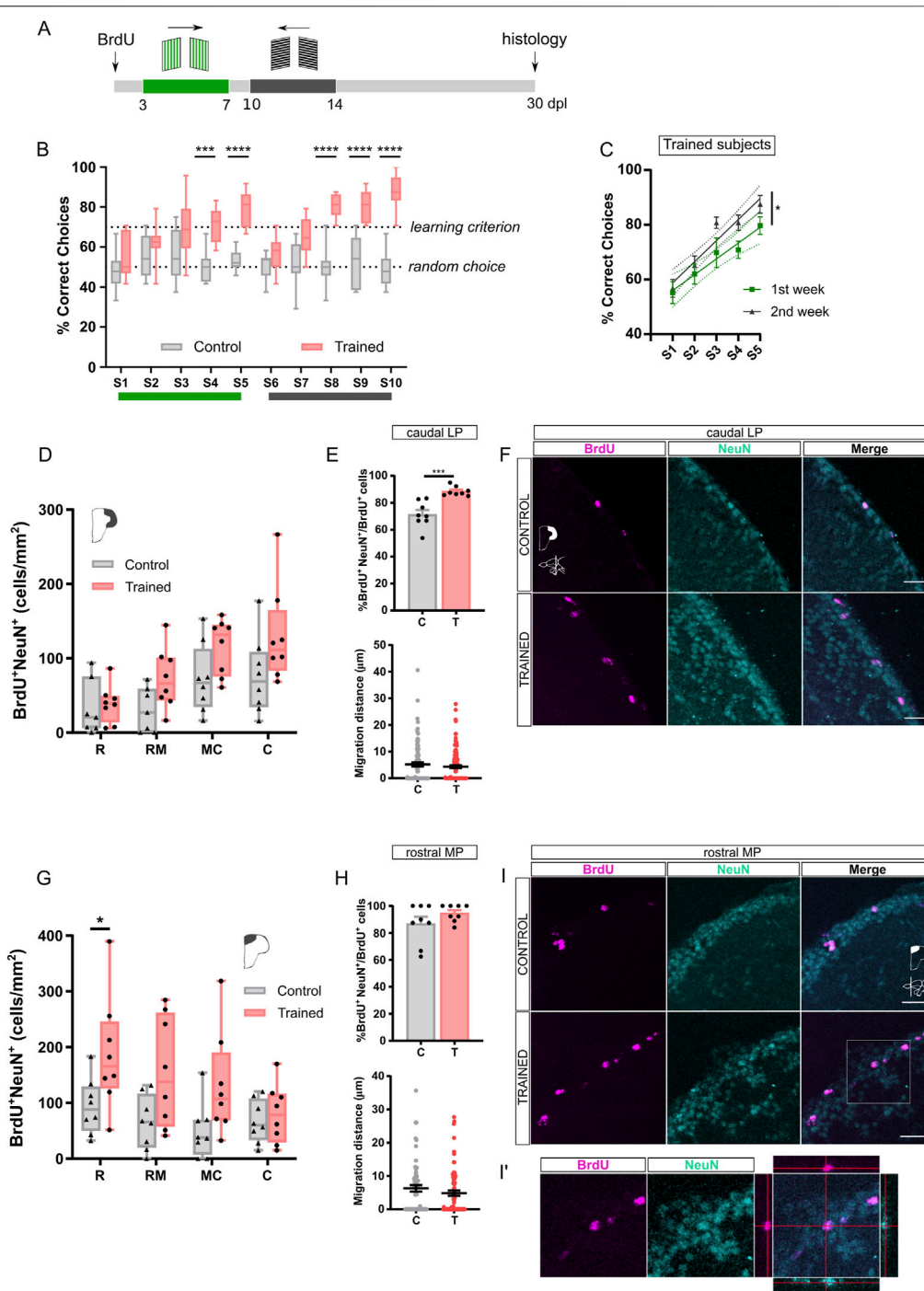
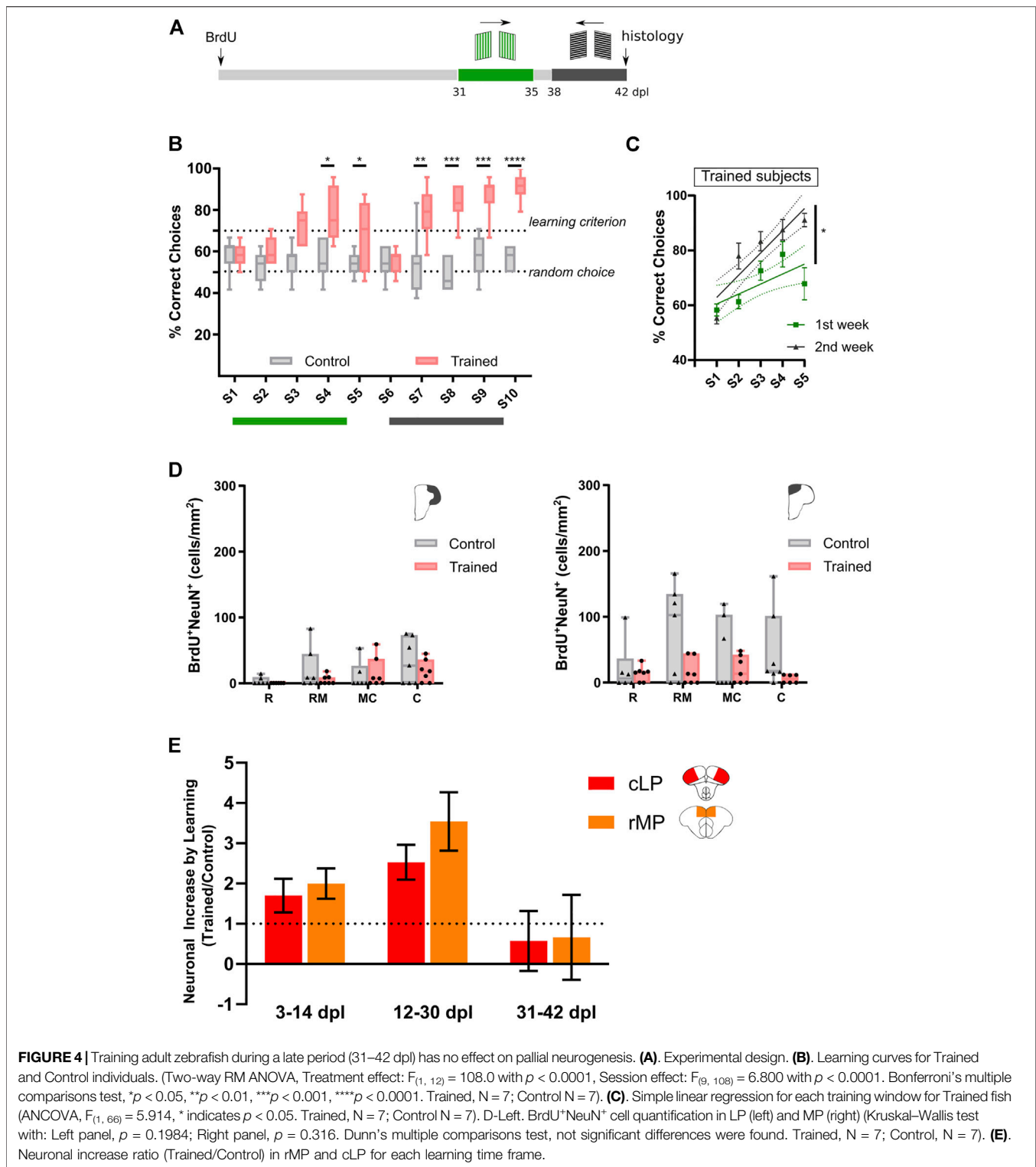


