



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
Centro Regional Universitario Bariloche

“Neurogénesis adulta y regeneración neuronal en peces teleósteos”

Octubre 2023

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas

Autora: Lic. María Soledad Ausas

Director: Dr. Lucas Mongiat

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
CAPÍTULO 1:	
Neurogénesis adulta en el	
telencéfalo de <i>Oncorhynchus mykiss</i> : Influencia del	
aislamiento social en la formación de nuevas neuronas y en la	
función cognitiva	42
INTRODUCCIÓN.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
1.1) Metodología general para el trabajo con <i>Oncorhynchus</i>	
<i>mykiss</i> (trucha arcoiris).....	53
1.1.a) Modelo experimental: <i>Oncorhynchus mykiss</i>.....	53
1.1.b) Protocolo de sacrificio, fijación y preparación del tejido	
para inmunohistoquímica.....	53
1.1.c) Protocolo general de inmunofluorescencias.....	54
1.2) Asociación circuito-función.....	58
1.2.a) Aprendizaje por evitación activa (EA) en <i>Oncorhynchus</i>	
<i>mykiss</i>.....	58
1.3) Modulación de la neurogénesis adulta.....	60
1.3.a) Aislamiento social.....	60
1.3.b) Test del “Novel Tank”	62

RESULTADOS.....	64
Asociación circuito-función	65
1.1.a) Aprendizaje por evitación activa (EA) en <i>Oncorhynchus mykiss</i>.....	65
1.2) Modulación de la neurogénesis adulta.....	74
1.2.a) Test del “Novel Tank”	76
1.2.b) Aislamiento social.....	78
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	81
CONCLUSIONES.....	89

CAPÍTULO 2:

Regeneración neuronal en *Danio*

<u>rerio.....</u>	<u>91</u>
--------------------------	------------------

INTRODUCCIÓN.....	92
--------------------------	-----------

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	102
-----------------------------------	------------

MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
----------------------------------	------------

2.1) Metodología general para el trabajo con <i>Danio rerio</i> (pez cebra).....	105
---	------------

2.1.a) Modelo experimental: <i>Danio rerio</i> (pez cebra).....	105
--	------------

2.1.b) Protocolo de sacrificio de ejemplares experimentales, disección del cerebro, fijación y preparación del tejido para inmunohistoquímica.....	105
---	------------

2.1.c) Inmunofluorescencias.....	107
---	------------

2.1.d) Análisis de Imágenes.....	109
---	------------

2.1.e) Análisis estadísticos.....	110
2.2) Lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm).....	113
2.2.a) Reproducibilidad del protocolo de lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm).....	113
2.2. b) Recomposición tisular en la región Dm del telencéfalo de <i>D. rerio</i>.....	113
2.2.c) Respuesta proliferativa a la lesión en la región dorso medial (Dm) del telencéfalo de <i>Dario rerio</i>.....	113
2.3) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de <i>Danio</i> <i>rerio</i>.....	115
2.3.a) Influencia del ambiente en la actividad proliferativa del telencéfalo de <i>Danio rerio</i> post lesión en la región Dm.....	115
2.3.b) Destino y fenotipo adquirido por los progenitores activos en respuesta a una lesión telencefálica en peces bajo diferentes condiciones ambientales.....	116
RESULTADOS	
2.1) Lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm).....	119
2.2.a) Puesta a punto del protocolo de lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm):	
2.1.b) Recomposición tisular en la región Dm del telencéfalo de <i>D. rerio</i>:	
2.2) Modulación de la regeneración neuronal.....	123
2.3.a) Influencia del ambiente en la actividad proliferativa del telencéfalo de <i>D. rerio</i> post lesión en la región Dm.....	123

**2.3. b) Modulación de la regeneración neuronal en la región
Dm del telencéfalo de *D. rerio*.....126**

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....132
CONCLUSION.....146
CONCLUSIONES FINALES.....149
BIBLIOGRAFÍA152
APÉNDICE.....176

RESUMEN

Si bien durante muchos años se consideró al sistema nervioso como una estructura fija sin ningún tipo de plasticidad, hoy en día se sabe que el cerebro posee numerosos mecanismos de plasticidad, incluyendo la neurogénesis adulta. Este proceso consiste en la generación e incorporación de nuevas neuronas en circuitos cerebrales de organismos adultos, a partir de células madre neurales. En particular los peces poseen amplios reservorios de células madre neurales, distribuidos a lo largo de todo su sistema nervioso. Esta abundante neurogénesis adulta, junto con una respuesta inmune no cicatrizante posibilita a estos organismos regenerar tejido nervioso dañado. No obstante, poco se conoce sobre los factores que pueden actuar como moduladores de ambos procesos. En esta tesis se analizó de qué manera, los cambios en el entorno (ambiental y social) de los peces impactan en el proceso de neurogénesis adulta, tanto en condiciones normales como en respuesta a un daño, utilizando como modelos de investigación dos especies de peces teleósteos, *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y *Danio rerio* (pez cebra).

Para estudiar si la neurogénesis adulta en el telencéfalo de los peces es susceptible a modulaciones de la actividad circuital, se utilizó como modelo de estudio a *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris). Inicialmente, buscamos establecer una relación estructura-función entrenando a los peces en un paradigma cognitivo de evitación activa (EA). El 50% de los individuos mostró una buena performance para aprender la consigna mientras que la otra mitad tuvo un mal desempeño. Utilizando la expresión de c-fos para evaluar la activación

neuronal, pudimos establecer las regiones telencefálicas implicadas en este proceso de aprendizaje. Encontramos que la región Dorso-medial (Dm) del telencéfalo fue una de las regiones más activadas por este desafío. Dado que la región Dm del telencéfalo está implicada en procesamiento de información emocional, decidimos explorar la hipótesis de que el aislamiento social inducirá una disminución de actividad cerebral en Dm, y consecuentemente una disminución de la neurogénesis adulta. Luego de 4 semanas en aislamiento social se observó una marcada disminución en los niveles de neurogénesis adulta en la región Dm telencefálica de los peces. A su vez, este tratamiento indujo un grave déficit en el desempeño cognitivo de *O.mykiss* en el test de EA. Los resultados reafirman la existencia de una relación estructura-función entre la región Dm y el aprendizaje en un test de EA.

En otra serie de ensayos, evaluamos si distintas condiciones ambientales y sociales (ambiente enriquecido y aislamiento social) podían modular una respuesta de regeneración neuronal ante una lesión cerebral. Utilizando como modelo de estudio a *Danio rerio* (pez cebra), estandarizamos un protocolo para lesionar exclusivamente una porción localizada y limitada de la región Dm del telencéfalo, de aproximadamente un 33% de su superficie. En condiciones control, la proliferación celular en el telencéfalo alcanza su máximo 7 días luego de efectuada una lesión en Dm de acuerdo a lo reportado por otros autores. Los peces mantenidos en ambiente enriquecido, evidenciaron una mayor respuesta proliferativa y neurogénica en Dm, con respecto al grupo control. Por otro lado, los

peces mantenidos en aislamiento social, no mostraron cambios en la respuesta regenerativa respecto del grupo control.

En función de los resultados obtenidos tanto con los experimentos realizados en trucha arcoíris como en pez cebra, puede concluirse que existe una relación bidireccional entre el aprendizaje y el ambiente con la neurogénesis constitutiva y regenerativa.

Los procesos de neurogénesis adulta y aprendizaje se encuentran estrechamente relacionados de tal forma que si se interfiere con la generación de nuevas neuronas se comprometen las habilidades cognitivas.

ABSTRACT

Although for many years the nervous system was considered a fixed structure without any plasticity, it is now known that the brain possesses numerous mechanisms of plasticity, including adult neurogenesis.

This process consists of the generation and incorporation of new neurons into brain circuits of adult organisms from neural stem cells. Fish in particular possess extensive reservoirs of neural stem cells, distributed throughout their nervous system. This abundant adult neurogenesis, together with a non-scarring immune response, enables these organisms to regenerate damaged nerve tissue. However, little is known about the factors that may act as modulators of both processes. In this thesis we analyzed how changes in the environment (environmental and social) of fish impact the process of adult neurogenesis, both under normal conditions and in response to damage using two teleost fish species, *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) and *Danio rerio* (zebrafish), as research models.

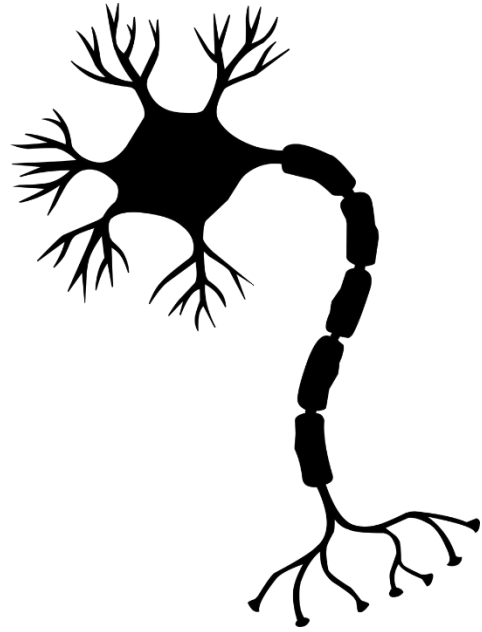
To study whether adult neurogenesis in the telencephalon of fish is susceptible to modulations of circuit activity, *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) was used as a study model. Initially, we sought to establish a structure-function relationship by training the fish in an active avoidance (AE) cognitive paradigm. Fifty percent of the individuals showed a good performance in learning the task while the other half performed poorly. Using c-fos expression to assess neuronal activation, we were able to establish the telencephalic regions involved in this learning process. We found that the Dorso-medial (Dm) region of the telencephalon was one of the

regions most activated by this challenge. Since the Dm is a brain region involved in emotional information processing, we decided to explore the hypothesis that social isolation will induce a decrease of brain activity in Dm, and consequently a decrease of adult neurogenesis. After 4 weeks in social isolation we observed a marked decrease in adult neurogenesis levels in the telencephalic Dm region of the fish. In turn, this treatment induced a severe deficit in the cognitive performance of *O.mykiss* in the AE test. The results proved the existence of a structure-function relationship between the Dm region and learning in an AE test.

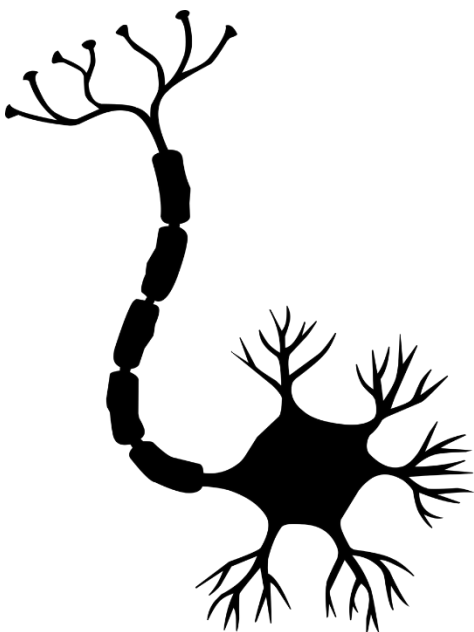
In another series of trials, we evaluated whether different environmental and social conditions (enriched environment and social isolation) could modulate a neuronal regeneration response to brain injury. Using *Danio rerio* (zebrafish) as a study model, we standardized a protocol to exclusively injure a localized and limited portion of the Dm region of the telencephalon, approximately 33% of its surface area. Under control conditions, cell proliferation in the telencephalon peaks 7 days after injury to the Dm as reported by other authors. Fish kept in an enriched environment showed a greater proliferative and neurogenic response in Dm, with respect to the control group. On the other hand, fish kept in social isolation did not show changes in the regenerative response with respect to the control group.

Based on the results obtained with both rainbow trout and zebrafish experiments, it can be concluded that there is a bidirectional relationship between learning and environment with constitutive and regenerative neurogenesis.

The processes of adult neurogenesis and learning are closely related in such a way that interfering with the generation of new neurons compromises cognitive abilities.



INTRODUCCIÓN GENERAL



Neurogénesis adulta: Historia y métodos de estudio

La plasticidad neuronal es el conjunto de procesos por los cuales se generan modificaciones en el sistema nervioso central (SNC). Las modificaciones pueden involucrar cambios en las membranas celulares de neuronas individuales, cambios en la eficacia con la que una neurona puede excitar a otra y en el número de sinapsis. Por otro lado, pueden incorporarse nuevas neuronas en redes preexistentes generándose modificaciones estructurales y en la dinámica de las redes neuronales. Una de las formas de plasticidad neuronal muy estudiadas en las últimas décadas es la neurogénesis adulta o neurogénesis constitutiva (Kemperman y Gage 1999; Ming y Song 2011), que es la producción de neuronas nuevas en cerebros adultos.

Durante muchos años las neurociencias se regían bajo el siguiente postulado de Santiago Ramon y Cajal en 1928: *“Una vez finalizado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y las dendritas se secan irrevocablemente. En los centros de adultos, los caminos nerviosos son algo fijo e inmutable: todo puede morir, nada puede regenerarse”*. Este dogma planteaba que la producción de nuevas células en el sistema nervioso central sólo era posible y conducente durante el desarrollo embrionario, dado que la complejidad de las conexiones y arquitectura del sistema nervioso adulto se consideraban incompatibles con la integración de nuevas células.

Debido a la falta de herramientas moleculares y biológicas, el dogma planteado por Ramon y Cajal no pudo ser cuestionado hasta el desarrollo de técnicas que permitieron la visualización inequívoca de la proliferación celular, con

destino neuronal en el tejido nervioso. En este marco, se desarrolló una técnica para marcar el ADN de células en división durante su fase de síntesis (fase S) del ciclo celular, que es el único momento en el que las células tienen la capacidad de incorporar a gran escala nucleótidos durante la duplicación del ADN, marcándolo de forma indeleble. La utilización de nucleótidos modificados para marcar el ADN necesita de la administración sistémica de un marcador que se incorporará en el ADN de las células que se encuentran en fase S. La marcación de células en división permitió indagar en la generación de neuronas nuevas en cerebros adultos. Así, los primeros datos de neuronas producidas en cerebros adultos fueron aportados por los trabajos realizados por Altman y Das en 1965 en ratas de laboratorio. En este marco se ubicaron zonas de proliferación celular en el giro dentado del hipocampo, el neocortex y el bulbo olfatorio de estos mamíferos. Sin embargo, al no poder determinar el compromiso neuronal de las células marcadas, estos estudios no fueron valorados. Unos 20 años más tarde, otros trabajos realizados en canarios, han demostrado fehacientemente la integración de nuevas neuronas en áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje del canto (Goldman, S. A. y Nottebohm 1983; Paton y Nottebohm 1984). Nottebohm y colaboradores pudieron corroborar que en los circuitos cerebrales de canarios adultos se generan nuevas neuronas y que éstas se integran funcionalmente en los circuitos preexistentes. No obstante, los estudios de la neurogénesis adulta realizados en primates no hallaron producción de nuevas neuronas (Pasko Rakic 1985), y se postuló que los descubrimientos realizados por Nottebohm correspondían a especializaciones evolutivas de las aves. Por lo tanto, todos los

estudios que había hasta el momento y sus interpretaciones, contribuyeron a mantener vigente la noción de que en cerebros de mamíferos adultos no se generan nuevas neuronas.

Hacia 1990, la utilización de técnicas de inmunohistoquímica, en específico las inmunofluorescencias, junto con el desarrollo de la microscopía confocal, permitieron desarrollar nuevos marcadores específicos que posibilitaron la identificación de diferentes fenotipos neuronales (Cameron *et al.*, 1993; Seki y Arai 1993). Actualmente uno de los marcadores de ADN más utilizados para la identificación y seguimiento de una cohorte definida de células es un análogo sintético de la timidina, la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU). La utilización conjunta de las inmunofluorescencias y el BrdU permitió determinar el fenotipo de las células producidas en el sistema nervioso, cuánto tiempo pasa desde su generación, el proceso de diferenciación y maduración neuronal, así como la integración sináptica y sobrevivencia de las nuevas neuronas (Miller y Nowakowski 1988; Seki y Arai 1993). Por ejemplo, mediante el uso de estas herramientas pudo observarse diferenciación neuronal en cultivo de células progenitoras neurales (NPC's) obtenidas de tejido cerebral de mamífero adulto (Reynolds Weiss, 1992; Richards *et al.*, 1992; Loisy Álvarez-Buylla 1993). La posibilidad de co-localizar BrdU con marcadores neuronales, mediante el uso de microscopios confocales, fue la herramienta necesaria para poder confirmar la presencia de nuevas neuronas en tejido cerebral. En este marco, experimentos realizados por el grupo de Fred Gage corroboraron la existencia y permitieron cuantificar la magnitud de la neurogénesis adulta en el cerebro adulto de roedores y humanos (Kuhn, *et al.*,

1996; Kemperman *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1998). En función de estos estudios pudo demostrarse la existencia de células progenitoras multipotentes en el giro dentado adulto del hipocampo, capaces de generar nuevas neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage *et al.*, 1998). Años más tarde, se avanzó en el desarrollo de partículas retrovirales derivadas del Moloney Murine Leukemia virus (MMLV) con el fin de utilizarlas como vectores para marcar de manera indeleble, mediante inserción del gen de la green fluorescence protein (GFP) en el genoma, células en división mitótica. Con este nuevo desarrollo, se pudo corroborar que las nuevas neuronas generadas en el hipocampo adulto se integran funcionalmente en los circuitos neuronales existentes y pueden contribuir al aprendizaje y la memoria (van Praag *et al.*, 2002). A su vez, estos avances metodológicos también han podido caracterizar las distintas etapas morfológicas de maduración de las neuronas granulares dentadas en el hipocampo de ratón adulto, lo que es importante para comprender los mecanismos de la neurogénesis adulta (Espósito *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Finalmente, mediante estos avances, se ha descrito que la neurogénesis constitutiva es necesaria para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del cerebro anterior adulto, especialmente en el bulbo olfatorio y el hipocampo (Imayoshi *et al.*, 2008). Los avances realizados en el estudio del encéfalo, la proliferación celular y la posibilidad de hacer un seguimiento temporal y del destino de cohortes celulares completas (origen, migración y diferenciación) han proporcionado evidencia convincente de la existencia de la neurogénesis en etapas posteriores al desarrollo y en la vida adulta.