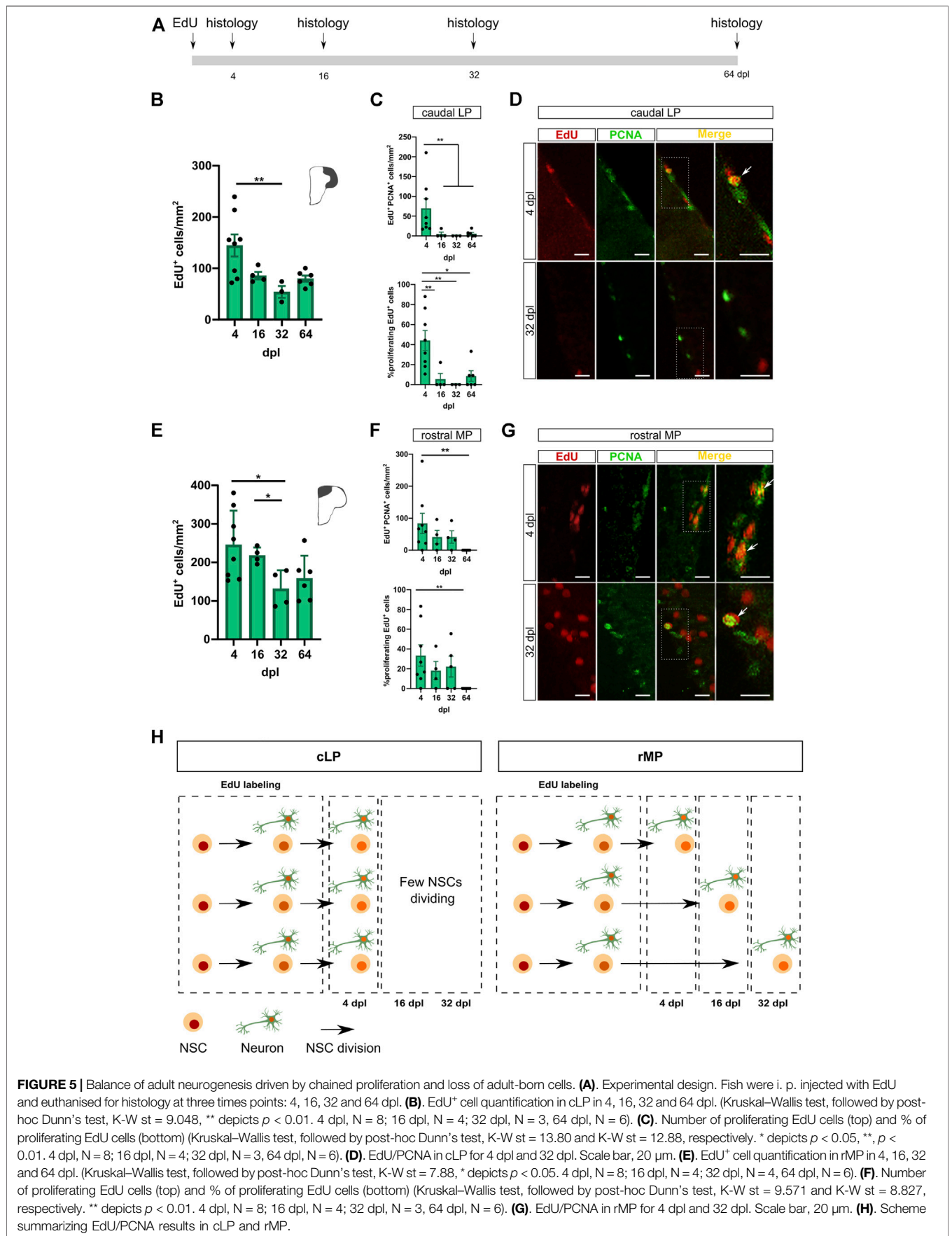
FIGURE 3 | Training zebrafish during an early period (3–14 dpl) increases adult neurogenesis in both rMP and cLP. **(A)** Experimental design. **(B)** Learning curves for Trained and Control individuals (Two-way RM ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 14)} = 126.1$ with $p < 0.0001$, Session effect: $F_{(9, 126)} = 5.254$ with $p < 0.0001$. Bonferroni's multiple comparisons test, **** depicts $p < 0.001$, ***** $p < 0.0001$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(C)** Simple linear regression for each training window for Trained fish (ANCOVA, $F_{(1, 76)} = 1.516$, n. s. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(D)** BrdU*NeuN* cell quantification in LP. (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 54)} = 10.63$ with $p = 0.0019$, Pallium region effect: $F_{(3, 54)} = 8.642$ with $p < 0.0001$. Bonferroni's multiple comparisons test, not significant differences. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(E)** Top: Neuronal fate (%BrdU*NeuN*/BrdU* cells) in cLP. (Unpaired t test, $t_{(14)} = 4.749$, **** depicts $p < 0.001$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). Bottom: Cell migration in cLP (Mann Whitney test, $U = 6492$, n. s. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(F)** Adult-born neurons (BrdU*NeuN*) in cLP for Trained and Control individuals. Scale bar, 20 μm . **(G)** BrdU*NeuN* cell quantification in MP. (Two-way ANOVA, Treatment effect: $F_{(1, 56)} = 15.34$ with $p = 0.0002$, Pallium region effect: $F_{(3, 56)} = 2.685$ with $p = 0.0553$. Bonferroni's multiple comparisons test, * depicts $p < 0.05$. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(H)** Top: Neuronal fate (%BrdU*NeuN*/BrdU* cells) in rMP (Unpaired t test, $t_{(14)} = 1.396$, n. s. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). Bottom: Cell migration in rMP (Mann Whitney test, $U = 2088$, n. s. Trained, $N = 8$; Control $N = 8$). **(I)** Adult-born neurons (BrdU*NeuN*) in rMP for Trained and Control individuals. Scale bar, 20 μm . **(I')** Higher magnification of the boxed square in I (merge panel). Single focal plane and orthogonal views after three-dimension reconstruction.