Neurogénesis adulta: Nichos neurogénicos y progenitores neurales

Los sitios del SNC donde se producen neuronas nuevas reciben el nombre de *nichos neurogénicos*, que son zonas donde se encuentran los progenitores neurales (células madre capaces de generar neuronas). Los nichos neurogénicos son ambientes celulares con condiciones permisivas para la proliferación de los progenitores neurales y su diferenciación a fenotipo neuronal. Se caracterizan por poseer un microambiente específico donde coexisten: una matriz extracelular característica, similar a la existente durante el desarrollo embrionario, factores tróficos y moléculas que interactúan con los progenitores neurales, regulando la proliferación celular, e interviniendo en el desarrollo de los precursores a fenotipo neuronal (Shen *et al.*, 2008; Kazanis *et al.*, 2013). Además, se ha estipulado que, el desarrollo e integración de nuevas neuronas en un cerebro maduro sigue un patrón ontogénico que incluye: autorenovación del reservorio de células progenitoras neurales (NPC's), diferenciación (a astrocito, oligodendrocito o neurona), maduración, migración, y finalmente conexión con circuitos preexistentes para comenzar a participar del procesamiento de información en estos circuitos (Laplagne *et al.*, 2006; Laplagne *et al.*, 2007; Piatti *et al.*, 2011; Kemperman 2012; Kazanis 2013). Las células progenitoras neurales resultan una importante fuente de plasticidad cerebral (Mongiat y Schinder 2011) y constituyen una potencial fuente de neuronas capaces de reparar tejido cerebral en respuesta a daños como: isquemia, trauma o incluso procesos neurodegenerativos (Bellenchi *et al.* 2013).

Neurogénesis adulta en la evolución de los vertebrados

La neurogénesis adulta es un importante componente de la plasticidad cerebral para el sistema nervioso de los vertebrados, y es un rasgo altamente conservado en la evolución de los vertebrados, (Figura 1). Actualmente existe evidencia que constata la presencia de neurogénesis adulta en el SNC de peces, reptiles, aves y mamíferos incluido el ser humano. No obstante, existe entre los diferentes grupos de vertebrados muchísima variación en la extensión, ubicación y características tales como el tipo de progenitores que los componen (Labusch *et al.*, 2020). Al analizar el fenómeno desde una perspectiva filogenética, se observa un gradiente descendiente en la cantidad y extensión de los nichos neurogénicos (Kempermann 2012). En vertebrados no-mamíferos (peces, reptiles y anfibios), la neurogénesis adulta ocurre en múltiples regiones cerebrales (Chapouton, Jagasia, y Bally-Cuif 2007; Kaslin, Ganz, and Brand 2008; Bonfanti, Rossi, and Zupanc 2011; Kempermann 2012). En contraste, en el SNC de los mamíferos adultos existen solo dos regiones en las que se generan nuevas neuronas: la zona sub-ventricular (SVZ) de la pared de los ventrículos laterales y la zona sub-granular (SGZ) del giro dentado en el hipocampo (Figura 2. Lledo *et al.*, 2006). Estas regiones contienen células progenitoras neurales inmersas en un medio-ambiente propicio para dar lugar a nuevas neuronas, las cuales se integran funcionalmente en los circuitos del bulbo olfatorio (derivadas de la SVZ) y del hipocampo (derivadas de la SGZ). Estudios previos han demostrado que, en determinados casos, los progenitores neurales de la SVZ pueden contribuir a la reparación

tisular en caso de que se efectúen daños en forma experimental (Arvidsson et al. 2002; Parent et al. 2002; Goings, Sahni, and Szele 2004; Ohab et al. 2006; Thored et al. 2007; Kojima et al. 2010).

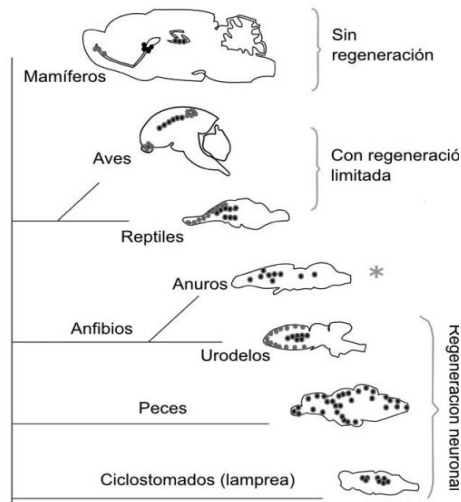


Figura 1. Árbol filogenético donde se ubican a los diferentes grupos de vertebrados y se muestra una vista esquemática del cerebro de cada grupo y sus nichos neurogénicos. Extraído de Kaslin *et al.*, 2006

A modo de breve reseña histórica se han encontrado neurogénesis adulta en el cerebro de peces, anfibios (Hitchcock 2004; Powers 2016), reptiles (Font *et al.*, 2001; Gonzales Granero *et al.*, 2011) e incluso aves y mamíferos (Nottebohm 1985; Goldman y Nottebohm, 1983; Alvarez-Buylla *et al.*, 1983; Barnea y Nottebohm 1994) (Figura 1 y 2).

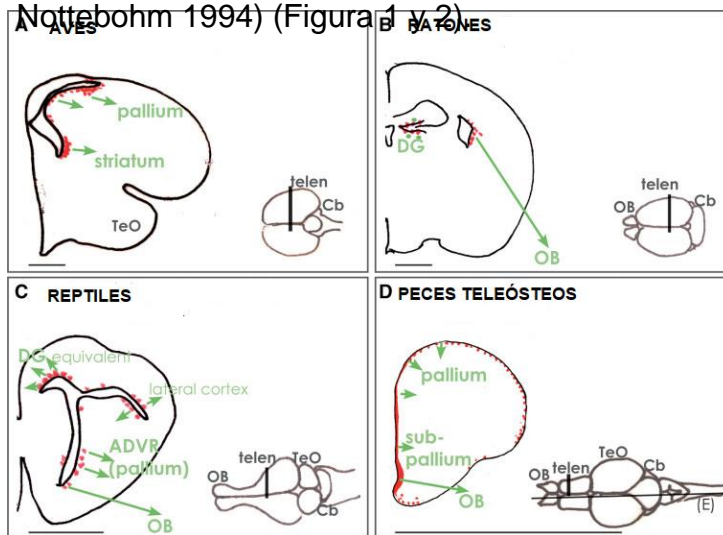


Figura 2. Comparación de las zonas de proliferación en diferentes especies de vertebrados: Zonas proliferativas (con mitosis activa) en la región telencefálica de aves (A) Aves; (B) Ratones; (C) Reptiles y (D) Peces teleosteos. Se indica en cada panel la localización anteroposterior de la sección esquematizada. En rojo se indican las células en división, y en verde el destino de las nuevas neuronas generadas. Extraído de Chapouton *et al.*, 2007

En el cerebro de pez cebra (*Danio rerio*), se han encontrado más de 16 áreas proliferativas, distribuidas principalmente en las porciones dorsales y ventrales de las superficies ventriculares del telencéfalo (Grandel *et al.*, 2006; Adolf *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2013), la zona con mayor proliferación es la zona sub pial, ubicada en la línea media del telencéfalo y que, como ya se mencionó anteriormente, resulta homóloga a la zona sub ventricular del cerebro de los mamíferos (Grandel *et al.*, 2006). Existen diferencias entre los nichos neurogénicos, en cuanto a los tipos de células que conforman el ambiente celular de los progenitores neurales y en la tasa de formación de nuevas neuronas (Lindsey *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2013). En los teleosteos, el telencéfalo se desarrolla por eversión, haciendo que la zona ventricular se localice en la superficie externa del telencéfalo. De esta manera, los progenitores neuronales en división se encontrarán recubriendo la superficie externa. Las nuevas neuronas que se originan en la zona periventricular del telencéfalo de peces, pueden diferenciarse en neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas, o dopaminérgicas (Adolf *et al.*, 2006; Grandel *et al.*, 2006).

Por otro lado, en los reptiles las zonas de proliferación recubren toda la capa de células endodiales de los ventrículos y en la mayoría de estas zonas se originan nuevas neuronas que originan células granulares y unas pocas células periglomerulares en el bulbo olfatorio (Gonzalez-Granero *et al.*, 2011). Otras neuronas producidas por neurogénesis adulta, permanecen en el telencéfalo y se incorporan principalmente en el área dorsal ventral y el área dorsal ventral rostral

del pallium, el núcleo esférico del subpallium, y principalmente en el bulbo olfatorio accesorio (García Verdugo *et al.*, 2002; Powers 2016).

En aves se ha encontrado que las células que recubren el ventrículo lateral se distribuyen limitadamente en la parte ventral y sobre el borde dorsolateral del ventrículo. Las zonas neurogénicas en el telencéfalo originan neuronas nuevas en el campo principal de entrada (CM), el campo principal de procesamiento (CP), y en el núcleo espiral de la banda diagonal (ES), una región implicada en el aprendizaje y la memoria, el nidopallio y, mediante migración tangencial llegan al cuerpo estriado (LPO). En estas regiones hay dos núcleos específicos del telencéfalo implicados en el control motor de la producción del canto que incorporan nuevas neuronas a un ritmo elevado: el centro vocal superior (CVS) en el nidopallio y el área X en el cuerpo estriado. Se generan dos nuevos tipos de neuronas: interneuronas y neuronas de proyección, que se integran en los circuitos preexistentes. Finalmente, el bulbo olfatorio no incorpora nuevas neuronas. También se han encontrado células en división dispersas en el parénquima del telencefalo, el diencefalo y el mesencefalo, de las que es dudoso su destino final (Goldman y Nottebohm 1983; Goldman y Nottebohm 1983; Nottebohm 1985; Alvarez-Buylla *et al.*, 1988; Alvarez-Buylla y Nottebohm 1988; Barnea y Nottebohm 1994; Kirn y Alvarez-Buylla 2003; Jarvis 2004; Liedvogel y Mouritsen 2010).

En los ratones, a través de la corriente migratoria rostral (RMS), las células de la zona subependimal (ZSE) recubren el ventrículo lateral, se dividen y generan neuronas que se dirigen a la capa de células granulares y a la capa glomerular del

bulbo olfatorio (OB). También se generan neuronas en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo cuyo destino se encuentra dentro del mismo giro dentado (Altman y Das 1965; Lois y Álvarez-Buylla 1994; Ming y Song 2005; Álvarez-Buylla *et al.*, 2008).

En términos evolutivos se han podido establecer homologías entre las regiones neurogénicas de los peces y reptiles con los mamíferos. Interesantemente, la zona dorso-lateral del telencéfalo de los peces teleósteos es funcionalmente homóloga al hipocampo de los mamíferos, zona donde se han descrito focos de proliferación y neurogénesis. Por otro lado, existe un paralelismo directo entre la producción neuronal en la corteza medial de los lagartos y en el giro dentado del hipocampo de los mamíferos. En los mamíferos, las neuronas recién nacidas del GD proyectan fibras a la región CA3; en los lagartos, las neuronas generadas de la corteza medial se proyectan a la corteza dorsomedial. Las neuronas generadas en el cerebelo de los lagartos se localizan específicamente en la capa granular.

En este marco, debido a la disposición y cantidad de las zonas neurogénicas (ver figura 3), los peces teleósteos se han transformado en un buen modelo para el estudio de la neurogénesis adulta (Zupanc y Zupanc, 1992; Zupanc y Horschke, 1995; Ekstrom *et al.*, 2001; Adolf *et al.*, 2006; Grandel *et al.*, 2006; Zupanc, 2006).

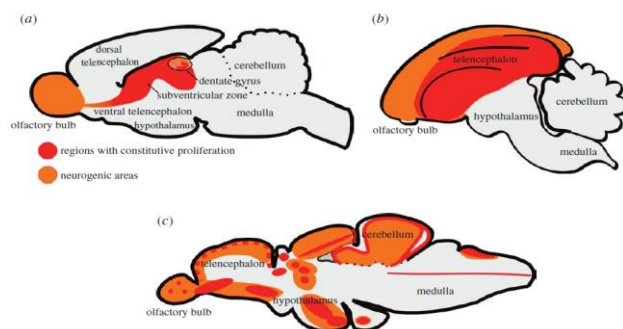


Figura 3. Representación esquemática de cortes parasagitales del cerebro de tres vertebrados a) ratón; b) ave y c) pez. En naranja se indican las zonas neurogénicas y en rojo las zonas con proliferación constitutiva. Nótese la extensión y cantidad de zonas proliferativas de los peces (c) a comparación con los mamíferos (a). Imagen tomada de Grandel *et al.*, 2008.

Neurogénesis adulta en peces teleósteos

Los peces poseen un patrón de crecimiento continuo a lo largo de la vida, deben acompañar dicho crecimiento mediante la generación de nuevas neuronas en el SNC, provocando que a medida que aumenta la edad del pez, aumente el tamaño corporal, el número de neuronas en el cerebro y el tamaño cerebral (Richter y Kranz 1970; Clint y Zupanc 2001; Zupanc y Sirbulescu 2011).

Debido a su abundante neurogénesis constitutiva y a la capacidad de regenerar tejido nervioso en respuesta a un daño, diversos trabajos han abordado el estudio de la neurogénesis adulta en peces (Zupanc *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006; Kemperman 2012). La combinación de técnicas de marcación de ADN y de inmunohistoquímica para la visualización y caracterización de nuevas células, fue fundamental para el estudio de la neurogénesis adulta y su contribución a los mecanismos de plasticidad neuronal. La neurogénesis adulta ha sido estudiada extensamente en numerosas especies de peces teleósteos, entre las que se encuentran *Apteronothus leptorhynchus* (Clint y Zupanc 2001), *Danio rerio* (Grandel *et al.*, 2006), *Nothobranchius furzeri* (Di Cicco *et al.*, 2011), *Odontesthes bonariensis* (Strobl-Mazzulla *et al.*, 2010) *Oncorhynchus mykiss* (Mazzitelli Fuentes 2016; Ausas *et al.*, 2019). Estos estudios ubicaron nichos neurogénicos en el telencéfalo (bulbo olfatorio, telencéfalo dorsal y ventral), en el diencefalo (zona pre óptica, tálamo e hipotálamo), en el mesencefalo (en el tectum óptico) y en el cerebelo (corpus cerebelli, valvula cerebelli y eminentia granularis; Zupanc 2008). Mediante incorporación del análogo de timidina 5 – Bromo-2-deoxyuridina (BrdU) y posterior trazado, se pudo determinar que el telencéfalo de estos peces contiene

una población auto-renovable de progenitores neurales distribuidos a lo largo del eje dorso-ventral de la zona ventricular.

En el pez cebra se evidenciaron nichos neurogénicos en regiones del telencéfalo dorsal, el bulbo olfatorio, el área pre óptica, la zona dorsal del hipotálamo, el tectum óptico, el torus longitudinalis, el lóbulo vagal, parénquima del ventrículo romboencefálico, en médula oblonga y en cerebelo, (Grandel et al. 2006; Zupanc *et al.*, 2005). Al menos en cerebelo aproximadamente la mitad de las nuevas neuronas se integran en los circuitos del cerebro adulto y sobreviven por el resto de la vida del pez, mientras que el resto es eliminado por apoptosis (Zupanc *et al.*, 2005; Zupanc y Sîrbulescu 2011).