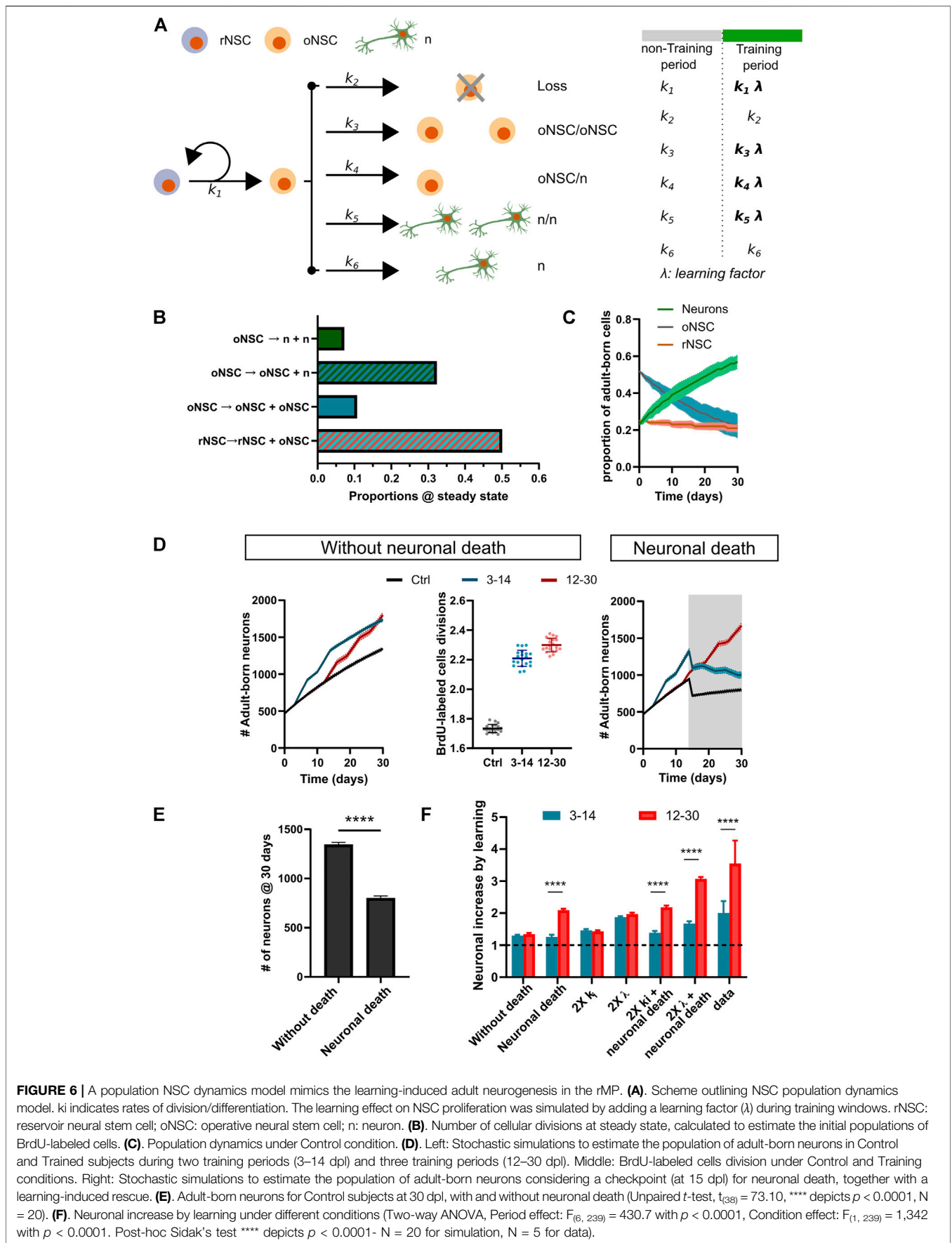
Q24



(Figure 6C), a value slightly lower to what is shown in our experiments (Panels E, H from Figures 2, 3). Next, we calculated the number of chained divisions that each cell of the original NSC pool goes through. The model indicates an average of ~ 1.7

divisions during the 30-day period (Figure 6E), a value that supports the chained proliferation of labeled-NSCs by discarding a relevant BrdU dilution in the progeny. Then, based on our PCNA results (see Figure 1), we hypothesized that learning





would burst the activation and proliferation of BrdU-labeled NSCs, which were a product of NSC-conservative divisions from the original labeled pool. We aimed to emulate the neuronal population dynamics in rMP when learning occurs from 3–14 dpl (2 weeks of training) and from 12–30 dpl (3 weeks of training), the experimental conditions in which learning promotes adult neurogenesis. Thus, during these training windows, the proliferation rate of NSCs is affected by a learning factor (λ). We observed that learning increased the number of adult-born neurons at the expense of the operative NSC pool (Figure 6D). However, in contrast to the changes observed in our experiments (See Figure 4E), in the simulation both training conditions (3–14 and 12–30 dpl) exhibited a similar outcome in the number of new neurons (Figure 6D). Since we observed neuronal loss in the rMP from 4 to 32 dpl (indicated by ~45% reduction in the number of EdU-labeled cells), we incorporated to our model a checkpoint starting at 15 dpl to allow the survival or death of new neurons, together with a learning-related rescue (See methods). In Control conditions the death of adult-born neurons maintains a $67.1 \pm 5.4\%$ of survival (Figure 6G). As expected, the incorporation of neuronal death to the model increases the difference in the number of adult-born neurons when training occurs during 12–30 dpl in comparison with 3–14 dpl (Figure 6F). This learning-induced adult neurogenesis profile mimics our experimental results, but with a lower difference than our experimental data. This result, led us to interrogate the model under different conditions, as duplication of the learning factor ($2X \lambda$), duplication of all the division/differentiation rates ($2X k_i$), $2X \lambda +$ neuronal death, and $2X k_i +$ neuronal death (Figure 7H, Supplementary Figure S5A). The only conditions where the model mimicked the experimental data profiles were the ones in which neuronal death was taken into account, being the $2X \lambda +$ neuronal death the most accurate condition. A long-term simulation (500 days) showed that adult neurogenesis is additive to pallial networks, even when considering neuronal death (Supplementary Figure S5B). Thus, the model supports that learning-induced adult neurogenesis in rMP relies on both mechanisms: a boost in chained NSC proliferation and rescue from neuronal loss.

DISCUSSION

Teleost fish grow throughout their lives, therefore their organs must adapt to their increasing body size (Jerison, 1973). Consequently, adult neurogenesis could be considered as a mechanism that underlies the constant growth of the fish brain, in agreement with the numerical matching hypothesis (Zupanc, 2021). As an alternative but not excluding hypothesis, adult neurogenesis would provide neural networks with an extra degree of plasticity to adapt the brain to changes in the environment. Previous studies in teleosts suggest functional specialization of neurogenic niches (Zupanc and Horschke, 1995; Kaslin et al., 2008; Iribarne and Castelló, 2014; Lindsey et al., 2014; Olivera-Pasilio et al., 2014; Sato et al., 2017; Labusch et al., 2020). These studies demonstrate that different brain regions involved in the processing of sensory activity are neurogenic, and

sustained sensory stimulation leads to an increase in newborn neurons only in the related niches. In the same way, in rodents and birds it has been shown that behavioral challenges involving information processing in neurogenic brain nuclei enhance adult neurogenesis in a stimulus-dependent fashion (Goldman and Nottebohm, 1983; Barnea et al., 1994; Leuner et al., 2004; Alonso et al., 2006; Tashiro et al., 2007). These works highlight the relevance of adult neurogenesis on learning-related changes in a structure-to-function manner. Here, we challenged zebrafish with a cognitive paradigm to explore the addition of adult-born neurons to pallial circuits. The subjects were trained in a spatial learning paradigm to integrate their positional information with visual cues to solve the task. To avoid egocentric responses, the start compartments were randomly chosen and multiple maze rotations were performed during sessions. Therefore, on each trial, the fish must make a decision based on spatial information. Adult zebrafish exhibited good performance on this behavioral test, even after sequential rule-change sessions. We observed that training fish in this paradigm increases cell proliferation in circumscribed pallial subregions. The Control group, mocked with a random exit, was subjected to all the experimental manipulations (isolation, handling, environment, exploration, and social reward) as the Trained group. Hence, we conclude that the observed differences in adult neurogenesis are a consequence of the learning process. The Trained subjects evidenced a region-specific increase in the rate of proliferation when compared to Control fish. This finding suggests that the new neurons could underlie plastic changes in the pallium as a consequence of the cognitive challenge.

Our results indicate a rostrocaudal specialization in the pallial circuits, shedding light on the relevance of the cLP (encompassing the caudal Dlv and Dld) and the rMP (the rostral portion of Dm) during the execution of the cognitive task implemented here. Behavioral studies involving distinct teleost fish related the LP to navigation and spatial learning (Durán et al., 2015; Elliott et al., 2017; Ocaña et al., 2017; Fotowat et al., 2019). Both of these cognitive functions are processed by the mammalian hippocampus. Furthermore, the zebrafish LP region expresses several molecular markers resembling the ones expressed by the mammalian hippocampus (Mueller and Wullimann, 2009; Ganz et al., 2015). Our results are in agreement with the involvement of the teleost LP in processing spatial information and reveal a rostrocaudal specialization of this structure, being the cLP the only region in which this spatial task heightens the addition of new neurons. In this regard, Ocaña and coworkers (2017) reported progressive changes in metabolic activity throughout the rostrocaudal LP as a response to training goldfish in the same paradigm. In their work, oxidative metabolism activity was analyzed during learning showing that rostral and medial sections of Dlv exhibit transient activation at early stages, whereas the caudal Dlv shows sustained activity throughout the training period. In our experiments we found no differences between the dorsal and ventral LP (Dld and Dlv, data not shown) and only observed learning-related effects on adult neurogenesis in the cLP. Very likely, the signaling involved in oxidative metabolism during this paradigm could be different than the factors involved during neurogenesis in the LP,

explaining the discrepancies. Unexpectedly, we also found a learning-related induction of adult neurogenesis in the rMP, a brain region that has been poorly studied in teleosts. Interestingly, Lau and coworkers (2011) have proposed that Dm acts as a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish (Lau et al., 2011). In their work the authors analyzed neuronal activity by *c-fos* expression in the pallium, but only at a rostral level (rMP, slice 71 of the zebrafish atlas (Wullimann et al., 1996)). On this basis, we hypothesize that the rMP learning-related increase in adult neurogenesis could be attributed to the role of this neural center on decision-making. However, future experiments should be conducted to test this idea.