A nivel mecanístico, se han identificado numerosos factores de crecimiento que juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de células madre neurales. Entre los mecanismos de señalización celular se ha encontrado que hay varias vías de señalización implicadas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Entre ellas se encuentran la vía de señalización Notch, la vía de señalización de Wnt/ β -catenina y la vía de señalización de Sonic Hedgehog (Shh). Estudios en el cerebro de trucha arcoíris han demostrado que el FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos) estimula la proliferación de células madre neurales y promueve la formación de nuevas neuronas (Ganz *et al.*, 2010). Otro factor de crecimiento que se ha encontrado es el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Investigaciones en la carpa común revelaron que el IGF-2 promueve la proliferación de células madre neurales en el cerebro. Además, las neurotrofinas, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico

derivado del cerebro (BDNF), también desempeñan un papel crucial en la neurogénesis en peces (de Girolamo y D'Angelo 2021). Estudios en el pez cebra han demostrado que estas neurotrofinas están involucradas en la supervivencia celular y la especificación de tipos celulares neurales (Kishimoto *et al.*, 2012). Además, se ha descubierto que la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) están involucrados en la proliferación y diferenciación de células madre neurales, así como en la supervivencia celular en peces (Kishimoto *et al.*, 2012). Estos reguladores, junto con otros aún en estudio, forman una red compleja y coordinada de señales que controlan la neurogénesis en los peces, permitiendo la generación y el mantenimiento de nuevas células nerviosas en el cerebro y la médula espinal.

Neurogénesis regenerativa

En algunos grupos de animales la neurogénesis adulta contribuye en la reparación y recuperación del tejido neuronal luego de una lesión. Las nuevas neuronas pueden migrar a áreas dañadas y reemplazar las neuronas perdidas, contribuyendo así a la recuperación funcional (Aimone *et al.*, 2014). Mediante doble marcación por inmunofluorescencia, pudo determinarse fenotipo neuronal identificando células BrdU positivas y marcadores neuronales. En el subpalium ventral se han encontrado numerosos focos neurogénicos con neuronas nuevas (BrdU+) con inmunoreactividad para tirosina hidroxilasa (dopaminérgicas), 5-hidroxytriptamina (serotoninérgicas) y parvalbúmina (GABAérgicas) (Adolf *et al.*, 2006; Grandel *et al.*, 2006). A su vez las células madre neuronales del subpalio ventral generan progenitores y neuroblastos que se dividen rápidamente y llegan

al bulbo olfatorio (OB) por medio de migración rostral y se diferencian en neuronas GABAérgicas y TH positivas de manera homóloga a la zona subventricular de los mamíferos (Adolf *et al.*, 2006).

Los peces poseen la capacidad de regenerar tejido nervioso e incorporar nuevas neuronas en respuesta a daño, (Clint and Zupanc 2001; G. K. H. Zupanc and Sîrbulescu 2011). Esta capacidad regenerativa del cerebro adulto de peces es posible debido a una serie de procesos celulares que ocurren de manera coordinada: existencia de nichos neurogénicos y proliferación de progenitores neuronales, migración a los sitios dañados y, putativamente, diferenciación e integración de las nuevas neuronas en los circuitos existentes. El gran número de focos neurogénicos y la capacidad regenerativa hacen de los peces teleósteos un modelo de gran interés para estudiar la reparación de tejido neuronal en respuesta al daño (Chapouton *et al.* 2007; Kaslin *et al.*, 2008; Kroehne *et al.* 2011).

La neurogénesis regenerativa es un proceso que involucra al sistema nervioso, al sistema inmunológico y numerosas vías de señalización que se activan luego de que un daño en el tejido nervioso altere el equilibrio homeostático cerebral (Lindsey *et al.*, 2019). Además, un proceso neuroregenerativo del sistema nervioso central (SNC) implica la correcta integración sináptica de las nuevas neuronas con decenas de pares dentro del propio circuito e incluso en regiones distales del cerebro.

Los daños causados por una lesión en el cerebro desencadenan una serie de procesos que derivan en la activación de los mecanismos regenerativos (Kyrystys

et al., 2012). La respuesta regenerativa implica alteraciones en la quiescencia y la actividad proliferativa de diferentes tipos de progenitores, usando en muchos casos programas de proliferación celular que intervienen en la neurogénesis en condiciones homeostáticas. La regeneración en diferentes áreas del SNC del pez cebra ha sido ampliamente estudiada utilizando diferentes paradigmas de lesión entre los que se incluyen daños mecánicos, químicos y electroquímicos (Kroehne *et al.*, 2011; Kishimoto *et al.*, 2012; Diotel *et al.*, 2013; Skaggs *et al.*, 2014).

Numerosos programas celulares están involucrados en la activación de progenitores neuronales que se encuentran quiescentes y se activan en respuesta a una lesión contribuyendo con la neurogénesis restauradora (Kroehne *et al.*, 2011; Kishimoto *et al.*, 2012; Cacialli *et al.*, 2017; Kumar y Mondal 2018). Durante la ontogenia, se producen diversas etapas de proliferación, diferenciación y migración celular que son similares a los procesos que ocurren durante la regeneración neuronal en respuesta a una lesión (Zupanc 2008; Ming y Song 2011). En ambos casos, las células progenitoras neurales se dividen y generan células hijas que se diferencian en neuronas o células gliales y migran hacia su destino final. Además, se han identificado factores de crecimiento y señalización celular que participan en ambos procesos (Ming y Song 2011), como el factor de crecimiento nervioso (NGF), la proteína morfogenética ósea (BMP), la vía de señalización Notch, entre otros. Por ejemplo, el programa celular de polarización, que es esencial para el desarrollo y la función neuronal, también está involucrado en la regeneración neuronal. En la polarización, las células neuronales desarrollan una morfología única con dendritas y un axón distinguibles. Este proceso se

controla por la regulación de varias proteínas y moléculas de señalización, como la familia de proteínas de la quinasa GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) y la proteína de interacción de axones y células gliales (NAP-22). Otro programa celular común es el programa de apoptosis, que elimina células excedentes durante el desarrollo y la homeostasis celular normal. Durante la regeneración neuronal, el programa de apoptosis puede activarse en respuesta al daño celular para eliminar células dañadas y promover la supervivencia de las células neuronales sanas. También se ha sugerido que el programa de senescencia celular, implicado en el envejecimiento celular estaría involucrado en la regeneración neuronal. Algunos estudios han demostrado que las células neuronales senescentes se acumulan en el cerebro en respuesta al daño celular promoviendo la regeneración neuronal y la reparación del tejido nervioso. No obstante, todavía no se comprende por completo el papel de la senescencia celular en la regeneración neuronal (Gage *et al.*, 2007; Ming y Song 2011; Aimone *et al.*, 2014; Bond *et al.*, 2015; Bonaguidi y Song 2018).

Luego de la activación de los progenitores, se activan los programas de señalización celular que regulan la neurogénesis adulta y/o intervienen en el desarrollo de las nuevas neuronas (Zambusi y Ninkovic 2020). Algunas señales celulares implican dominios proteicos (Prok2 y EVH1) asociados a factores de crecimiento que en un contexto de regeneración neuronal intervienen en la migración y supervivencia de progenitores neuronales hacia el sitio de lesión (Ayari *et al.*, 2010; Kishimoto *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2016). También, se ha encontrado en el telencéfalo del pez cebra cerca del sitio de lesión, expresión

ectópica de Prok2, que actuaría en primera instancia como quimioatrayente dirigiendo la migración y posteriormente como factor neurotrófico (Ayari *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2016). De forma similar, las neuronas jóvenes HuC/D-positivas utilizan procesos epéndimo gliales radiales como andamiaje para migrar a sus lugares diana en el cerebro lesionado de igual forma que durante el desarrollo a lo largo de los procesos radiales de la glía (Lim *et al.*, 2016). En función de este tipo de evidencia, puede decirse que la capacidad intrínseca de regeneración en el SNC del pez cebra adulto se sostiene por la intervención de programas específicos asociados a la lesión, y que mediante la reactivación de programas de desarrollo se potencia la regeneración, utilizando las funciones de genes que se encuentran normalmente presentes en el SNC intacto (Zambusi y Ninkovic 2020).

Dada la alta capacidad regenerativa y la amplia distribución de nichos neurogénicos en el cerebro de los teleósteos, puede suponerse que entre la neurogénesis constitutiva y la regeneración neuronal haya mecanismos compartidos (Zambusi y Ninkovic 2020). Por ejemplo, la vía de Notch interviene tanto en la neurogénesis constitutiva como en la regeneración neuronal. En el cerebro sin lesionar en el pez cebra, la vía de señalización Notch (que tradicionalmente interviene en la diferenciación celular actuando sobre la amplificación y consolidación de diferencias entre células adyacentes) promueve la quiescencia de las células ependimogliales (Chapouton *et al.*, 2010; Alunni *et al.*, 2013). En respuesta a una lesión en el telencéfalo, aumenta la expresión de receptores Notch1 y Notch3 (Kishimoto *et al.*, 2012; Rodríguez Viales *et al.*, 2015). La vía de Notch es una cascada de señalización altamente conservada en la

biología celular de los vertebrados, y también se ha descrito la activación de esta vía de señalización celular en asociación a la neurogénesis en el cerebro de ratón (Carlen *et al.*, 2009; Magnusson *et al.*, 2014). Una lesión en el núcleo estriado disminuye la señalización de la vía de Notch en las células endociliales, y esta reducción guía la diferenciación de los linajes neuronales, sin entrar en el ciclo celular (Carlen *et al.*, 2009). La activación de Notch1 en respuesta a la lesión, detiene la activación de las células endociliales y la producción de neuronas inmaduras. Además, la señalización de Notch1 disminuye en los astrocitos del núcleo estriado luego de la lesión, favoreciendo la neurogénesis (Magnusson *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha encontrado en pez cebra, que luego de una lesión en el telencéfalo, la activación de Notch 1 es fundamental para la activación de la respuesta regenerativa. En diversos experimentos se ha encontrado que la inhibición de la vía de Notch, luego de efectuada una lesión, anula la proliferación de la endocilioglia e impide la reparación del tejido dañado (Kishimoto *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren una funcionalidad específica de Notch1 luego de efectuada una lesión, en la que se promueve la activación y proliferación de células endociliogliales, en contraste con su comportamiento en condiciones normales (en el telencéfalo sano). No obstante, en este mismo contexto regenerativo, bloquear la regulación de Notch3 aumenta significativamente los niveles de proliferación de ciertos progenitores mientras que disminuye la proliferación de los que están quiescentes. En este caso, la señalización de Notch3 tendría la misma función que la observada en el cerebro en condiciones normales, mantener quiescentes las células endociliogliales (Chapouton *et al.*,

2010; Alunni *et al.*, 2013; Rodríguez Viales *et al.*, 2015). Por otro lado, también existen programas celulares específicos que se activan ante la necesidad de regenerar tejido, no obstante, no es la intención de este manuscrito profundizar en estos aspectos de la regeneración neuronal.

Existen a su vez, diferentes tipos de quiescencia de los progenitores (Otsuki y Brand 2020). Por ejemplo, los progenitores que componen la glia radial reaccionan a lesiones con objetos punzantes a través del cráneo como consecuencia de la estimulación de proteínas específicas asociadas a la inflamación glial (Marz *et al.*, 2010; Kishimoto *et al.*, 2012), mientras que esta reacción no se observa cuando el daño se produce a través de los orificios nasales (Krohene *et al.*, 2011). En este sentido, la trayectoria del objeto punzante es determinante en la magnitud del daño sobre las estructuras y tejidos adyacentes a la zona que desea lesionarse. Al lesionar a través del cráneo se generan daños en huesos y meninges llegando hasta la zona periventricular y parénquima. Mientras que al efectuar la lesión a través de los orificios nasales se accede de forma directa a la estructura de interés, y se minimiza la cantidad de estructuras dañadas en el camino del objeto punzante. Por otro lado, las variaciones ambientales o la estimulación sensorial inducen cambios en la actividad de los progenitores (Lindsey *et al.*, 2014) sugiriendo que la regeneración neuronal podría resultar influenciada por el entorno. En este sentido, los cambios en la actividad de los circuitos neuronales, pueden ejercer influencia sobre los progenitores neuronales de los nichos neurogénicos ubicados en la región lesionada.

Factores que afectan la neurogénesis constitutiva de peces

La neurogénesis adulta no es un proceso estático, sino que es susceptible a los cambios en la actividad cerebral. Estos cambios en general, se asocian a la actividad física o a la estimulación sensorial (van Praag 2009). Por ejemplo, en los peces, el tamaño del cerebro se correlaciona con la actividad física, la estimulación sensorial, y la estimulación social, factores que promueven la neurogénesis adulta (Kihslinger *et al.*, 2006; Ebbesson y Braithwaite 2012). Estudios realizados en el pez *Nothobranchius furzeri* establecieron un decaimiento de la neurogénesis adulta relacionado al envejecimiento. Empleando marcación por BrdU y métodos de estereología no sesgados, los autores describieron una disminución en aproximadamente un 80% del número de células mitóticamente activas en el tectum óptico de peces envejecidos respecto de individuos jóvenes (Tozzini *et al.*, 2012). Esta reducción en la actividad mitótica se ve acompañada de una disminución en el número de células BrdU que expresan el marcador de neuronas inmaduras DCX y de un aumento dramático de células GFAP positivas, sugiriendo un cambio en el balance neurona/glia asociado al envejecimiento. Rothenaigner y colaboradores han utilizado retrovirus derivados del MMLV para marcar de manera indeleble progenitores neuronales en división con el fin de estudiar la neurogénesis adulta en el telencéfalo de zebrafish (Rothenaigner *et al.*, 2011). Los autores establecen que el proceso de maduración de las neuronas nuevas requiere de varias semanas para que éstas logren integrarse funcionalmente en los circuitos locales. Más aún, mediante análisis clonal se observó que los progenitores sufren diferentes tipos de división y destino: a) neuroblastos que inicialmente transitan una etapa de amplificación y luego pasan

a una fase neurogénica de divisiones simétricas; b) glía radial, las cuales constituyen verdaderas células madre neuronales, con capacidades de auto-renovación y de generar diversos tipos celulares.

Por otro lado, existen factores que actúan como depresores del sistema nervioso central, por ejemplo, ciertas drogas, el estrés o el aislamiento social disminuyen la neurogénesis adulta (Duman *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 2013). Existe numerosa evidencia que demuestra cómo el entorno influye en la neurofisiología y el comportamiento de los individuos (Sorensen *et al.*, 2013; Dunlap *et al.*, 2016). Si bien la neurogénesis adulta y la regeneración neuronal han sido caracterizadas en numerosos estudios, son pocos los trabajos que aplican un enfoque experimental para estudiar estos procesos y su relación con el ambiente y el aprendizaje. Se ha propuesto que la neurogénesis adulta tiene un rol fundamental en los ajustes comportamentales que los organismos deben realizar ante nuevas e impredecibles señales ambientales tanto ambiguas como amenazantes (Glover *et al.*, 2017), y en la incorporación de aprendizajes (Lindsey *et al.*, 2020).

Telencéfalo de los peces teleósteos

Este trabajo de Tesis se centra en el estudio de la neurogenesis adulta y la regeneración neuronal en el telencéfalo de peces, es por esto que a continuación heremos una breve introducción a esta región cerebral. El telencéfalo es una de las regiones cerebrales que exhibe mayor diversidad estructural, y al cual se le atribuyen numerosas funciones cognitivas que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución. A lo largo de la filogenia, el desarrollo y la

morfología de las distintas estructuras del encéfalo de los vertebrados se ha ido modificando. A diferencia de los mamíferos, el telencéfalo de los peces teleósteos posee un desarrollo embrionario por eversión, en lugar de evaginación, dando lugar a dos hemisferios separados entre sí por un ventrículo en forma de T rodeado por una membrana coróidea, la cual se prolonga hacia la región dorsal de ambos lóbulos. En consecuencia, el telencéfalo no conforma el par de estructuras tubulares que constituyen los ventrículos laterales de otros vertebrados, sino que se desarrolla en dos hemisferios sólidos.

Al igual que en mamíferos, en peces adultos la zona peri ventricular del telencéfalo constituye un importante nicho neurogénico bien definido (Zupanc y Sîrbulescu 2011). 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 dorso-medial (Dm), dorso-central (Dc), dorso-lateral (DI) y dorso-posterior (Dp). La parte ventral o subpallium, se divide en dos regiones principales, una dorsal (Vd) y otra Ventral (Vv) (Figura 4; Ganz *et al.*, 2016). El telencéfalo de los peces recibe proyecciones de todos los sistemas sensoriales y posee conexiones recíprocas del núcleo sensorial multimodal del diencéfalo (complejo periglomerular), con una abundante inervación noradrenérgica y serotoninérgica. En diferentes regiones del telencéfalo se describió la presencia de neuronas de tipo piramidal (Pushchina *et al.*, 2003; Giassi, Duarte, *et al.* 2012; Giassi, Harvey-Girard, *et al.* 2012).

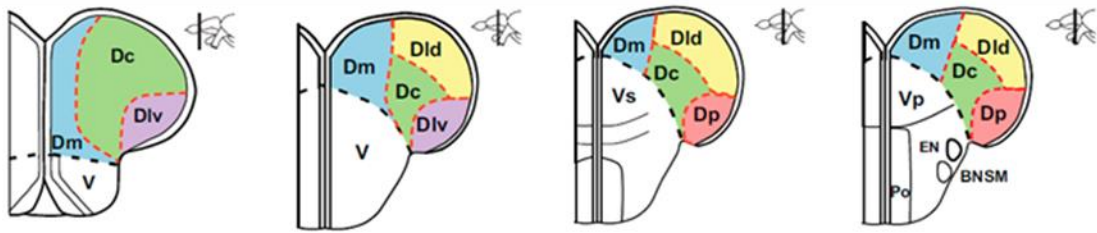


Figura 4. Representación esquemática de secciones transversales del telencéfalo. Se muestran Las subdivisiones del pallium y subpallium del telencéfalo en a lo largo del eje antero-posterior, planteadas por Ganz *et al.* 2015 en función de análisis de expresión génica, y que coinciden con las divisiones anatómicas planteadas por Wulliman y Mueller en 2004.