The pallium of fish is considered a simple structure with specialized regions at the transversal level. However, here we observed a rostrocaudal specialization in the MP and the LP of Control fish, evidenced by gradients of PCNA (Figure 1), with higher proliferation activity in the rMP and the cLP, being both regions prone to be modulated by learning. Interestingly, our results highlight the specialization of neural circuits along the pallial rostrocaudal axis, a concept that should be taken into account in future studies.

To evaluate the learning effects on adult neurogenesis, we labeled proliferating progenitor cells with the thymidine analog BrdU and fish were trained at different periods after progenitor labeling (3–14, 12–30, 31–42 dpl). After a single thymidine analog pulse (BrdU or EdU), most of the label will be incorporated by the active NSC (5% of total NSCs, (März et al., 2010; Than-Trong et al., 2020),) and by a fraction of neuronal progenitors (~6–26% (März et al., 2010; Rothenaigner et al., 2011)). After short chase times, most adult-born neurons will be the product of neurogenic divisions by the committed neuronal progenitors. While, the late recruitment of adult-born neurons (here described as chained proliferation) would result from conservative NSC divisions at the time of BrdU administration, which will go through consecutive mitosis and differentiation beyond neurogenic fate.

We found an increase of BrdU-labeled neurons in the rMP and cLP of Trained subjects. Our results support adult neurogenesis as an evolutionary conserved source of learning-related brain plasticity. Interestingly, the neurogenesis observed in these pallial regions differs in their learning-sensitive critical periods, where the cLP has a shorter temporal window as compared to the rMP. The distinct critical periods between these pallial regions could be attributed to different composition of NSC and progenitor cells between both niches. Or alternative, could be explained by neuronal populations with a distinct maturation pace. In rodents, several activity-dependent critical periods have been reported during development of adult-born neurons (Ge et al., 2007; Tashiro et al., 2007; Alvarez et al., 2016); however to our knowledge this is the first evidence reported in a teleost model.

The observed increase in adult neurogenesis after the cognitive challenge could underlie two distinct, yet not exclusive, mechanisms: 1) rescue of immature neurons from death programs; or 2) an expansion of the labeled NSC reservoir by chained recruitment of BrdU-labeled cells. Here, we found that both processes could contribute to adult neurogenesis homeostasis in the zebrafish pallium (Figure 6). In rodents,

adult neurogenesis generates neurons in abundance, and their survival depends on an activity-dependent synaptic integration of new neurons to rescue them from death programs (Ryu et al., 2016). In line with this idea, we found a decrease in the number of adult-born neurons in cLP and rMP over a 64-days lapse (Figures 5B,E). Accordingly, Ampatzis and coworkers (2012) showed significant apoptotic activity assessed by TUNEL method in different regions of adult zebrafish pallium (~100–200 TUNEL profiles/mm², a value close to the daily adult neurogenesis contribution) (Ampatzis et al., 2012). On the other hand, supporting the chained proliferation, we found significant amounts of EdU⁺PCNA⁺ cells in both pallial subregions (Figures 5C,F). Whereas the rMP maintains a steady level of cell proliferation over the 4–32 days period, the cLP shows an early boost of proliferation activity, which declined by day 16. The differences in the proliferation dynamics between both subregions could be attributed to heterogeneous cellular compositions (März et al., 2010; Lindsey et al., 2012; Dirian et al., 2014; Anand and Mondal, 2017). Thus, at 4 dpl double-labeled cells in rMP and cLP may correspond to fast-cycling cells (potentially intermediate amplifier progenitors or transitory amplifying cells), which proliferate over a short period. In cLP, there is scarce proliferation activity detected after 4 dpl. However, in the rMP, a relevant portion of EdU⁺ cells continues proliferating at 16 and 32 dpl. These may correspond to slow-cycling cells, which re-entered the cell cycle after a quiescent state (Alunni et al., 2010; Olivera-Pasilio et al., 2014). The fast decrease, after 4 dpl (Figure 5C), in chained proliferation observed in cLP could explain the absence of learning effects when subjects were trained at 3–14 dpl. While the late boost (12–30 dpl) of adult neurogenesis in this region (Figure 2D), could be attributed to an activity-dependent rescue from cell death programs. On the other hand, in rMP both chained proliferation and death rescue seem to be synergistic to the learning-related increase of 12–30 dpl adult-born neurons.

In agreement with our observations and supporting a chained proliferation of pallial NSCs, a persisting proliferation of BrdU-labeled cells (~40 dpl) in the zebrafish telencephalon was also reported by other authors (Grandel et al., 2006; März et al., 2010). The chained proliferation of labeled NSCs has also been proposed by Prickaerts and collaborators (Prickaerts et al., 2004). In their words, “the effect of proliferation alone, on every day after injection, is added to the number of cells counted as well as the survival of those cells which were labeled earlier in the week and have not continued to proliferate”. Therefore, our results argue in favor of complex regulation of adult neurogenesis in which learning promotes the chained division of NSCs, together with activity-dependent survival. However, it is not clear whether new-born neuron integration and survival is related to NSC proliferation in a causative manner, a question that should be addressed in future research. The concept of chained-proliferation is supported by our NSC population dynamics model, in which proliferation and death act in a synergistic way to induce pallial circuit modifications by adult neurogenesis. Although the model reproduces the adult neurogenesis profiles observed in our experimental conditions, the proportion of adult-born neurons as well as its learning-

induced increase exhibit lower values when compared to our experimental data. We speculate that these discrepancy could be related to different factors, such as different division/differentiation (k_i) rates in our fish as compared to the ones calculated in the Than-Trong work, underestimation of the learning factor (λ), or the impact of neuronal death implemented in our model.

Taken together our results indicate that learning in a cognitive paradigm, involving spatial and positional information together with decision making, induces the addition of new neurons into specific pallial circuits. However, from our experiments, it is not clear whether neurons generated during training would participate in encoding information related to the learning process itself, since these new neurons could still be in an immature stage. If this is true, then the learning-induced neurogenesis would prepare the related neuronal circuits by adding new neurons for future challenges. In line with this idea, it was recently shown that silencing hippocampal adult-born neurons, which were immature during learning, impairs remote memory reconsolidation in rats, indicating a learning-related priming of immature neurons (Lods et al., 2021). This idea, as well as elucidating the timing for maturation and synaptic integration of adult-born neurons should be explored in future works.

CONCLUSION

The addition of adult-born neurons by adult neurogenesis represents a major source of brain plasticity. Although zebrafish possess high levels of adult neurogenesis broadly distributed throughout their brain, the involvement of neuronal addition as a cognitive-related plastic mechanism has not been explored in this model, yet. The zebrafish pallium has numerous well described neurogenic niches, and has been proved to be critical for the execution of spatial and emotional learning tasks. In this work, we trained adult zebrafish in a cue-guided maze and found an improvement in their performance in a daily manner throughout five sessions. This cognitive challenge induces an increase in proliferation activity only in two restricted pallial areas, the cLP and the rMP. In addition, adult-born neurons in rMP and cLP are being produced on demand during the learning process but with distinct critical periods. Finally, based on a NSC population dynamics model we propose that adult neurogenesis is regulated in a complex manner by promoting NSC proliferation together with neuronal death programs. We propose that both processes are prone to be regulated by learning-induced network activity.

METHODS Subjects and housing. All experiments were carried out using 10 ± 1 months-old AB-wild type zebrafish (*Danio rerio*) line in AB background, except for the experiment shown in **Supplementary Figure S2**, in which 21 months-old individuals were used. Adult zebrafish were housed in a zebrafish standalone rack system (ZS560, Aquaneering Inc.), where fish were kept in small groups (5 fish/l) with aerated and filtered water at a constant temperature of $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.2 \pm 0.2$. The aquarium room was subjected to a 14:10 h light/dark cycle. Dry food and *Artemia salina* were provided three-times a day. During the

experimental period fish were housed individually in 1.4 L tanks. Both sexes were used indistinguishably. Experimental procedures were conducted in accordance with the National regulations and following the Universities Federation for Animal Welfare Handbook on the Care and Management of Laboratory and other Research Animals. This work has the consent of the Comisión Nacional de Energía Atómica's IACUC, protocol #05-2018-02.

Behavioral paradigm. Subjects were trained in a square tank (30×30 cm) containing the experimental rhomboid maze in the center, as was previously described (Ingle and Sahagian, 1973). The maze was made out of green PVC (10×10 cm), to form a diamond-shaped box with two circular starting compartments in opposite corners. The remaining corners of the box served as exits. One of them was kept open, while the other was blocked with a transparent glass barrier. Spatial cues, consisting of removable striped panels, were placed on two walls of the box. On the edges of the tank, and behind the starting compartments, two glass enclosures containing conspecifics (two per enclosure) were used as social reward. The experimental tank was illuminated with two LED lamps, located above the tank.

Two days prior to training, subjects were habituated to the experimental apparatus. During habituation fish were allowed to swim through both exits of the apparatus. Neither the cues nor the glass barrier were used during habituation. For individual habituation sessions conspecifics were also placed in the tank enclosures. After habituation, the training sessions were carried out. Each training session consisted of an acclimation period (5 min) followed by a maze solving period (5 min), which included chasing and capturing the fish with a small plastic vessel. Each session consisted of 24-trial trials, and was divided into two slots, one in the morning and the other in the afternoon to avoid exhaustion. For each trial, fish were randomly placed in either of the starting compartments (50% each one), and allowed to enter the central arena by removing a sliding PVC barrier. The initial decision of the fish was registered. A correct choice was scored when it swam through the exit, and a failure if it bumped against the glass barrier. In case of a failure, the experimenter waited until the fish found the correct exit. Once out of the maze, the fish were allowed to explore the tank and conspecifics for 10 s. Learning criterion was established at 70% of correct choices. The maze, cues and glass barrier were consistently rotated every five trials to avoid the use of external cues. In the Control group, the glass barrier was randomly placed in any of the exits. Other from that, conditions remained the same as the Trained group.

BrdU labeling. To label cycling cells, zebrafish were immersed in 5 mM 5-bromo-2'-deoxyuridine (Sigma) solution overnight. The BrdU was dissolved in aquarium water. Fish were immersed in groups up to 16 individuals, at a 50 ml/fish ratio. The following days after immersion, they were successively rinsed with system water and reincorporated to the fish facility.

EdU labeling. To label cycling cells, fish were anaesthetised in 0.01% tricaine methanesulfonate (MS222, Sigma) and a single 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) injection (40 μL , 10 mM) was delivered intraperitoneally (i.p.). Individuals were subsequently

allowed to recover in a holding tank, and returned to the fish facility.

Brain preparation and sectioning. After the last session, fish were deeply anaesthetised in 0.02% tricaine methanesulfonate (MS222, Sigma), brains were dissected and fixed in 4% PFA in 10 mM PBS overnight. Tissue was overprotected by immersion in 30% sucrose for 2 days, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C . Telencephalic frontal sections of 20 μm were cut on a cryostat (Microm, HM 550), and mounted on positively charged slides. Slides were air-dried for 24 h prior to immunofluorescence.

To analyze the pallium throughout the rostro-caudal axis, we selected four sections for each individual, designated as rostral, rostro-medial, medio-caudal and caudal. Sections were chosen according to the topological atlas Neuroanatomy of the Zebrafish Brain (Wullimann et al., 1996), see **Supplementary Figure S1**.

Immunofluorescence. Slides were rinsed three times with Tris-buffered saline (TBS) (pH = 7.4) for 5 min, incubated with 100 mM ammonium chloride for 20 min and rinsed three more times with 0.3% TritonX-100/TBS for 5 min. Then, slides were blocked with 6% bovine serum albumin (BSA), 6% normal goat serum (NGS) in TBS for 1 h and incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 6% BSA, 6% NGS in TBS. Then, they were washed with 0.3% TritonX-100/TBS four times for 5 min, and incubated with secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or 594 (1:500 dilution) for 2 h at room temperature (RT). Sections were then washed three times (5 min each) in 0.3% TritonX-100/TBS, and mounted using Fluorescence Mounting Medium (Abcam). Sections were stored at 4°C . When double immunostaining was performed both primary, or secondary, antibodies were incubated at the same time. For BrdU and PCNA immunodetection antigen retrieval was performed before blocking: 30 min in 2 N HCl at 37°C , followed by 10 min neutralization in 0.1 M borate buffer (pH = 8.5). Primary antibodies used were: rat monoclonal anti-BrdU 1:500 (ab6326, Abcam), mouse monoclonal anti-PCNA 1:300 (PC10, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), mouse monoclonal anti-NeuN 1:500 (ab104224, Abcam), mouse monoclonal anti-NeuroD1 1:500 (ab60704, Abcam).

Secondary antibodies used were: goat polyclonal anti-Rat IgG Alexa Fluor 488 (ab150165, Abcam), goat polyclonal anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam), goat polyclonal anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594 (ab150084, Abcam), goat polyclonal anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594 (ab150120, Abcam). The images were acquired by using an epifluorescence microscope Nikon Eclipse e800 and an ad-hoc built two-photon microscope. Colocalization of fluorescent markers were performed on single-plane images acquired in the two-photon microscope. Images were processed in FIJI (ImageJ v1.53). Immunostained sections in which the tissue was broken or folded were excluded from the analysis.

Population dynamics model. In this work we performed a population dynamics simulation based on the work of Than-Trong and coworkers (2020) with modifications. Briefly, the model contemplates two NSC populations, the reservoir pool (rNSCs) and the operative pool (oNSCs). Both kind of NSCs divided and differentiated following the rates reported by Than-Trong: 1) rNSC

\rightarrow rNSC + oNSC: ($k_1 = 0.007/\text{day}$); 2) oNSC \rightarrow death: ($k_2 = 0.017/\text{day}$); 3) oNSC \rightarrow oNSC + oNSC: ($k_3 = 0.006/\text{day}$); 4) oNSC \rightarrow oNSC + n: ($k_4 = 0.018/\text{day}$); 5) oNSC \rightarrow n + n: ($k_5 = 0.004/\text{day}$); 6) oNSC \rightarrow n: ($k_6 = 0.013/\text{day}$). To adapt the model to our experiments, we firstly determined the system dynamics at equilibrium to establish the basal proportions of rNSC (r) and oNSC (o). Based on the reaction rates described above we developed differential equations to evaluate the temporal progression of r and o populations:

As $r\text{NSC} \rightarrow r\text{NSC} + o\text{NSC}$:

$$\frac{dr}{dt} = 0, \text{ at equilibrium } r_{eq} = r(t_0)$$

$$\text{Whereas } \frac{do}{dt} = k_1 r - (k_3 + k_5 + k_6 - k_2) o = f(r, o)$$

$$\text{at equilibrium } \frac{do}{dt} = f(r_{eq}, o_{eq}) = 0,$$

$$\text{with } o_{eq} = \frac{1}{4} r_{eq}$$

Once established the contribution of r_{eq} and o_{eq} , we developed a stochastic simulation to determine the proportions of reactions associated to cellular divisions (d_i), which will be used as target for “BrdU labeling” simulation (Figure G). Hence, from this simulation we established the following parameters: $d_1 = 0.5$, $d_3 = 0.11$, $d_4 = 0.32$, $d_5 = 0.07$.