Al analizar la caracterización anatómica del pallium de los peces teleósteos realizada por Mueller y Wullimann en 2009 y combinarla con los perfiles de expresión génica de telencéfalo realizados por Ganz *et al.*, 2014 (Figura 3) se ha encontrado alta correlación entre la definición de los límites anatómicos y la delimitación de regiones con determinados perfiles de expresión de diferentes marcadores de regiones telencefálicas conservados evolutivamente. Por otro lado, el empleo de paradigmas de aprendizaje, junto al uso de marcadores de actividad neuronal y lesiones en regiones específicas del telencéfalo, permitieron establecer la relación estructura-función de algunas regiones telencefálicas (Portavella *et al.*, 2004; von Trotha *et al.*, 2014). Tanto estos trabajos, como los perfiles de expresión de marcadores genéticos sugieren que la región dorso-lateral (DI) es homóloga al hipocampo de los mamíferos, mientras que la región dorso-medial (Dm) es homóloga a la amígdala basolateral de los mamíferos.

Regiones del pallium del telencéfalo de peces teleósteos

Como se mencionó anteriormente, en términos evolutivos, la región Dm se propone como homóloga a la amígdala basolateral presente en el cerebro de los mamíferos, y en diferentes especies de peces se ha podido establecer para esta

región, la relación estructura-función (Portavella *et al.*, 2004; von Trotha, Vernier and Bally-Cuif, 2014; Ganz *et al.*, 2015; Perathoner, Cordero-Maldonado y Crawford, 2016). A su vez, esta región es una de las que presenta mayor neurogénesis adulta en el telencéfalo de peces (Adolf *et al.*, 2006; Ganz y Brand, 2016). Por otro lado, al ser ésta una región dorsal y de fácil acceso resulta ideal para efectuar lesiones para el estudio de la regeneración neuronal en respuesta al daño.

Estudios realizados en pez dorado (Portavella *et al.*, 2004), pez cebra (Lal 2018) y trucha arcoiris (Ausas *et al.*, 2019), se han enfocado en establecer una relación estructura-función cognitiva en diferentes regiones del telencéfalo. En particular se destaca la participación de la región dorso-medial (Dm) del telencéfalo durante la adquisición de una tarea cognitiva de aprendizaje por evitación activa. Utilizando un protocolo de condicionamiento por evitación activa, se observó que la región Dm es necesaria para que se desarrolle un aprendizaje (Portavella y Vargas 2005; Portavella *et al.*, 2004; Aoki *et al.*, 2013; Lal *et al.*, 2018). En este condicionamiento, los peces asocian un estímulo condicionante (luz) con uno nocivo (shock), y para evitar este último tienen que aprender a cambiar de comportamiento al percibir el estímulo condicionante. Este ensayo ha sido empleado en diferentes especies de teleósteos: goldfish, zebrafish y trucha arcoiris. La remoción del telencéfalo Dm mediante cirugía impide el aprendizaje, tanto en condiciones donde los estímulos se solapan temporalmente, como cuando hay un retraso entre estímulos. Más recientemente, Lal y colaboradores (2018) han identificado una población de neuronas excitatorias presente en la

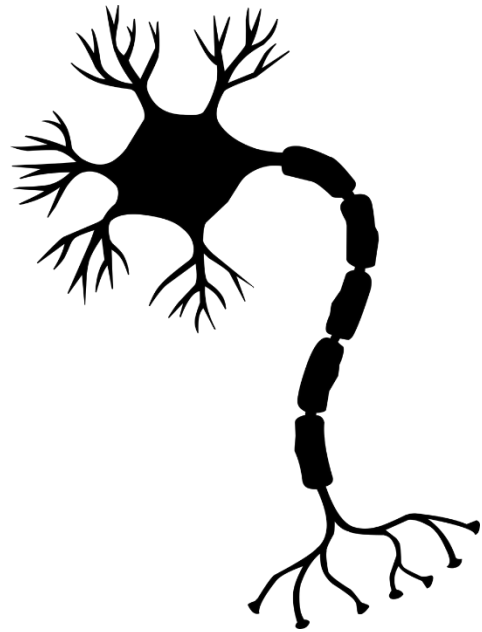
región Dm del pez cebra, la cual es indispensable para la adquisición de un aprendizaje por evitación activa.

Por otro lado, se observó que la integridad del telencéfalo, incluida la región DI, es requerida para un condicionamiento de evitación activa solo cuando existe un desfase temporal entre los estímulos condicionado y condicionante, de manera análoga a lo que ocurre con el hipocampo de mamíferos (Portavella, *et al.*, 2004). Empleando este mismo paradigma y registros in vivo de la dinámica de Calcio intracelular con microscopía de dos fotones en pez cebra, se describió que la región dorso-central (Dc) del telencéfalo es activada por un estímulo lumínico 24 hs después de concluido el aprendizaje. Indicando la participación de esta región en el proceso de memoria a largo plazo (Aoki *et al.*, 2013).

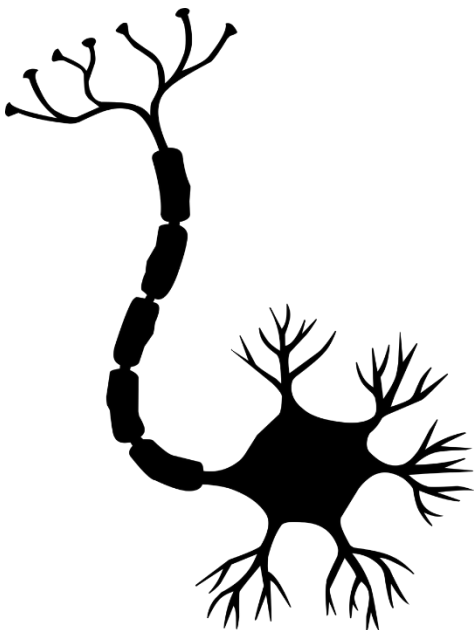
Varios circuitos neuronales implicados en diferentes funciones se encuentran evolutivamente conservados entre los distintos grupos de vertebrados, constituyéndose como homólogos evolutivos. Por ejemplo, en los mamíferos los sustratos neuronales implicados en funciones como la memoria y el aprendizaje emocional, son homólogos a los circuitos neuronales asociados a los mismos procesos cognitivos en los peces (Mueller y Wullimann 2009). Específicamente, la amígdala y el hipocampo juegan un importante rol en la adquisición y retención de comportamientos condicionados por evitación (Valzelli 1973; Davis 1992; Winocur 1997; Maren 2008; Cominski, *et al.*, 2014). En este sentido, estudios moleculares y comportamentales sugieren que la región dorsomedial del telencéfalo de los peces teleósteos y la región basolateral de la amígdala de los mamíferos son regiones homólogas (Mueller y Wullimann 2006; Portavella, *et al.*, 2004; von Trotha, *et al.*,

2014; Ganz, *et al.*, 2015). Otras homologías se observan entre la región dorsolateral del telencéfalo de los peces teleósteos y el hipocampo de los mamíferos (Portavella, y Vargas 2005; Durán, *et al.*, 2010; Ganz, *et al.*, 2015).

Por otro lado, el hipocampo de los mamíferos es un núcleo cerebral que resulta crítico para representar de manera correcta el espacio que nos rodea. Evidencias neuroanatómicas indican que la región dorso-lateral del telencéfalo de peces teleósteos y el hipocampo de mamíferos son homólogas evolutivas (Rodríguez *et al.* 2002). En la trucha de arroyo se describió que los individuos que constantemente navegan en busca de alimento poseen un telencéfalo de mayor tamaño que aquellos que simplemente permanecen en la costa a la espera del alimento, estableciendo una correlación entre el tamaño de este núcleo del SNC, la actividad locomotora y la función de navegación en un espacio tridimensional (Wilson y Godin 2010). Más aún, lesiones en el telencéfalo dorso-lateral del pez dorado producen una marcada incapacidad en la consolidación de memorias que requieren la formación y uso de un mapa espacial para elaborarlas (Rodríguez *et al.* 2002, Salas *et al.* 2006). No obstante, la misma lesión no ocasiona déficit en la resolución de una tarea comportamental basada en la guía por claves visuales. Estos estudios sugieren que el telencéfalo dorso-lateral de los peces, al igual que el hipocampo de los mamíferos, aves y reptiles, está implicado en la codificación neuronal del espacio que comprende el medio-ambiente circundante.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



PREMISAS E HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Tanto la amplia distribución de nichos neurogénicos existentes en el cerebro, como la capacidad de regenerar el tejido nervioso dañado, hacen de los peces teleósteos un modelo experimental ideal para estudiar la relevancia de la neurogénesis adulta en la remodelación circuital y su influencia en diferentes procesos cognitivos. En esta tesis, se utilizaron como modelo de estudio dos especies de peces teleósteos: *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y *Danio rerio* (pez cebra) para evaluar efectos socio-ambientales como moduladores de la neurogénesis adulta y la regeneración neuronal.

Fundamentos sobre los que se sustenta la hipótesis de este trabajo:

- 1) En el cerebro de vertebrados adultos existen células progenitoras capaces de dar origen a nuevas neuronas.
- 2) Los peces teleósteos poseen decenas de nichos neurogénicos dispersos a lo largo de su sistema nervioso central.
- 3) La zona peri-ventricular del telencéfalo de peces constituye un importante nicho neurogénico.
- 4) La región dorso medial (Dm) del telencéfalo interviene en los procesos de aprendizaje emocional y en la interacción con el entorno social y ambiental.
- 5) Los peces teleósteos son capaces de regenerar tejido neuronal en respuesta a un daño o noxa.
- 6) Comprender las bases celulares y circuitales de la regeneración neuronal en modelos experimentales resulta de gran interés para la medicina humana.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

“La neurogénesis adulta en el telencéfalo de los peces teleósteos es un proceso altamente influenciado por la actividad circuital y la estimulación de los circuitos neurales, y es la base mecánica de la regeneración neuronal disparada en respuesta a un daño.”

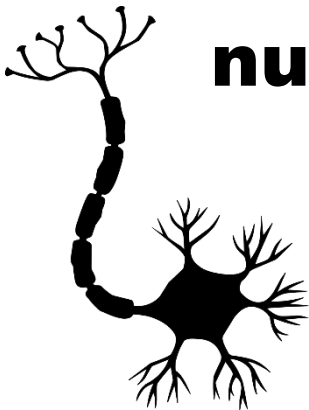
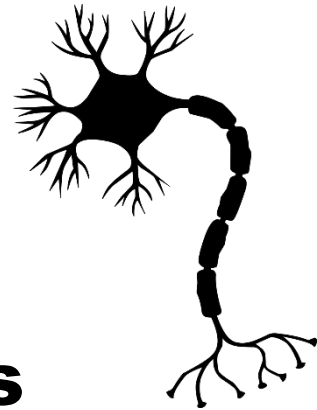
OBJETIVOS GENERALES:

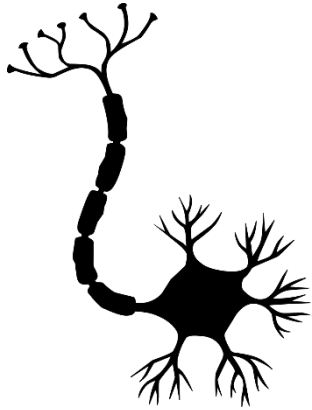
1. Estudiar la neurogénesis adulta en la región Dm del telencéfalo de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) mediante la asociación estructura función y evaluar la influencia del ambiente sobre la generación de nuevas neuronas.
2. Evaluar la capacidad de regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *Danio rerio* (pez cebra) bajo condiciones que se sabe actúan como moduladoras de la neurogénesis adulta.

CAPÍTULO 1

Neurogénesis adulta en el telencéfalo de *Oncorhynchus mykiss*:

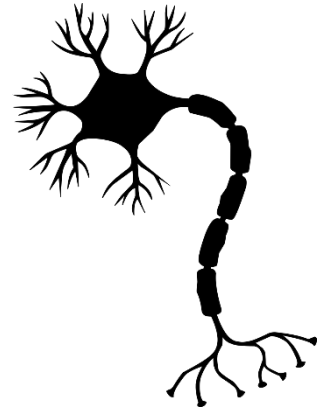
Influencia del aislamiento social en la formación de nuevas neuronas y en la función cognitiva





CAPÍTULO 1

Introducción



INTRODUCCIÓN

Neurongénesis adulta: el entorno como modulador

La neurogénesis adulta involucra diferentes etapas que permiten la regulación fisiológica del proceso en diferentes puntos temporales. Los mecanismos regulatorios involucran a la proliferación celular, diferenciación y migración celular, conexión con los circuitos preexistentes, supervivencia y apoptosis. En base a esto, se ha observado que la neurogénesis adulta puede verse modulada por diferentes situaciones que modifiquen tanto el medio externo como el interno.

El ambiente social influye significativamente en el balance neuroquímico y la conectividad cerebral, y en consecuencia el comportamiento de los individuos. Numerosos estudios han evaluado los efectos del aislamiento social en los peces, por ejemplo, en trucha arcoíris se ha observado una marcada disminución en la proliferación de progenitores neurales del telencéfalo luego de ser sometidas a condiciones de aislamiento social (Sørensen et al. 2012). Por otro lado, en peces ciclidos, se ha observado que el aislamiento social bloquea las capacidades cognitivas para aprendizaje espacial (Lombardi Brandao, et al., 2015), en el pez cebra altera la tigmotaxis, y los niveles cerebrales de serotonina (Shams, et al., 2015). En los peces eléctricos, el aislamiento social conlleva a una disminución en la incorporación de células a los ventrículos del diencéfalo (Dunlap et al., 2006). Vale la pena mencionar que, en experimentos realizados en ratones, también se han comprobado numerosos efectos deletéreos del aislamiento social. Ratones criados en aislamiento social muestran disminuciones en el número de sinapsis, deficiencias en la mielinización axonal, disminución de la neurogénesis adulta,

perturbación del balance neuroquímico, y deficiencias cognitivas (Wongwitdecha, y Marsden, 1996; Day-Wilson, *et al.*, 2006; Ibi, *et al.*, 2008). En conclusión, el aislamiento social afecta negativamente al sistema nervioso central.

Si bien existen numerosos estudios dónde se analiza el efecto de factores ambientales sobre la neurogénesis adulta en peces, en pocas ocasiones el enfoque de estos trabajos analiza el grado de funcionalidad de los circuitos luego de una modulación por factores ambientales. En este marco, no existe una visión integral sobre los efectos del ambiente en la funcionalidad de los circuitos cerebrales.

Aprendizaje en peces teleósteos

Contrariamente a lo que se pensaba se ha descubierto que los peces tienen sofisticadas capacidades cognitivas y de aprendizaje, siendo capaces de adquirir y modificar comportamientos por medio de la experiencia y la socialización (Brown y Laland 2003; Aoki *et al.*, 2013). También pueden desarrollar aprendizajes de tipo espacial, reconocer estímulos, discriminar entre patrones visuales y consolidar memorias de largo plazo (Brown *et al.*, 2017; Lal *et al.*, 2018). Por ejemplo, los peces cíclidos son capaces de formar alianzas y cooperar para la búsqueda de alimento (Hotta *et al.*, 2020). Uno de los procesos cognitivos más estudiados en los peces es el aprendizaje por evitación activa, que consiste en aprender a evitar estímulos aversivos mediante la ejecución de respuestas específicas. Por ejemplo, Ferrari *et al.* (2010) llevaron a cabo experimentos con peces de arrecife que mostraron una rápida adquisición y retención del aprendizaje por evitación activa utilizando como estímulo condicionante la presencia de depredadores. Además,

otros investigadores han encontrado evidencia de que los peces pueden discriminar y aprender a evitar señales asociadas con la presencia de parásitos o enfermedades (Leduc *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2019).

Numerosos estudios han comprobado, la capacidad de los peces teleósteos de completar aprendizajes asociativos utilizando distintos paradigmas comportamentales como: evitación activa, evitación inhibitoria y hasta aprendizaje espacial (Portavella *et al.*, 2004; Dunlap *et al.*, 2006; Manuel *et al.*, 2014; Glover *et al.*, 2017).

Específicamente se ha podido establecer una relación entre el telencéfalo dorso-medial (Dm) y el aprendizaje asociativo dependiente del contexto emocional (Portavella *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2013). En base a estos estudios, para el desarrollo de esta tesis se eligió un paradigma de evitación activa (EA). En un paradigma de aprendizaje por EA se procura que el individuo asocie un estímulo inocuo (estímulo condicionante) con un estímulo aversivo (estímulo incondicionante), de modo que el individuo logre anticipar la llegada de una “situación de peligro” ante la sola presentación del estímulo inocuo. Este paradigma comprende un aprendizaje de tipo emocional, y conceptualmente hablando puede considerarse como un “reflejo pavloviano”.

Interesantemente, se ha encontrado que la trucha arcoíris desarrolla un buen proceso de aprendizaje en ensayos de condicionamiento aversivo (Carpenter *et al.*, 2009). Considerando la capacidad neurogénica de los peces y las habilidades

cognitivas reportadas en trucha arcoíris sería interesante evaluar simultáneamente ambos procesos y su interrelación.

***Oncorhynchus mykiss* como modelo de estudio**

En este trabajo, decidimos trabajar con trucha arcoíris porque se cuenta con información sobre la ubicación de las zonas proliferativas y los límites entre las diferentes subdivisiones del telencéfalo de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) (Figura 4; Mazzitelli Fuentes 2016).

En el telencéfalo de *O. mykiss*, las zonas proliferativas se ubican en la región ventricular y subventricular del telencéfalo, específicamente en la zona periventricular y en la zona subependimaria (Mazzitelli Fuentes 2016; Figura 4)

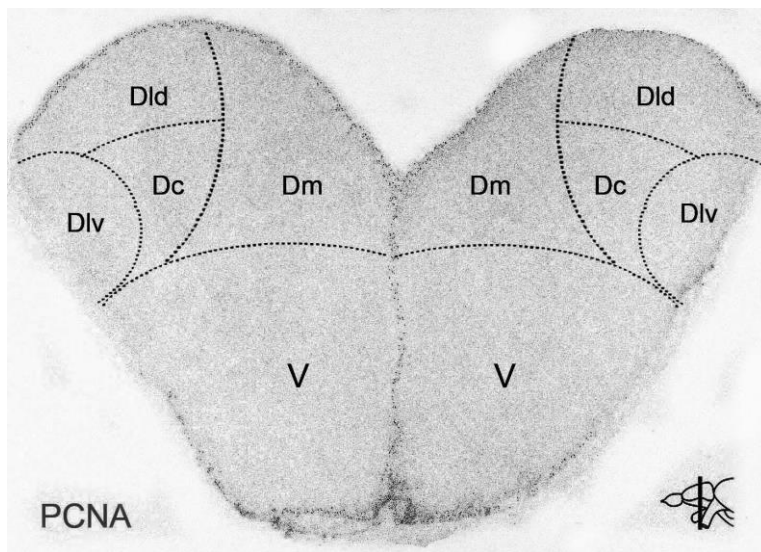


Figura 4. Telencéfalo de *Oncorhynchus mykiss* (Mazzitelli Fuentes, tesina de licenciatura) Inmunofluorescencia para PCNA (antígeno que detecta la proliferación celular). En ambos hemisferios se observan en línea punteada las subdivisiones del pallium. Obsérvese que la marca de PCNA (puntos negros) se distribuye a lo largo de la zona periventricular del telencéfalo. En el extremo superior derecho se visualiza donde se ha realizado el corte transversal en vista lateral del cerebro. D: región dorsal o pallium; V: región ventral o subpallium. Dm: región dorso-medial; Dc: región dorsocentral; Dld: región dorso-lateral dorsal; Div: región dorso-lateral ventral; Vd: región dorso-ventral; Vv: región ventro-ventral.

Neuroanatomía del telencéfalo de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris)

Estudios realizados con el trazador Dil, utilizado para revelar la conectividad entre diferentes regiones cerebrales, revelaron que el telencéfalo dorso-lateral recibe numerosos aferentes de diversas zonas del SNC, entre ellas: el telencéfalo contra lateral, el núcleo pre óptico, el núcleo supraquiasmático, el tálamo medial, el

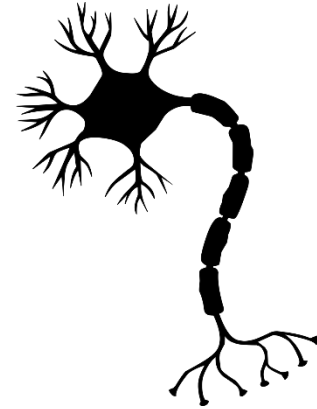
complejo pre glomerular, el núcleo tuberal, el lóbulo hipotalámico posterior, el rafe y de la formación reticular romboencefálica (Folgueira et al. 2004). Así mismo, el telencéfalo dorso-lateral envía proyecciones hacia la región central del telencéfalo, hacia el tálamo medial y hacia regiones hipotalámicas (Folgueira et al. 2004). Interesantemente, en las regiones central y lateral del telencéfalo se describió la presencia de neuronas de tipo piramidal, las cuales presentan procesos dendríticos bien desarrollados con presencia de espinas sinápticas características de contactos sinápticos glutamatérgicos (Pushchina et al. 2003).

En cuanto a los límites entre las diferentes subdivisiones del telencéfalo, en *O. mykiss* Butler y Hodos (1996) han propuesto una subdivisión basada en estudios de conectividad y activación neuronal de regiones específicas. En este marco, pueden delimitarse en el telencéfalo de *O. mykiss* seis regiones principales: el área olfatoria, el área dorsal, el área dorsolateral, el área ventrolateral, el área ventral y el área preóptica. Estas regiones se distinguen por su anatomía y citoarquitectura, así como por sus patrones de conectividad y función (Butler y Hodos, 2005).

Considerando a los peces teleósteos, la trucha arcoíris, es una especie de la que se dispone de una buena descripción biológica, anatómica y neuroanatomica, además es un modelo biológico ampliamente utilizado dentro de los peces teleósteos para estudios fisiológicos. Suele ser empleada como modelo fisiológico debido a su tamaño relativamente grande comparado con otras especies de peces, haciéndola ideal para abordar estudios fisiológicos que requieren ciertas

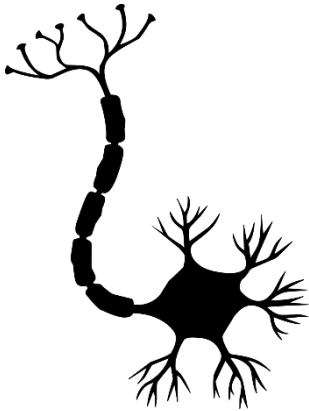
cantidades de tejidos o células específicas. Más aún, la facilidad para su criado y mantenimiento y su significancia en la acuicultura han llevado al desarrollo de líneas clonales y la aplicación de transgénesis (Yoshizaki *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2002) además, el extensivo secuenciado del transcriptoma (196.518 entradas en GeneBank) ha llevado al desarrollo de mapas genéticos relativamente detallados. No obstante, la trucha arcoiris constituye un modelo de estudio novedoso en el ámbito de la neurociencia, del que se cuenta con pocos estudios realizados y se encuentra escasamente caracterizado neurofisiológicamente.

En este capítulo se evaluó la capacidad de aprendizaje de la trucha arcoiris en un paradigma de evitación activa, y se identificó la región Dm como uno de los núcleos cerebrales que intervienen en este tipo de aprendizaje. Una vez determinada la región cerebral implicada en el aprendizaje emocional, se evaluó la susceptibilidad de la neurogénesis adulta a ser modulada por el aislamiento social y a su vez los efectos de esta modulación en un proceso neuronal complejo como el aprendizaje.



CAPÍTULO 1

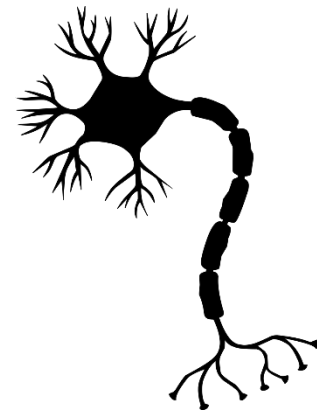
Objetivos específicos



OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

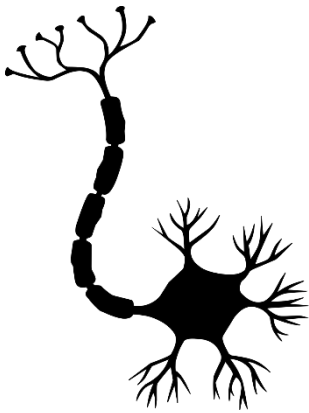
1.a) Asociación circuito-función: Evaluar la capacidad de aprendizaje de *O. mykiss* y correlacionar el aprendizaje con la actividad neuronal en la región dorso-medial (Dm) del telencéfalo.

1.b) Modulación de la neurogénesis adulta: Evaluar los efectos del aislamiento social en la neurogénesis adulta y en el aprendizaje de *O. mykiss*.



CAPÍTULO 1

Materiales y métodos



MATERIALES Y METODOS:

1. 1 Metodología general para el trabajo con *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris)

1.1.a) Modelo experimental: *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoíris):

Se utilizaron ejemplares de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) adultos, criados en el Centro de Salmonicultura Bariloche, de la Universidad Nacional del Comahue, Rio Negro, Argentina. Los experimentos fueron realizados con ejemplares adultos de una edad aproximada de 1 año y medio (228 ± 22 gr). Las truchas fueron criadas con agua proveniente del Arroyo Gutiérrez, que provee un suministro constante de agua limpia y oxigenada a los tanques de cría en la salmonicultura. En este marco, los individuos experimentales fueron mantenidos bajo un fotoperiodo natural y alimentados diariamente y en una proporción de 1% de peso de alimento respecto al peso corporal. Los experimentos se realizaron entre los meses de octubre y abril, y la temperatura del agua varió entre 10°C y los 15 °C.

1.1.b) Protocolo de sacrificio, fijación y preparación del tejido para inmunohistoquímica:

Para sacrificar a los individuos experimentales, los peces fueron transferidos individualmente a un tanque donde fueron anestesiados profundamente con benzocaína (100 mg/l). Para realizar una buena limpieza del sistema circulatorio y eliminar la mayor cantidad de células sanguíneas de los vasos sanguíneos y los capilares, se realizó una perfusión intracardiaca con 50 mL de buffer fosfato (PBS) 10 mM a 4 °C. Posteriormente, para mantener la integridad del tejido cerebral,

evitar su degradación y endurecerlo para facilitar el corte del mismo, los peces fueron perfundidos intracardiácamamente con 50 mL de paraformaldehído (PFA 4%) preparado en PBS 10 mM. El PFA al 4% reacciona y forma enlaces cruzados con las proteínas del tejido, permitiendo mantener la integridad de diferentes biomoléculas de interés. Finalizada la perfusión se extrajo el cerebro completo de cada ejemplar y se lo sumergió en 50 mL de PFA 4% a 4°C durante 24 horas.

Posteriormente, el tejido fue deshidratado en series crecientes de solución de sacarosa (15% y 30% m/v respectivamente). La deshidratación del tejido constituye un paso fundamental al trabajar con tejido criopreservado, debido a que la existencia de moléculas de agua al momento de la congelación genera cristales de hielo que afectan la integridad de los tejidos biológicos. Para su posterior congelado y criopreservación a -20°C los cerebros fueron embebidos en un medio de montaje específico para criopreservación de tejido (OCT). Finalmente, se cortaron secciones de telencéfalo de entre 10 y 40 μm en un criostato (Microm, HM 550), las secciones fueron montadas en portaobjetos cargados positivamente, y conservadas en un freezer a -20°C para ser utilizadas en protocolos de inmunofluorescencia.

1.1.c) Protocolo general de inmunofluorescencias

Las inmunofluorescencias fueron realizadas sobre secciones transversales seriadas a lo largo del eje antero-posterior de todo el telencéfalo. Todas las inmunofluorescencias se realizaron siguiendo el mismo protocolo general, no

obstante, en función del anticuerpo primario utilizado fue necesario realizar algunas modificaciones al protocolo, las cuales serán especificadas en cada caso.

Protocolo general de inmunofluorescencia:

1. 3 lavados de 5 minutos en TBS 1x (pH= 7,4) con agitación a temperatura ambiente (Ta).
2. Incubación de 15 minutos con NaBH₄ 0,05% m/v preparado en TBS a 4°C.
3. 3 lavados de 5 minutos con TBS 1x con 0,3 % de tritón (pH= 7,4) en agitación a Ta.
4. Incubación de 60 minutos con solución de bloqueo (6% de suero de albúmina bovina + 6% de suero de cabra preparado en TBS 1x - Tritón 0,3%) en agitación a Ta.
5. Incubación ON (“over night”; toda la noche) con anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo a 4°C.
6. 4 lavados de 5 minutos con TBS 1x con 0,3 % de tritón (pH= 7,4) en agitación a Ta.
7. Incubación de 120 minutos con anticuerpo secundario preparado en solución de bloqueo, con agitación a Ta.
8. 4-6 lavados de 5 minutos con TBS 1x con 0,3 % de tritón (pH= 7,4) en agitación a Ta.
9. Incubación de 10 minutos con DAPI (4',6- Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate), Sigma Aldrich o 20 minutos con Neurotrace (Molecular probes, Invitrogen).
10. 3 lavados de 10 minutos con TBS 1x (pH= 7,4) en agitación a Ta.

11. Secado de portaobjetos.
12. Montado de tejido con DABCO-glicerol.
13. Secado de portaobjetos durante una noche.
14. Almacenamiento de portaobjetos a -20°C para mantener la estabilidad de los fluoroforos.

A continuación, se describen los anticuerpos primarios utilizados y las modificaciones al protocolo general de inmunofluorescencia:

Anti-PCNA dilución 1:600 (PC10, Dako. Anticuerpo monoclonal elaborado en células de ratón contra una proteína PCNA recombinante de origen humano). PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) es una proteína nuclear que interviene en la replicación del ADN y se sintetiza en las fases G1 y S del ciclo celular. Al ser una proteína nuclear, fue necesario incorporar a la inmunofluorescencia, un paso de recuperación de antígeno para exponer los epítopes (en este caso las proteínas). La recuperación de antígeno se realizó antes de la incubación en solución de bloqueo e implicó:

- 1) Incubación de 60 minutos en citrato de sodio 10 mM a 60°C .
- 2) 6 lavados de 5 minutos con TBS 1x con 0,3 % de tritón en agitación a T_a .

Anti c-Fos dilución 1:1000 (sc-253, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anticuerpo policlonal elaborado en conejo, contra un péptido de c-Fos humano).

c-Fos es un proto-oncogen que se expresa en neuronas en respuesta a estimulación directa, el producto de la expresión de este gen, la proteína c-Fos (Sagar *et al.*, 1988), es indicadora de la actividad neuronal. Para la inmunofluorescencia con este anticuerpo, tanto las soluciones para los lavados de TBS como la solución de bloqueo, fueron soluciones sin tritón.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios:

- anti-rata acoplado a Cy3, dilución 1:500 (Jackson Immuno Research Labs, Inc. Elaborado en cabra).
- anti-ratón acoplado a Cy3, dilución 1:500 (Jackson Immuno Research Labs, Inc. Elaborado en cabra).
- anti-conejo acoplado a Cy3, dilución 1:500 (Jackson Immuno Research Labs, Inc. Elaborado en cabra).
- anti-conejo acoplado a Cy2, dilución 1:2000 (Jackson Immuno Research Labs, Inc. Elaborado en cabra).

Se realizaron inmunofluorescencia de 5 secciones telencefálicas por pez, de 40 um separadas por 200 um. Para discriminar anatómicamente las regiones telencefálicas se utilizó como referencia el trabajo de Folgueira *et al.*, 2004.

1.2) Asociación circuito-función

1.2.a) Aprendizaje por evitación activa (EA) en *Oncorhynchus mykiss*

Se desarrolló un protocolo de aprendizaje por evitación activa (EA) optimizado para su utilización en trucha arcoíris, adaptando los protocolos descritos para realizar este tipo de condicionamiento en pez cebra (Aoki *et al.*, 2013), y pez dorado (Dunlap *et al.*, 2006). El dispositivo experimental para el aprendizaje de EA (Figura 1.5), consistió en una pecera de 90 x 45 x 45 cm (largo, ancho, alto) dividida en dos compartimentos iguales conectados mediante una abertura que permitía al pez moverse entre compartimentos. Cada compartimento contaba con luces LED posicionadas en los extremos, y electrodos de acero inoxidable en las paredes laterales. Durante los tres días previos al inicio del protocolo de aprendizaje, se llevó a cabo una habituación en la que los peces fueron trasladados a la pecera experimental durante 20 minutos por día. Del mismo modo, y para amortiguar el estrés del traslado desde sus tanques habituales, se trasladó al tanque experimental a los individuos 15 minutos antes del inicio de cada sesión de aprendizaje.

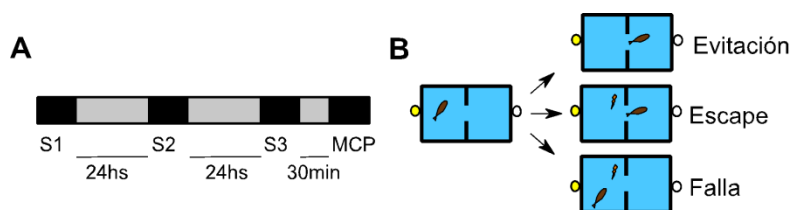


Figura 1.5. Aprendizaje por evitación activa (EA) en la trucha arcoíris.