According to this, given an initial population (P_0) of “BrdU-labeled” NSCs we established the progeny fate after a single division:

$$r_{(t=0)} = P_0 d_1$$

$$o_{(t=0)} = P_0 (d_1 + 2d_3 + d_4)$$

$$n_{(t=0)} = P_0 (d_4 + 2d_5)$$

Next, we compute the population dynamics through a 30 days period (see **Figure 6C**).

To address the way in which learning activity impinges on population dynamics, we applied a learning factor (λ) to the rates of division and differentiation (k_i) of the reactions that took place only during training periods (See **Figure 6D**). Based on our experiments of learning and proliferation (**Figure 1** and **Supplementary Figure S2**), we estimated a $\lambda = 3$.

Neuronal death was incorporated under the hypothesis that adult-born neurons mature over time to reach a checkpoint (at day 15th), in which a portion of these neurons die with a probability $p_{\text{death}} = 0.550$, in accordance with the results shown in **Figure 5**. Next, we implemented an activity-dependent rescue to decrease neuronal death up to ten times during learning.

All the stochastic simulations were implemented in *Python* 3.8.5 using NumPy 1.19.2, and the codes are available in https://gitlab.com/n806/stochasticsimulation_learning_and_neurog.

Statistical analysis. Every data set was tested by the Grubbs outlier test, with $\alpha = 0.05$. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, with a p-value of 0.05. Homoscedasticity was analyzed by the Levene test, with a p-value of 0.05. When data met criteria, unpaired *t*-test or Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test were used as indicated. In cases where data did not meet normality criteria, nonparametric tests used were Mann-Whitney or Kruskal-Wallis. Behavioral results were analyzed by Two-way ANOVA for repeated measures as well as by linear regressions. In all cases, statistical significance was assumed when $p < 0.05$. Unless

otherwise specified, data are presented as mean \pm SE. Box plots indicate median (line), 25–75% percentile (box limits), maximum and minimum values (whiskers). Simple linear regression slopes were compared with an ANCOVA test. All the statistical analyses performed in this work are detailed in the supplementary information file.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Experimental procedures were conducted in accordance with the National regulations and following the Universities Federation for Animal Welfare Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. This work has the consent of the Comisión Nacional de Energía Atómica's IACUC, protocol #05-2018-02.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The working hypothesis and experimental design were conducted by LM-F and LM. Training fish in the rhomboidal maze was performed by LM-F and ED. FR was responsible for the EdU pulse and chase experiments and the evaluation of adult-born

REFERENCES

- Aasebø, I. E. J., Kasture, A. S., Passeggeri, M., and Tashiro, A. (2018). A Behavioral Task with More Opportunities for Memory Acquisition Promotes the Survival of New Neurons in the Adult Dentate Gyrus. *Sci. Rep.* 8, 1–11. doi:10.1038/s41598-018-25331-w
- Adams, M. M., and Kafaligonul, H. (2018). Zebrafish-A Model Organism for Studying the Neurobiological Mechanisms Underlying Cognitive Brain Aging and Use of Potential Interventions. *Front. Cel Dev. Biol.* 6, 1–5. doi:10.3389/fcell.2018.00135
- Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., et al. (2006). Conserved and Acquired Features of Adult Neurogenesis in the Zebrafish Telencephalon. *Dev. Biol.* 295, 278–293. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.023
- Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M.-M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M. (2006). Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 26, 10508–10513. doi:10.1523/JNEUROSCI.2633-06.2006
- Alunni, A., and Bally-Cuif, L. (2016). A Comparative View of Regenerative Neurogenesis in Vertebrates. *Development* 143, 741–753. doi:10.1242/dev.122796
- Alunni, A., Hermel, J.-M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., and Joly, J.-S. (2010). Evidence for Neural Stem Cells in the Medaka Optic Tectum Proliferation Zones. *Devel Neurobio* 70, 693–713. doi:10.1002/dneu.20799
- Alvarez, D. D., Giacomini, D., Yang, S. M., Trincherro, M. F., Temprana, S. G., Büttner, K. A., et al. (2016). A Disynaptic Feedback Network Activated by

neurons' migration distance. Immunofluorescence and two-photon microscopy were conducted by LM-F and FR. The population dynamics model was performed by JC. All the authors participated in the results discussion and interpretation. The manuscript was written by LM and LM-F.

FUNDING

This work was funded by: 1) Wellcome Trust Foundation, Seed Award in Science 210219/Z/18/Z; 2) ANPCyT-MinCyT PICT 2018-1031; 3) ANPCyT-MinCyT PICT 2019-0225; all to LM. LM-F, FR, and ED are supported by Ph.D. fellowships from CONICET. JC is supported by a master's fellowship from Instituto Balseiro. LM is a research member of CONICET.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alex Fainstein, Axel Bruchhausen, Maximiliano Guyón, and Maia Brunstein for sharing the two-photon microscope and for their time spent aiding in trouble fixing. Finally, we want to thank Maria Soledad Espósito and Luciano Marpegan for their careful reading of the manuscript; their suggestions and comments have improved our work.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.840964/full#supplementary-material>

- Experience Promotes the Integration of New Granule Cells. *Science* 354, 459–465. doi:10.1594/PANGAEA.85856810.1126/science.aaf2156
- Ampatzis, K., Makantasi, P., and Dermon, C. R. (2012). Cell Proliferation Pattern in Adult Zebrafish Forebrain Is Sexually Dimorphic. *Neuroscience* 226, 367–381. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.09.022
- Anand, S. K., and Mondal, A. C. (2017). Cellular and Molecular Attributes of Neural Stem Cell Niches in Adult Zebrafish Brain. *Devel Neurobio* 77, 1188–1205. doi:10.1002/dneu.1002/dneu.22508
- Anderson, M. L., Sisti, H. M., Curlik, D. M., Shors, T. J., Curlik, D. M., and Shors, T. J. (2011). Associative Learning Increases Adult Neurogenesis during a Critical Period. *Eur. J. Neurosci.* 33, 175–181. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07486.x
- Ausas, M. S., Mazzitelli-Fuentes, L., Roman, F. R., Crichigno, S. A., De Vincenti, A. P., and Mongiat, L. A. (2019). Social Isolation Impairs Active Avoidance Performance and Decreases Neurogenesis in the Dorsomedial Telencephalon of Rainbow trout. *Physiol. Behav.* 198, 1–10. doi:10.1016/j.physbeh.2018.10.006
- Barnea, A., Nottebohm, F., Barnea, A., and Nottenbhom, F. (1994). Seasonal Recruitment of Hippocampal Neurons in Adult Free-Ranging Black-Capped Chickadees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11217–11221. doi:10.1073/pnas.91.23.11217
- Dirian, L., Galant, S., Coolen, M., Chen, W., Bedu, S., Houart, C., et al. (2014). Spatial Regionalization and Heterochrony in the Formation of Adult Pallial Neural Stem Cells. *Dev. Cel* 30, 123–136. doi:10.1016/j.devcel.2014.05.012
- Durán, E., Ocaña, F. M., Broglio, C., Rodríguez, F., Salas, C., Durán, E., et al. (2010). Lateral but Not Medial Telencephalic Pallium Ablation Impairs the Use of Goldfish Spatial Allocentric Strategies in a "Hole-Board" Task. *Behav. Brain Res.* 214, 480–487. doi:10.1016/j.bbr.2010.06.010