Panel A: Esquema temporal del protocolo de aprendizaje. Cada pez fue entrenado una vez por día durante 3 días. Cada sesión de aprendizaje implicó un máximo de 60 ensayos, separados entre sí por un intervalo de 30 segundos. La memoria de corto plazo (MCP) se evaluó 30 minutos luego de la última sesión de aprendizaje. **Panel B:** Esquema del protocolo de evitación activa utilizado. En el compartimento donde se encontraba el pez, se presentaba una luz led de color blanco como estímulo durante un máximo de 15 segundos. Existieron 3 respuestas posibles, Evitación: Si el pez cambiaba de compartimento antes de los primeros 15 segundos del ensayo (sin presencia de shock eléctrico). Escape: Si el pez cambiaba de compartimento de los 15 a los 30 segundos del ensayo (con presencia de shock eléctrico). Falla: Si el pez permanecía en el comportamiento los 30 segundos de cada ensayo.

El paradigma de EA es un tipo de condicionamiento en el que se involucran asociaciones emocionales y temporales para relacionar una señal condicionada (un estímulo neutro) con un estímulo incondicionado (una señal aversiva) subsecuente y superpuesto (al estímulo condicionado). En este marco, el pez debe aprender a evitar el lado del tanque experimental donde se presenta un estímulo aversivo, nadando hacia el lado seguro del tanque. En el protocolo desarrollado para trucha arcoíris, el pez debía asociar un estímulo neutro (estímulo condicionado; una luz LED) con un estímulo aversivo (estímulo incondicionado; descarga eléctrica en pulsos de 3,5 mV a 1Hz) que se superponían. El protocolo de aprendizaje consistió en realizar 1 sesión de aprendizaje diaria durante 3 días consecutivos (S1, S2 y S3). Cada sesión de aprendizaje consistió en un máximo de 60 ensayos. Se consideraron 3 respuestas posibles en cada ensayo:

- Evitación: Si el pez cambiaba al compartimento seguro (compartimento con luz LED apagada) dentro de los 15 segundos posteriores a la presentación del estímulo neutro.
- Escape: Si el pez cambiaba al compartimento seguro luego de la superposición de estímulos neutro y aversivo (en los 15 segundos posteriores a la presentación del estímulo aversivo).
- Falla: Si el pez no cambiaba de compartimento luego de la superposición de los estímulos neutro y aversivo.

En el caso de las evitaciones, cuando el pez nadaba hacia el compartimento seguro, la luz se apagaba inmediatamente, mientras que, en los escapes, la luz + el shock eléctrico culminaban simultáneamente. En este esquema, cada ensayo tuvo una duración máxima de 30 segundos, y el intervalo temporal entre ensayos

fue de 30 segundos. Cada sesión de aprendizaje finalizaba a los 60 ensayos, o si luego de 10 ensayos sucesivos, el pez ejecutaba 8 evitaciones (criterio de 80%).

En este marco, fueron definidos como buenos aprendedores (BA) a los peces que en la S3 y en menos de 30 ensayos llegaban a un 80% de evitaciones. Adicionalmente, se analizaron para cada sesión de aprendizaje, los siguientes parámetros:

- Número de ensayos necesarios para llegar al criterio de 80%.
- Latencia (Tiempo que demoraron los peces en cambiar de compartimento)
- Número de veces que los peces no se cambiaron de compartimento.

La memoria de corto plazo (MCP) de los individuos fue evaluada 30 minutos luego de concluida la S3, y la memoria de largo plazo (MLP) luego de 24 hs de haber finalizado la S3. La MCP y MLP se evaluaron en un test que consistió de 30 ensayos en los que no fue presentado el estímulo aversivo y que se llevó a cabo en el mismo tanque experimental en el que se desarrollaron las sesiones de aprendizaje. Los peces fueron sacrificados 90 minutos luego del test de MCP o MLP siguiendo la metodología indicada en inciso *1.1.b* de esta sección.

Como control de aprendizaje, se llevó a cabo el protocolo de EA con un grupo de peces a los que no se les presentó el estímulo aversivo (grupo control -C-).

1.3) Modulación de la neurogénesis adulta

1.3.a) Aislamiento social

En primera instancia, para evaluar los efectos del aislamiento social sobre la proliferación celular y la generación de nuevas neuronas en el telencéfalo se realizaron los ensayos experimentales que se describen a continuación:

Ensayo I: Efecto del aislamiento social en la tasa de proliferación

Durante 72 horas se separó a los individuos en dos grupos experimentales, aislamiento social (n=6) y grupo control (n=6). Los acuarios de aislamiento social (AS) eran individuales de 0,48m x 0,3m x 0,11m y los acuarios de condiciones control (C), eran circulares de 1,14m diámetro x 0,5m de altura. Posteriormente los individuos fueron sacrificados y se analizó la proliferación en el telencéfalo mediante inmunofluorescencias para detectar la presencia del marcador PCNA.

Ensayo II: Efecto del aislamiento social en la formación de nuevas neuronas

Para evaluar si el ambiente en el que se encuentran los individuos influye en la generación de nuevas células y neuronas, se realizó otro conjunto de experimentos en los que, durante 4 semanas, los peces fueron mantenidos en 2 condiciones, aislamiento social (en jaulas de malla plástica de 0,36m x 0,26m x 0,18m) o condiciones control (en tanques 5,75m x 1,65m x 0,63m). Antes de ser dispuestas en cada condición experimental, los peces fueron anestesiados con una dosis baja de benzocaína (25 mg/l), y posteriormente inyectados intraperitonealmente con BrdU (50 µg BrdU 20mg/ml por gramo de pez). Luego de 4 semanas fueron sacrificados y se evaluó mediante inmunofluorescencias la marcación con BrdU y su co-localización con un marcador neuronal (NeuN).

Luego de comprobar la influencia del ambiente sobre la proliferación celular y la neurogénesis adulta se realizaron los siguientes experimentos: Los individuos experimentales de trucha arcoíris, fueron mantenidos en agua de arroyo con aireación constante y divididos en dos grupos experimentales, utilizando la

metodología planteada por la Lic. Mazzitelli Fuentes en su tesis de licenciatura. Este protocolo implicó separar, durante 4 semanas, a los peces en un grupo control (C) y en un grupo aislado (A). En el grupo control los individuos fueron mantenidos en tanques de 150x150x60 cm (ancho x largo x alto) en grupos de 10 donde podían nadar libremente (Figura 1.6). Adicionalmente, al grupo C se le proveyeron refugios artificiales. Los individuos del grupo A fueron mantenidos en jaulas de red individuales de 36x26x18 cm (ancho x largo x alto) en las que los peces solo podían voltearse y cambiar la dirección de nado. Los peces fueron mantenidos en las condiciones C y A durante 4 semanas, y luego fueron agrupados en un tanque común durante 1 semana.

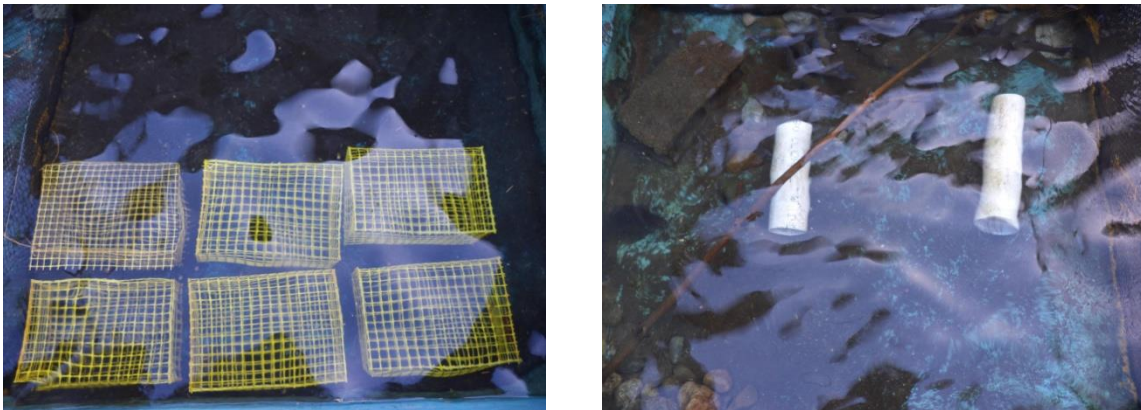


Figura 1.6: Tanques experimentales de aislamiento social en trucha arcoíris. Tanques experimentales donde se mantuvo a los individuos en aislamiento social y condiciones control. **Panel A:** Aislamiento social tanques con jaulas de red individuales de 36x26x18 cm (ancho x largo x alto) en las que los peces solo podían voltearse y cambiar la dirección de nado. **Panel B:** Condiciones control en tanques de 150x150x60 cm (ancho x largo x alto) en grupos de 10 donde podían nadar libremente, adicionalmente se proveyeron refugios artificiales. Luego de 4 semanas, los peces fueron agrupados en un tanque sin modificaciones durante 7 días.

1.3.b) Test del “Novel Tank”

Luego de que los peces compartan tanque durante 1 semana, fue evaluada la capacidad de nado individual en el test del “Novel Tank”. El test del Novel Tank ha sido utilizado en el pez cebra y la trucha arcoíris para evaluar comportamientos

relacionados a la ansiedad (Cachat *et al.*, 2012; Colson *et al.*, 2015), en este caso, fue utilizado para evaluar el grado de estrés de los peces que permanecieron en aislamiento social. El test consistió en transferir a los peces individualmente, a un tanque desconocido para ellos hasta ese momento, de 80x40x30 cm (ancho x largo x alto) y ubicado de tal forma que no pudieran ver los movimientos de alrededor y se los filmó durante 20 minutos con una cámara web. La movilidad de los peces se evaluó ubicando una línea de referencia a 13,3 cm de la base del tanque y registrando la cantidad de veces que los peces atravesaron esa línea durante los 20 minutos que duró la prueba. Los videos obtenidos fueron analizados con los softwares IdTracker y Matlab R2017. Entre otros parámetros se analizaron la cantidad de veces que los individuos cruzaron la línea de referencia establecida, el tiempo que demoró en cruzar la línea de referencia establecida, el intervalo temporal entre cruces, la distancia nadada.

Finalmente, luego del test del “Novel Tank”, los individuos fueron entrenados con el protocolo de aprendizaje por EA, y 90 minutos después de finalizar la prueba de MLP fueron sacrificados.

CAPÍTULO 1

Resultados



RESULTADOS

1.1) **Asociación circuito-función**

1.1.a) Aprendizaje por evitación activa (EA) en *Oncorhynchus mykiss*

Para evaluar la capacidad cognitiva de la trucha arco iris, los individuos fueron entrenados en un paradigma de evitación activa (EA). En este experimento se pretendía que el pez evitara permanecer en el lado aversivo de un tanque experimental de dos compartimentos, enseñándole a nadar hacia el lado seguro del tanque. Los individuos experimentales debían aprender a anticipar la presentación de un estímulo aversivo (descarga eléctrica) ante la sola presentación de un estímulo neutro (una luz) y así escapar antes de recibir el estímulo aversivo. Se realizó 1 sesión de aprendizaje diaria por 3 días (S1, S2 y S3). Se compararon a lo largo de las sesiones de aprendizaje, la cantidad de respuestas evitatorias (cambio al compartimento seguro antes de la presentación del estímulo neutro), cantidad de escapes (cambio del pez al compartimento seguro durante la superposición de estímulos neutro y aversivo) y la cantidad de fallas (cuando ante la presentación de los estímulos neutro y aversivo el pez no se cambiaba de compartimento). En este marco, se definió como buenos aprendedores (BA) a los peces que en la S3 y en menos de 30 ensayos llegaban a un 80% de evitaciones (criterio de aprendizaje). El rendimiento de los individuos en el protocolo se evaluó contabilizando y comparando para cada sesión de aprendizaje, los siguientes parámetros: número de ensayos necesarios para llegar al criterio de 80%, latencia (tiempo que demoraron los peces en cambiar de compartimento), y errores (número de veces que los peces no se cambiaron de

compartimento). Luego del aprendizaje, evaluamos memoria de corto plazo (MCP; evaluada 30 minutos luego de finalizado el protocolo de aprendizaje) y memoria de largo plazo (MLP; memoria evaluada luego de 24 hs de finalizado el protocolo de aprendizaje). Ambas pruebas de memoria se llevaron a cabo en el mismo tanque experimental en el que se desarrollaron las sesiones de aprendizaje. Estas pruebas consistieron en presentar solo el estímulo neutro (solo luz, sin descarga eléctrica) y registrar la respuesta del pez (evitación, escape o falla). En la sección “Materiales y métodos” apartado 1.2.a) se encuentra una descripción detallada del paradigma de aprendizaje. Como condición control (C), las truchas fueron entrenadas en el protocolo de EA, omitiendo el estímulo aversivo. En base a la performance alcanzada en la 3ra sesión, (ver materiales y métodos) los peces fueron clasificados en buenos aprendedores o malos aprendedores. El 50% de los individuos que se entrenaron con el paradigma de evitación activa (EA) pudieron ser definidos como buenos aprendedores (BA) y el 50% fueron considerados malos aprendedores (MA) (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2, 12)} = 12,22$; $p=0,0013$; $n=5$ para cada grupo). Por otro lado, los individuos del grupo control (C) no fueron capaces de mejorar su rendimiento a lo largo de las sesiones de aprendizaje y fallaron en el test de memoria de corto plazo (MCP). (Figura 1.7).

En el test de MCP, el grupo de los BA mostró una buena retención de la tarea aprendida, obteniendo un promedio de $89,33 \pm 3,17$ % de respuestas de evitación, mientras que el grupo C y el grupo MA tuvieron un promedio de menos del 36% de

respuestas evitatorias (ANOVA $F_{2; 12} = 18,85$; $p < 0,05$; $n=5$ para cada grupo; Figura 1.7).

Considerando los otros parámetros de aprendizaje (número de ensayos hasta llegar a criterio, latencia de escape hacia el compartimento seguro y número de fallas a lo largo de las 3 sesiones de aprendizaje), el grupo BA también tuvo un desempeño significativamente mejor que el de los grupos MA y C. (Figura 1.7).

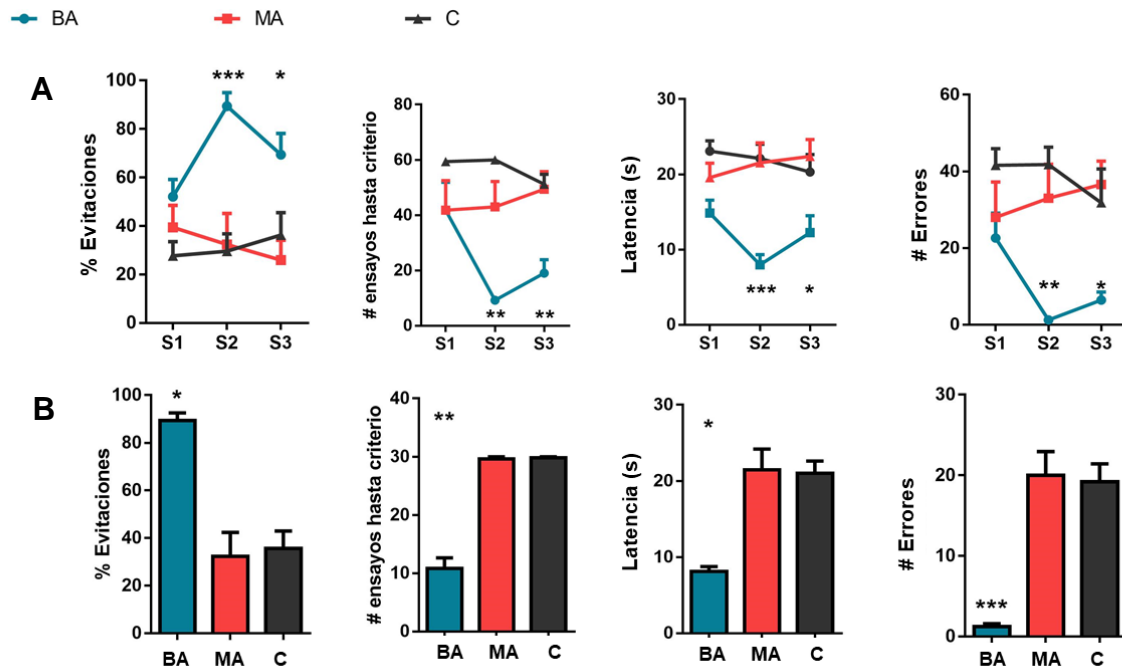


Figura 1.7: Parámetros utilizados para evaluar el aprendizaje por evitación activa en *O. mykiss*.

Panel A: Se muestran diferentes parámetros de aprendizaje para truchas BA, MA y C. Porcentaje de respuestas de evitación a lo largo de las sesiones de aprendizaje. C: grupo control; BA: buen aprendizador; MA: mal aprendizador (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efectos de grupo $F_{(2, 12)}=12,22$, $p=0,0013$, Test de Holm Sidak para comparaciones múltiples*** $p < 0,001$ para BA vs. C y para BA vs. MA; * $p < 0,05$ para BA vs. MA). Número de ensayos hasta llegar a criterio (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2, 12)} = 9,479$, $p = 0,00034$. Test de comparaciones múltiples de Tuckey, ** denota $p < 0,01$ para BA vs. C y para BA vs. MA. Latencia media a través de las sesiones: ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2, 12)}=12,12$, $p=0,0013$. Test de comparaciones múltiples de Tuckey, * denota $p < 0,005$ para BA vs. C, *** denota $p < 0,0001$ para BA vs. MA. Número de errores: ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2;12)} = 8$, $p = 0,0062$. Test de comparaciones múltiples de Tuckey, * denota $p < 0,001$ para BA vs. C y para BA vs. BL). **Panel B:** Test de MCP realizado 30 minutos después de la última sesión de aprendizaje. Porcentaje de respuestas de evitación en el test de MCP (ANOVA de una vía, efecto de grupo $F_{(2; 12)} = 18,85$, $p = 0,0002$; Test de Holm Sidak para comparaciones múltiples * denota $p < 0,001$ para BA vs. C y para BA vs. MA). Número de ensayos hasta llegar a criterio: Diferencias entre grupos indicadas por el Test de Kruskal Wallis con $p = 0,001$. Test de comparaciones múltiples de Dunn, ** $p < 0,05$ para BA vs. C y para BA vs. MA. Latencia media a lo largo de las sesiones: Diferencias entre grupos indicadas por el Test de Kruskal Wallis con $p = 0,0019$. Test de comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0,05$ para BA vs. C. Número de errores: Diferencias entre grupos indicadas por el Test de Kruskal Wallis con $p = 0,0019$. Test de comparaciones múltiples de Dunn, ** $p < 0,05$ para BA vs. C y para BA vs. MA ($n = 5$) para cada grupo.

Para establecer el grado de intervención de los circuitos neuronales que conforman la región Dm en el aprendizaje por EA en la trucha arcoíris, se evaluó la expresión del marcador de actividad neuronal mediante detección de c-Fos por inmunofluorescencia 90 minutos luego del test de MCP. Los individuos del grupo de los BA mostraron una expresión de c-Fos ($78,49 \pm 4,6$) significativamente mayor a la encontrada en los individuos de los grupos de MA ($52,86 \pm 5,88$) y C ($43,72 \pm 4,2$) (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2; 12)} = 72,89$ con $p < 0,0001$, efecto de la región $F_{(1, 12)} = 148,7$ con $p < 0,0001$. Prueba de Holm Sidak para comparaciones múltiples, *** denota $p < 0,005$ para BA vs. C.) (Figura 1.8 y 1.9). En la región Dm la expresión de c-Fos, se correlacionó positivamente con todos los parámetros de aprendizaje evaluados en el test de MCP (Correlación de Pearson, % evitaciones: $R^2 = 0,7$; número de ensayos hasta alcanzar el criterio: $R^2 = 0,84$; latencia: $R^2 = 0,62$; para todas las correlaciones $p < 0,01$ y $n=10$), lo cual sugiere que esta región telencefálica participa en el procesamiento de información durante esta tarea cognitiva. Al considerar la región Dorso lateral del telencéfalo (DI), no se encontró correlación entre la expresión de c-Fos y los parámetros de aprendizaje (Figura 1.8). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de c-Fos en la región Dm a lo largo del eje rostro-caudal (Figura 1.8, en la siguiente página).

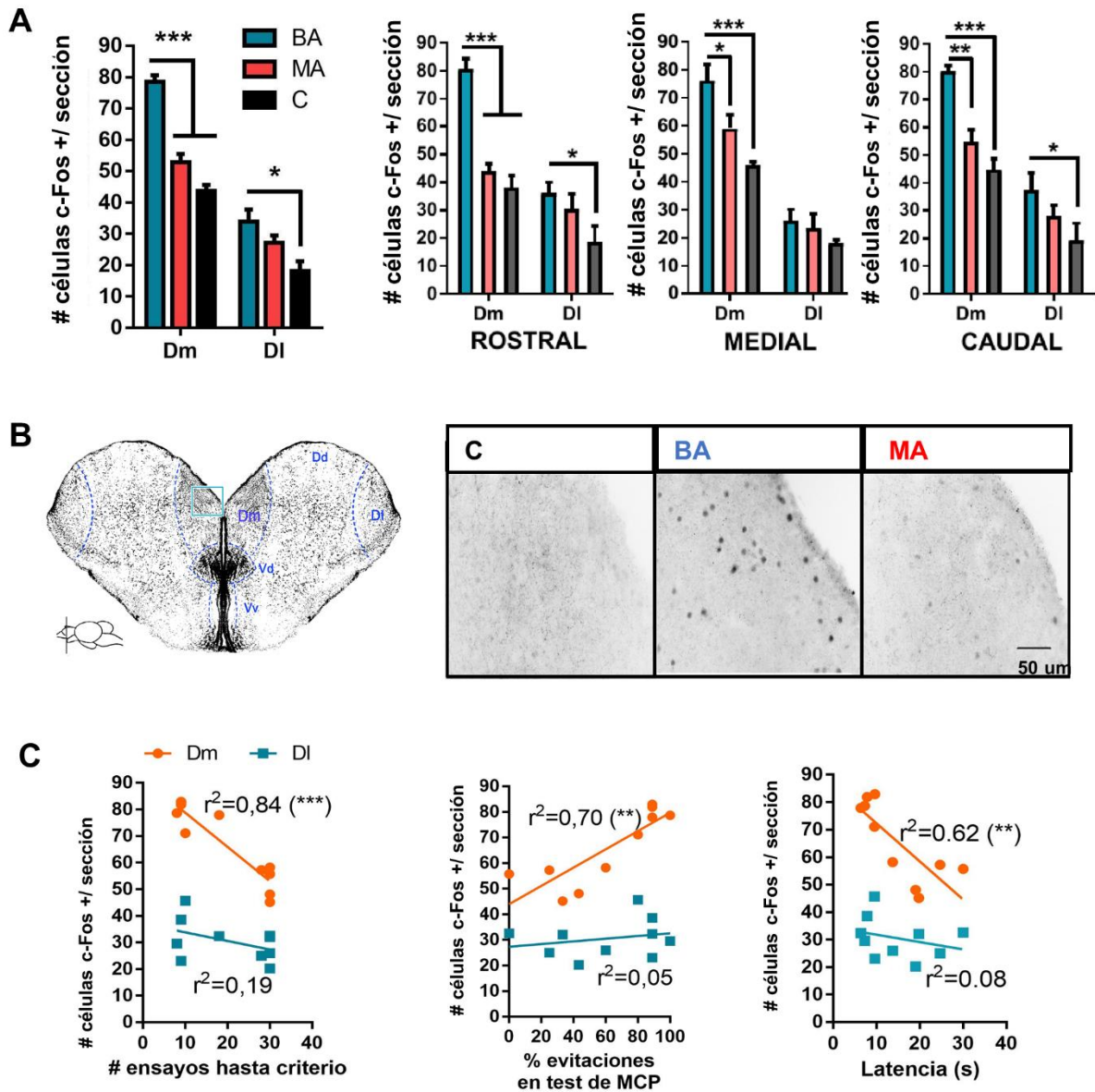


Figura 1.8. Expresión de c-Fos asociada al aprendizaje en el telencéfalo de trucha arcoíris.

Panel A: Número de células que expresaron c-Fos en la región Dm y DI de truchas BA, MA y C. Como no se encontraron diferencias significativas a lo largo del eje rostro caudal, el análisis muestra el promedio de núcleos c-Fos + en el Dm y DI a lo largo de este eje (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2,12)} = 72,89$ con $p < 0,0001$, efecto de la región $F_{(1,12)} = 148,7$ con $p < 0,0001$. Prueba de Holm Sidak para comparaciones múltiples, *** denota $p < 0,005$ para BA vs. C.) **Panel B:** Vista esquemática de una sección transversal de telencéfalo de trucha arcoíris marcada con una tinción de Nissl fluorescente (Neurotrace). Las líneas punteadas azules delimitan las regiones anatómicas. Vista sagital del telencéfalo (en borde izquierdo inferior) indicando el nivel de las secciones transversales utilizadas para los análisis. El área encerrada en el recuadro azul es la que se encuentra aumentada en las secciones ópticas de la región Dm telencéfalo de la trucha arcoíris (solo hemisferio izquierdo) mostrando la expresión de c-Fos 90 minutos luego del test de MCP. Barra de escala: 50 μ m. **Panel C:** Correlaciones entre el número de células c-Fos + y el desempeño en el protocolo de aprendizaje de EA. Se analizaron tres parámetros de aprendizaje: número de ensayos, latencia de cambio de compartimento y porcentaje de respuestas de evitación. En cada análisis se informa el índice de correlación de Pearson correspondiente. *** $p < 0,0005$ y ** denota $p < 0,001$.

Si bien la expresión de c-Fos en el telencéfalo puede ser activada por estrés, en este protocolo de aprendizaje, no se encontró relación entre el número de veces que el estímulo aversivo fue presentado y los niveles de expresión de c-Fos (Figura 1.9).

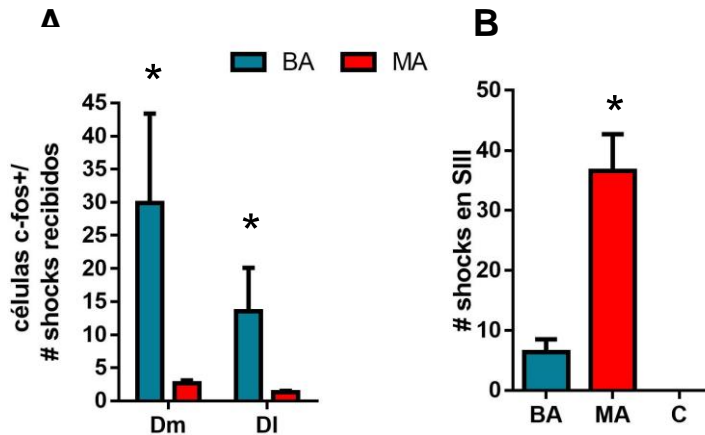


Figura 1.9. Expresión de c-Fos y cantidad de estímulos aversivos recibidos. **Panel A:** Panel derecho: Gráfico de barras que muestra la relación entre el número de células c-Fos+ en las regiones Dm y DI del telencéfalo. **Panel B:** Cantidad de shocks eléctricos recibidos en la última sesión de aprendizaje (BA, MA y C).

Luego, se evaluó si el aumento en la actividad circuitual, se veía reflejado en cambios en los niveles de proliferación celular, evaluados mediante expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Los niveles de PCNA en el Dm de los peces BA fueron significativamente mayores a los niveles de PCNA en el Dm del grupo C (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, efecto de grupo $F(2, 12) = 6,013$; $p = 0,0155$; $n = 5$ para cada grupo) (Figura 1.10).

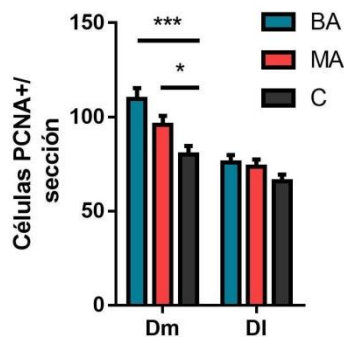


Figura 1.10: Expresión de PCNA durante el aprendizaje por EA. Con barras se indican el número de células PCNA+ presentes en el Dm y DI telencefálicos (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F(2; 12) = 6,013$ y $p = 0,0155$, test de comparaciones múltiples de Bonferroni, * denota $p < 0,05$ para MA vs. C, y *** denota $p < 0,01$ para BA vs. C. $n=5$ para cada grupo, y para cada individuo 5 secciones fueron analizadas).

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la memoria adquirida, se realizó otro conjunto de experimentos de EA (Figura 1.11), donde evaluamos el test de memoria a largo plazo, luego de 24 hs después de la S3 (test MLP). Nuevamente, se encontró que el 50% de los individuos entrenados tuvo un desempeño acorde a lo definido como BA y el otro 50% tuvo el desempeño de un MA (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(1,6)} = 45,31$; $p < 0,0005$; $n = 4$ para cada grupo). (Figura 1.11).

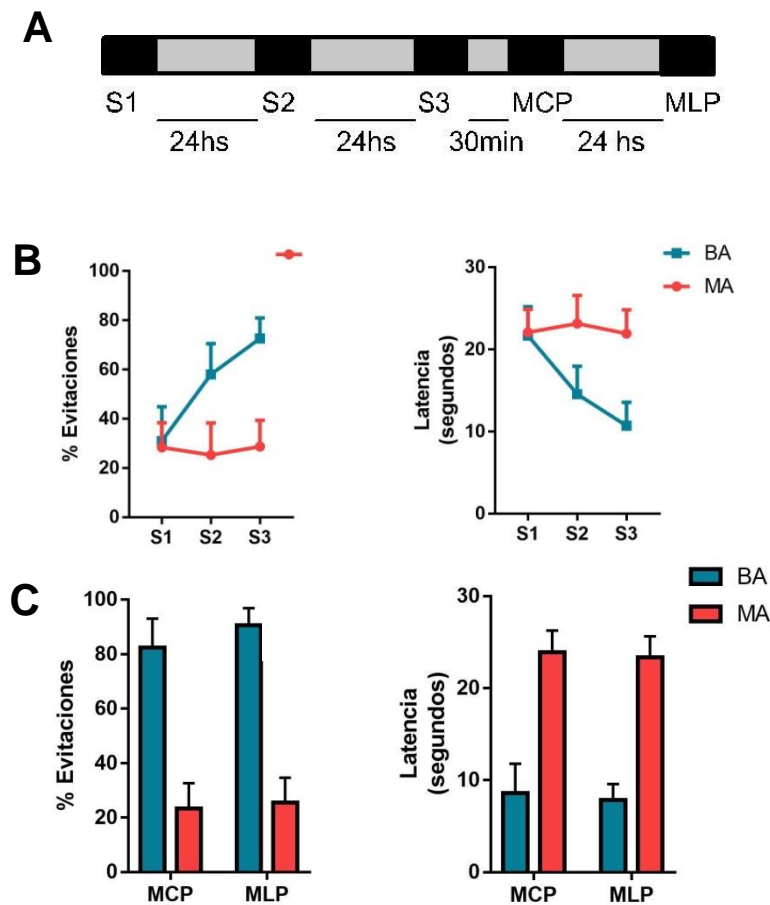


Figura 1.11: Evaluación de la memoria de corto y largo plazo Panel A: Esquema de entrenamiento en el protocolo de evitación activa (EA). **Panel B:** Latencia para cambiar de compartimento a lo largo de las sesiones de aprendizaje. ANOVA de dos vías para medidas repetidas. Efecto de grupo no significativo $F_{(1,6)} = 2,896$, ($n=4$). Prueba de comparaciones múltiples de Sidak, * indica $p < 0,05$ para BA frente a MA en S3. Derecha: Latencia para cambiar de compartimento durante MCP y MLP para sujetos BA y MA. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, efecto de grupo $F_{(1,6)} = 29,49$, con $p=0,0016$, ($n=4$) para cada grupo. Prueba de comparaciones múltiples de Holm Sidak, ** indica $p < 0,005$ para BA frente a MA. **Panel C:** Porcentaje de respuestas de evitación a lo largo de las sesiones de aprendizaje. (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, efecto de grupo $F(2, 12) = 4,24$, $p=0,040$, $n=4$ para cada grupo. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak, * indica $p < 0,05$ para GL frente a BL en S3. Porcentaje de respuestas de evitación durante MCP y MLP para sujetos BA y MA. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, efecto de grupo $F(1, 6) = 45,31$, con $p=0,0005$, $n=4$ para cada grupo. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak, ** denota $p < 0,005$ para BA frente a MA.

Luego del test de MLP se evaluaron los niveles de expresión de c-Fos en diferentes regiones telencefálicas de los individuos BA y MA (Figura 12). El Dm y la región dorsal del telencéfalo (Dd) de los BA presentaron elevada expresión de c-Fos respecto a los niveles de proteína presentes en las mismas regiones del telencéfalo de los MA. No observamos diferencias en los niveles de expresión de c-Fos en la región dorso lateral (DI) entre el grupo BA y MA (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de la región $F_{(2, 12)} = 36,82$, $p < 0,0001$; efecto de grupo $F_{(1, 6)} = 35,53$, $p = 0,0010$; $n = 4$). En concordancia con el experimento anterior, se halló una correlación positiva y significativa entre los parámetros evaluados en el ensayo de MLP y la expresión de c-Fos en las regiones Dm y Dd (Correlación de Pearson: Dm $R^2 = 0,514$ y $p = 0,0454$; Dd $R^2 = 0,758$ y $p = 0,049$; $n = 8$.), en el caso de la región DI, la correlación entre la expresión de c-Fos y la MLP no fue significativa (Correlación de Pearson $R^2 = 0,187$ y $p = 0,2850$; $n = 8$) (Figura 1.12).

En conjunto, estos resultados indican que el aislamiento indujo en los individuos de trucha arcoíris la capacidad de incorporar aprendizajes y es posible establecer un correlato neuronal entre las habilidades cognitivas y el telencéfalo. En base a estos hallazgos, proponemos que la neurogénesis adulta en el circuito telencefálico Dm juega un papel relevante en el procesamiento de señales relacionadas con el aprendizaje.