- 1711 Elliott, S. B., Harvey-Girard, E., Giassi, A. C. C., and Maler, L. (2017).
1712 Hippocampal-like Circuitry in the Pallium of an Electric Fish: Possible
1713 Substrates for Recursive Pattern Separation and Completion. *J. Comp.
1714 Neurol.* 525, 8–46. doi:10.1002/cne.24060
- 1715 Folgueira, M., Bayley, P., Navratilova, P., Becker, T. S., Wilson, S. W., and Clarke,
1716 J. D. (2012). Morphogenesis Underlying the Development of the Everted
1717 Teleost Telencephalon. *Neural Dev.* 7, 32. doi:10.1186/1749-8104-7-32
- 1718 Fotowat, H., Lee, C., Jun, J. J., and Maler, L. (2019). Neural Activity in a
1719 Hippocampus-like Region of the Teleost Pallium Is Associated with Active
1720 Sensing and Navigation. *Elife* 8, 1–25. doi:10.7554/elife.44119
- 1721 Furlan, G., Cuccioli, V., Vuillemin, N., Dirian, L., Muntasell, A. J., Coolen, M., et al.
1722 (2017). Life-Long Neurogenic Activity of Individual Neural Stem Cells and
1723 Continuous Growth Establish an Outside-In Architecture in the Teleost
1724 Pallium. *Curr. Biol.* 27, 3288–3301. doi:10.1016/j.cub.2017.09.052
- 1725 Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., et al.
1726 (2015). Subdivisions of the Adult Zebrafish Pallium Based on Molecular Marker
1727 Analysis. *F1000Res* 3, 308–318. doi:10.12688/f1000research.5595.1
- 1728 Ge, S., Yang, C.-h., Hsu, K.-S., Ming, G.-l., and Song, H. (2007). A Critical Period
1729 for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult
1730 Brain. *Neuron* 54, 559–566. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.002
- 1731 Goldman, S. A., and Nottebohm, F. (1983). Neuronal Production, Migration, and
1732 Differentiation in a Vocal Control Nucleus of the Adult Female Canary Brain.
1733 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2390–2394. doi:10.1073/pnas.80.8.2390
- 1734 Grandel, H., and Brand, M. (2013). Comparative Aspects of Adult Neural Stem Cell
1735 Activity in Vertebrates. *Dev. Genes Evol.* 223, 131–147. doi:10.1007/s00427-
1736 012-0425-5
- 1737 Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and Brand, M. (2006). Neural Stem Cells
1738 and Neurogenesis in the Adult Zebrafish Brain: Origin, Proliferation Dynamics,
1739 Migration and Cell Fate. *Dev. Biol.* 295, 263–277. doi:10.1016/j.ydbio.2006.
1740 03.040
- 1741 Harvey-Girard, E., Giassi, A. C. C., Ellis, W., and Maler, L. (2012). Organization of
1742 the Gymnotiform Fish Pallium in Relation to Learning and Memory: IV.
1743 Expression of Conserved Transcription Factors and Implications for the
1744 Evolution of Dorsal Telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 520, 3395–3413.
1745 doi:10.1002/cne.23107
- 1746 Ingle, D., and Sahagian, D. (1973). Solution of a Spatial Constancy Problem by
1747 Goldfish. *Psychobiology* 1, 83–84. doi:10.3758/BF03326873
- 1748 Iribarne, L., and Castelló, M. E. (2014). Postnatal Brain Development of the Pulse
1749 Type, Weakly Electric Gymnotid Fish *Gymnotus Oparorum*. *J. Physiology-
1750 Paris* 108, 47–60. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.05.001
- 1751 Jerison, H. J. (1973). *Evolution of the Brain and Intelligence*. 1973rd ed. New York:
1752 Elsevier. Academic Press Available at: [https://www.sciencedirect.com/book/
1753 9780123852502/evolution-of-the-brain-and-intelligence#book-description](https://www.sciencedirect.com/book/9780123852502/evolution-of-the-brain-and-intelligence#book-description).
- 1754 Kaslin, J., Ganz, J., and Brand, M. (2008). Proliferation, Neurogenesis and
1755 Regeneration in the Non-mammalian Vertebrate Brain. *Phil. Trans. R. Soc.
1756 B* 363, 101–122. doi:10.1098/rstb.2006.2015
- 1757 Labusch, M., Mancini, L., Morizet, D., and Bally-Cuif, L. (2020). Conserved and
1758 Divergent Features of Adult Neurogenesis in Zebrafish. *Front. Cel Dev. Biol.* 8,
1759 1–28. doi:10.3389/fcell.2020.00525
- 1760 Lal, P., Tanabe, H., Suster, M. L., Ailani, D., Kotani, Y., Muto, A., et al. (2018).
1761 Identification of a Neuronal Population in the Telencephalon Essential for Fear
1762 Conditioning in Zebrafish. *BMC Biol.* 16, 1–18. doi:10.1186/s12915-018-0502-y
- 1763 Lange, C., Rost, F., Machate, A., Reinhardt, S., Lesche, M., Weber, A., et al. (2020).
1764 Single Cell Sequencing of Radial Glia Progeny Reveals Diversity of Newborn
1765 Neurons in the Adult Zebrafish Brain. *Development* 147, 1855951. doi:10.1242/
1766 dev.185595
- 1767 Lau, B. Y. B., Mathur, P., Gould, G. G., and Guo, S. (2011). Identification of a Brain
1768 center Whose Activity Discriminates a Choice Behavior in Zebrafish. *Proc. Natl.
1769 Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2581–2586. doi:10.1073/pnas.1018275108
- 1770 Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., and
1771 Shors, T. J. (2004). Learning Enhances the Survival of New Neurons beyond the
1772 Time when the hippocampus Is Required for Memory. *J. Neurosci.* 24,
1773 7477–7481. doi:10.1523/JNEUROSCI.0204-04.2004
- 1774 Lindsey, B. W., Darabie, A., and Tropepe, V. (2012). The Cellular Composition of
1775 Neurogenic Periventricular Zones in the Adult Zebrafish Forebrain. *J. Comp.
1776 Neurol.* 520, 2275–2316. doi:10.1002/cne.23065
- 1777 Lindsey, B. W., Di Donato, S., Kaslin, J., and Tropepe, V. (2014). Sensory-specific
1778 Modulation of Adult Neurogenesis in Sensory Structures Is Associated with the
1779 Type of Stem Cell Present in the Neurogenic Niche of the Zebrafish Brain. *Eur.
1780 J. Neurosci.* 40, 3591–3607. doi:10.1111/ejn.12729
- 1781 Lledo, P.-M., Alonso, M., and Grubb, M. S. (2006). Adult Neurogenesis and
1782 Functional Plasticity in Neuronal Circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179–193.
1783 doi:10.1038/nrn1867
- 1784 Lods, M., Pacary, E., Mazier, W., Farrugia, F., Mortessagne, P., Masachs, N., et al.
1785 (2021). Adult-born Neurons Immature during Learning Are Necessary for
1786 Remote Memory Reconsolidation in Rats. *Nat. Commun.* 12. doi:10.1038/
1787 s41467-021-22069-4
- 1788 März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesel, B., Takamiya, M., et al.
1789 (2010). Heterogeneity in Progenitor Cell Subtypes in the Ventricular Zone of
1790 the Zebrafish Adult Telencephalon. *Glia* 58, NA. doi:10.1002/glia.20971
- 1791 Mongiat, L. A., and Schinder, A. F. (2011). Adult Neurogenesis and the Plasticity of
1792 the Dentate Gyrus Network. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1055–1061. doi:10.1111/j.
1793 1460-9568.2011.07603.x
- 1794 Mu, Y., Lee, S. W., and Gage, F. H. (2010). Signaling in Adult Neurogenesis. *Curr.
1795 Opin. Neurobiol.* 20, 416–423. doi:10.1016/j.conb.2010.04.010
- 1796 Mueller, T. (2011). The Conserved Bauplan of the Teleostean Telencephalon. *Brain
1797 Behav. Evol.* 78, 259–260. doi:10.1159/000331869
- 1798 Mueller, T., and Wullimann, M. F. (2009). An Evolutionary Interpretation of
1799 Teleostean Forebrain Anatomy. *Brain Behav. Evol.* 74, 30–42. doi:10.1159/
1800 000229011
- 1801 Ocaña, F. M., Uceda, S., Arias, J. L., Salas, C., Rodríguez, F., and Rodríguez, F.
1802 (2017). Dynamics of Goldfish Subregional Hippocampal Pallium Activity
1803 throughout Spatial Memory Formation. *Brain Behav. Evol.* 90, 154–170.
1804 doi:10.1159/000478843
- 1805 Olivera-Pasilio, V., Peterson, D. A., and Castellá³, M. a. E. (2014). Spatial
1806 Distribution and Cellular Composition of Adult Brain Proliferative Zones in
1807 the Teleost, *Gymnotus Oparorum*. *Front. Neuroanat.* 8, 1–19. doi:10.3389/
1808 fnana.2014.00088
- 1809 Portavella, M., Torres, B., and Salas, C. (2004). Avoidance Response in
1810 Goldfish: Emotional and Temporal Involvement of Medial and Lateral
1811 Telencephalic Pallium. *J. Neurosci.* 24, 2335–2342. doi:10.1523/
1812 JNEUROSCI.4930-03.2004
- 1813 Prickaerts, J., Koopmans, G., Blokland, A., and Scheepens, A. (2004). Learning and
1814 Adult Neurogenesis: Survival with or without Proliferation? *Neurobiol. Learn.
1815 Mem.* 81, 1–11. doi:10.1016/j.nlm.2003.09.001
- 1816 Rothenaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., et al.
1817 (2011). Clonal Analysis by Distinct Viral Vectors Identifies Bona Fide Neural
1818 Stem Cells in the Adult Zebrafish Telencephalon and Characterizes Their
1819 Division Properties and Fate. *Development* 138, 1459–1469. doi:10.1242/dev.
1820 058156
- 1821 Ruhl, T., Jonas, A., Seidel, N. I., Prinz, N., Albayram, O., Bilkei-Gorzo, A., et al.
1822 (2015). Oxidation and Cognitive Impairment in the Aging Zebrafish.
1823 *Gerontology* 62, 47–57. doi:10.1159/000433534
- 1824 Ryu, J. R., Hong, C. J., Kim, J. Y., Kim, E.-K., Sun, W., and Yu, S.-W. (2016). Control
1825 of Adult Neurogenesis by Programmed Cell Death in the Mammalian Brain.
1826 *Mol. Brain* 9, 43. doi:10.1186/s13041-016-0224-4
- 1827 Sailor, K. A., Schinder, A. F., and Lledo, P.-M. (2017). Adult Neurogenesis beyond
1828 the Niche: its Potential for Driving Brain Plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 42,
1829 111–117. doi:10.1016/j.conb.2016.12.001
- 1830 Sato, Y., Yano, H., Shimizu, Y., Tanaka, H., and Ohshima, T. (2017). Optic Nerve
1831 Input-dependent Regulation of Neural Stem Cell Proliferation in the Optic
1832 Tectum of Adult Zebrafish. *Devel Neurobiol.* 77, 474–482. doi:10.1002/dneu.
1833 22423
- 1834 Tashiro, A., Makino, H., and Gage, F. H. (2007). Experience-specific Functional
1835 Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: a Critical
1836 Period during an Immature Stage. *J. Neurosci.* 27, 3252–3259. doi:10.1523/
1837 JNEUROSCI.4941-06.2007
- 1838 Than-Trong, E., Kiani, B., Dray, N., Ortica, S., Simons, B., Rulands, S., et al. (2020).
1839 Lineage Hierarchies and Stochasticity Ensure the Long-Term Maintenance of
1840 Adult Neural Stem Cells. *Sci. Adv.* 6, eaaz5424–15. doi:10.1126/sciadv.aaz5424
- 1841 Than-Trong, E., and Bally-cuif, L. (2015). Radial Glia and Neural Progenitors in the
1842 Adult Zebrafish Central Nervous System. *Glia* 63, 1406–1428. doi:10.1002/glia.
1843 22856
- 1844 Toda, T., and Gage, F. H. (2018). Review: Adult Neurogenesis Contributes to
1845 Hippocampal Plasticity. *Cell Tissue Res* 373, 693–709. doi:10.1007/s00441-017-
1846 2735-4

- 1825 Trotha, J. W., Vernier, P., Bally-Cuif, L., von Trotha, J. W., Vernier, P., Bally-cuif,
1826 L., et al. (2014). Emotions and Motivated Behavior Converge on an Amygdala-
1827 like Structure in the Zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3302–3315. doi:10.1111/ejn.
1828 12692
- 1829 Uceda, S., Ocaña, F. M., Martín-Monzón, I., Rodríguez-Expósito, B., Durán,
1830 E., Rodríguez, F., et al. (2015). Spatial Learning-Related Changes in
1831 Metabolic Brain Activity Contribute to the Delimitation of the
1832 Hippocampal Pallium in Goldfish. *Behav. Brain Res.* 292, 403–408.
1833 doi:10.1016/j.bbr.2015.06.018
- 1834 Vargas, J. P., López, J. C., and Portavella, M. (2009). What Are the Functions of Fish
1835 Brain Pallium? *Brain Res. Bull.* 79, 436–440. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.
1836 05.008
- 1837 Wullimann, M. F., and Mueller, T. (2004). Teleostean and Mammalian Forebrains
1838 Contrasted: Evidence from Genes to Behavior. *J. Comp. Neurol.* 475, 143–162.
1839 doi:10.1002/cne.20183
- 1840 Wullimann, M. F., Rupp, B., and Reichert, H. (1996). *Neuroanatomy of the*
1841 *Zebrafish Brain: A Topological Atlas*. 1st ed. Basel: Birkhäuser Basel. doi:10.
1842 1007/978-3-0348-8979-7
- 1843 Neuroanatomy of the Zebrafish Brain
1844 Yang, P., Kajiwara, R., Tonoki, A., and Itoh, M. (2018). Successive and Discrete
1845 Spaced Conditioning in Active Avoidance Learning in Young and Aged
1846 Zebrafish. *Neurosci. Res.* 130, 1–7. doi:10.1016/j.neures.2017.10.005
- 1847 Zupanc, G. K. H. (2021). Adult Neurogenesis in the central Nervous System of
1848 Teleost Fish: From Stem Cells to Function and Evolution. *J. Exp. Biol.* 224.
1849 doi:10.1242/JEB.226357
- 1850 Zupanc, G. K. H., Hinsch, K., and Gage, F. H. (2005). Proliferation, Migration,
1851 Neuronal Differentiation, and Long-Term Survival of New Cells in the Adult
1852 Zebrafish Brain. *J. Comp. Neurol.* 488, 290–319. doi:10.1002/cne.20571
- 1853 Zupanc, G. n. K. H., and Horschke, I. (1995). Proliferation Zones in the Brain of
1854 Adult Gymnotiform Fish: a Quantitative Mapping Study. *J. Comp. Neurol.* 353,
1855 213–233. doi:10.1002/cne.903530205
- 1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the
1882 absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a
1883 potential conflict of interest. Q17 1889
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors
1890 and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of
1891 the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in
1892 this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or
1893 endorsed by the publisher. 1894
1895
- Copyright © 2022 Mazzitelli-Fuentes, Román, Castillo Elías, Deleglise and Mongiat.
1896 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons
1897 Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is
1898 permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited
1899 and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted
1900 academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not
1901 comply with these terms. Q21 1897
- 1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938