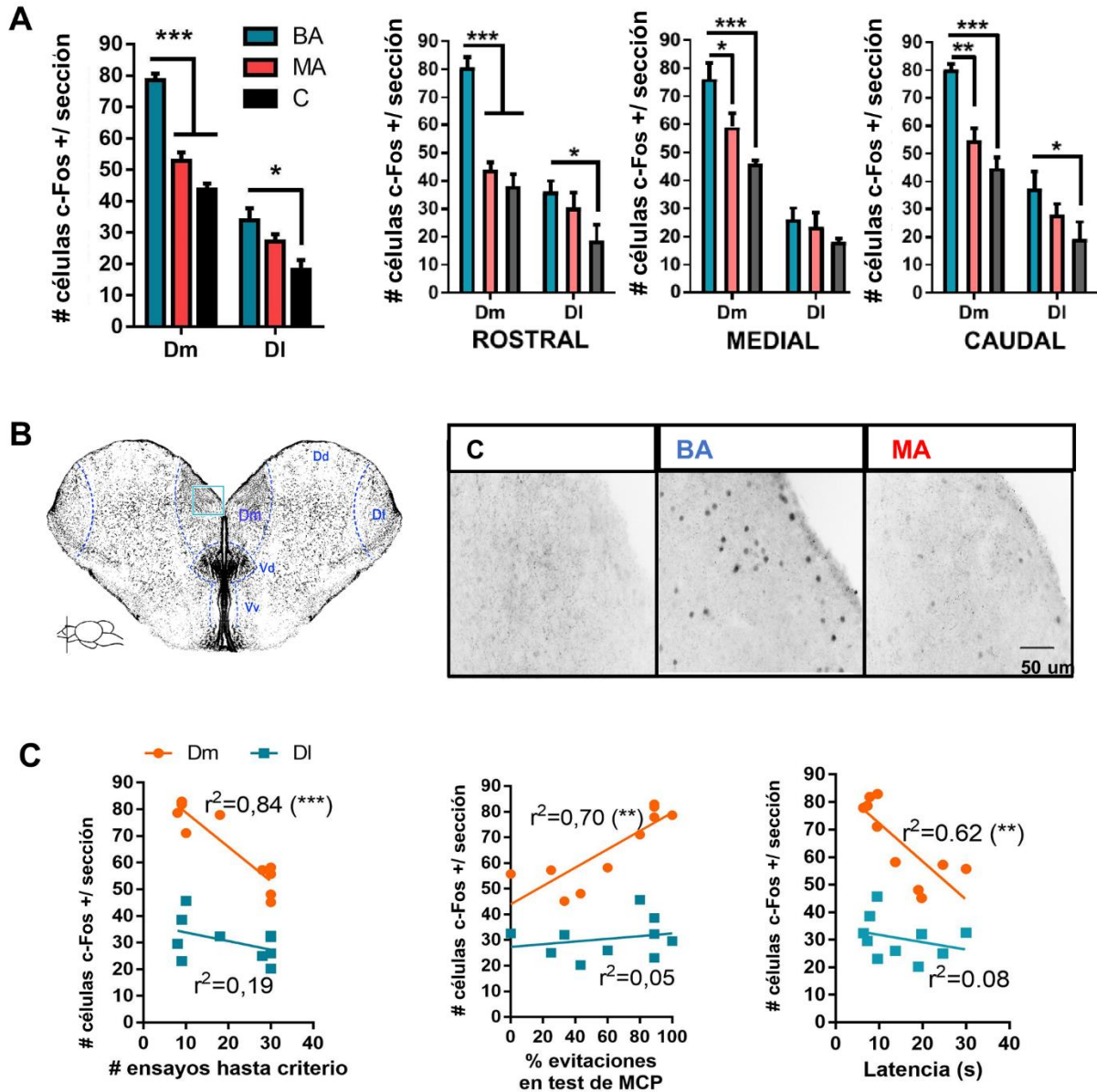


Figura 1.12: El aprendizaje por EA incrementa la expresión de c-Fos en el Dm telencefálico. **Panel A:** Número de células que expresaron c-Fos en la región Dd, Dm y DI del telencefalo de truchas BA y MA. ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de la región $F_{(2; 12)} = 36,82$, con $p < 0,0001$; efecto de grupo $F_{(1,6)} = 35,53$, con $p = 0,001$; $n = 4$. Test de comparaciones múltiples de Holm Sidak, * denota $p < 0,05$ ** denota $p < 0,001$, para BA vs. MA. **Panel B:** Correlación entre el número de células expresando c-Fos en Dd, Dm y DI y el porcentaje de respuestas evitatorias. Las líneas punteadas indican intervalos de confianza del 95%. Para cada análisis se informa el índice de correlación de Pearson y el p valor correspondiente. **Panel C:** Panel superior: secciones de telencefalo de BA (izquierda) y MA (derecha). Para cada sección se muestra en el hemisferio izquierdo la expresión de c-Fos 90 minutos luego del test de MLP y en el hemisferio derecho una tinción de cuerpos de Nissl (Neurotrace). Las líneas punteadas blancas delimitan las regiones anatómicas. Los recuadros amarillos indican las regiones magnificadas en la base de cada sección. Panel inferior: Aumento de las regiones señaladas en los recuadros amarillos del panel superior mostrando la expresión de c-Fos en el Dm, Dd y DI telencefálicos.

1.2) Modulación de la neurogénesis adulta

1.2.a) Proliferación celular y neurogénesis adulta

En función de trabajos previamente realizados en el laboratorio (Mazzitelli-Fuentes, tesis de licenciatura) en esta tesis corroboramos que el aislamiento social tiene efectos deletéreos sobre la neurogénesis adulta en la región Dm de truchas arcoiris.

Se evaluó la actividad proliferativa en la región Dm mediante la expresión de PCNA luego de 3 días en condiciones de control (C) o de aislamiento (A). No se encontraron diferencias significativas en la proliferación celular en el telencéfalo de los peces que permanecieron en condiciones de control (C) o en condiciones de aislamiento (A) (Prueba de Mann Whitney, $p > 0,5$, con $n=3$ para cada grupo Figura 1.13).

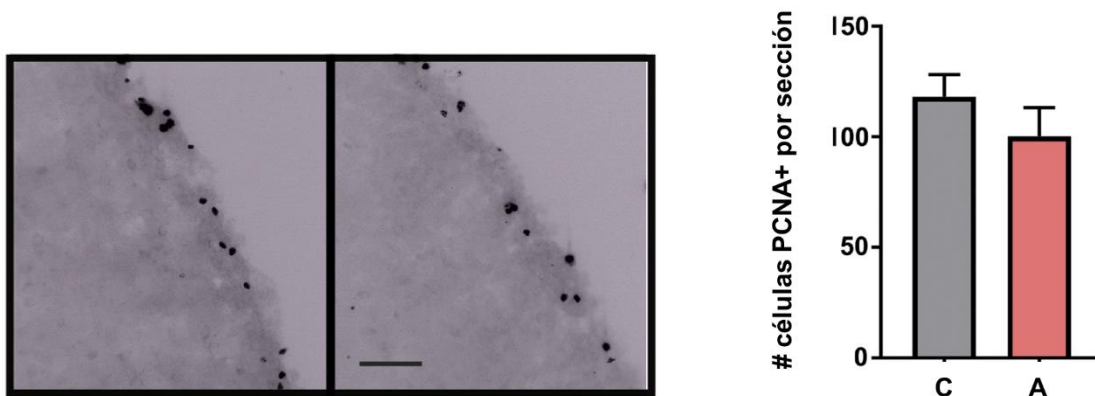


Figura 1.13 El aislamiento social no disminuye la neurogénesis adulta en la región Dm del telencéfalo. Panel A: Secciones ópticas del telencéfalo Dm de la trucha arco iris (hemisferio izquierdo) que muestran la expresión de PCNA tras 3 días de cría en condiciones de control (C) (izquierda) o de aislamiento social (I) (derecha). Barra de escala: 50 μ m. **Panel B:** Número de células PCNA en la sección Dm de truchas sometidas a 3 días en condiciones I o C. Prueba de Mann Whitney $p=0,70$, $n=3$.

En un segundo conjunto de experimentos se realizó una marcación de progenitores neuronales en división mediante inyección de BrdU y se analizó la sobrevivencia de las células marcadas luego de cuatro semanas de permanecer en las condiciones experimentales. Luego de cuatro semanas de aislamiento, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad total de células BrdU+ respecto del grupo Control (prueba de Mann Whitney, $p > 0,5$, con $n=4$ para cada grupo). Posteriormente, se evaluó la neurogénesis adulta detectando la expresión de un marcador de fenotipo neuronal NeuN en las células marcadas con BrdU. En el telencéfalo Dm de los individuos del grupo C se encontró que el 70,25% de las células BrdU positivas también expresaban el marcador neuronal NeuN, mientras que en el grupo A sólo había un 42% de co-localización (Figura 1.14; Test de Mann Whitney, $p=0,029$; $n=4$).

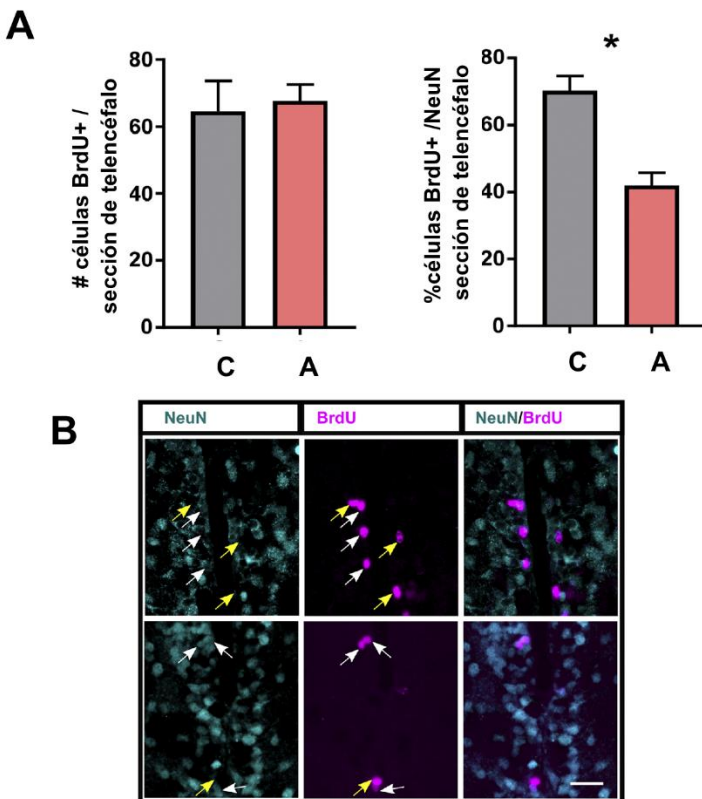


Figura 1.14: Panel A: Secciones ópticas del telencéfalo Dm de truchas arco iris criadas durante 4 semanas en condiciones C (arriba) o A (abajo), mostrando la incorporación de BrdU (magenta) y la expresión de NeuN (cian). Las flechas blancas indican las células BrdU+ y NeuN+, mientras que las flechas amarillas indican las células que sólo son BrdU+. Barra escala: 35 μ m. **Panel B:** Número total de células BrdU+ en el telencéfalo Dm de truchas arco iris bajo 4 semanas de condiciones I o C durante 4 semanas. Prueba de Mann Whitney $p=0,68$, $n=4$. **Panel C:** Porcentaje de células BrdU+ que expresan NeuN en la región telencefálica Dm de truchas bajo 4 semanas de condiciones I o C. Prueba de Mann Whitney, * denota $p < 0,05$, $n=4$.

Estos resultados indican que el aislamiento social no generó efectos deletéreos en la proliferación celular, pero si en la incorporación de nuevas neuronas en la región telencefálica considerada.

1.2.b) Test del “Novel Tank” (prueba del tanque nuevo):

Con el fin de analizar si el tratamiento de aislamiento social estresó significativamente a los individuos se realizó el test del “tanque nuevo” (ver sección 1.3.b de “Materiales y métodos” para una descripción detallada del diseño experimental de esta “prueba del tanque nuevo”; Figura 1.15). En esta prueba, se asume que la actividad natatoria de los peces es un buen indicador de estrés, dado que, en condiciones de estrés, los peces muestran escaso movimiento a lo largo de la columna de agua y permanecen en la parte inferior del tanque. Por el contrario, los individuos con bajo nivel de estrés, exploran a lo largo de la columna de agua del tanque.

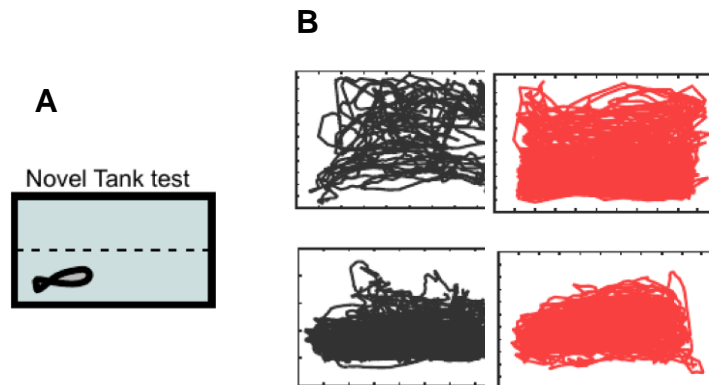


Figura 1.15: Test del Novel Tank. Panel A: Representación esquemática del frente del tanque experimental utilizado para evaluar el estrés de los individuos experimentales. **Panel B:** El comportamiento natatorio fue registrado con una cámara digital, se presentan a modo de ejemplo, diferentes trayectorias efectuadas por los peces durante el tiempo en el que se desarrolló el protocolo experimental. En negro se describen las trayectorias de peces que se encontraron en condiciones (C) y en rojo peces que fueron mantenidos en aislamiento social (A).

No se hallaron diferencias significativas en ninguna de las variables consideradas entre los individuos que permanecieron en condiciones control (C) y los que permanecieron aislados (A) (Figura 1.16; Prueba de Mann Whitney, para todas las variables consideradas, $p > 0.5$). Debido a que no se observaron indicadores de estrés en el comportamiento natatorio, se asumió que el aislamiento social no indujo niveles significativos de estrés en los individuos de trucha arcoíris y se prosigió con el protocolo experimental de aprendizaje.

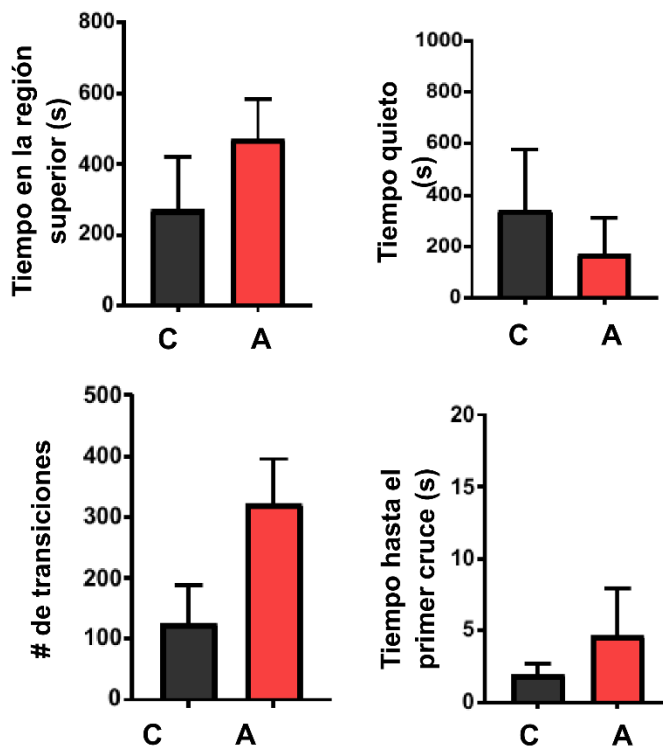


Figura 1.16: Variables analizadas en el Test del Novel Tank: distancia total nadada, tiempo total de permanencia en la región superior del tanque, el tiempo que los peces permanecieron inmóviles, número de transiciones desde el fondo a la parte superior del tanque, y la latencia que mostraron los peces para hacer la primera transición a la porción superior del tanque. Para todos los datos se realizó una prueba de Mann Whitney, la correspondiente las estadísticas fueron: $p = 0.5556$, $p = 0.5556$, $p = 0.6825$, $p = 0.0635$, y $p = 0.8571$, respectivamente ($n = 4$ para C, y $n = 5$ para A).

1.2.b) Aislamiento social

Independientemente del grupo experimental considerado (C o A), el 50% de los peces de cada grupo fueron catalogados como buenos aprendedores (BA), mientras que el otro 50% fueron considerados como MA (Figura 1.17). Los individuos que fueron BA de cada tratamiento mejoraron su rendimiento en el protocolo de EA a lo largo de las sesiones de aprendizaje (ANOVA de dos vías, efecto de la sesión de aprendizaje $F_{(2, 14)} = 7,63$, $p = 0,006$; Grupo A: $n = 5$; grupo C: $n = 4$).

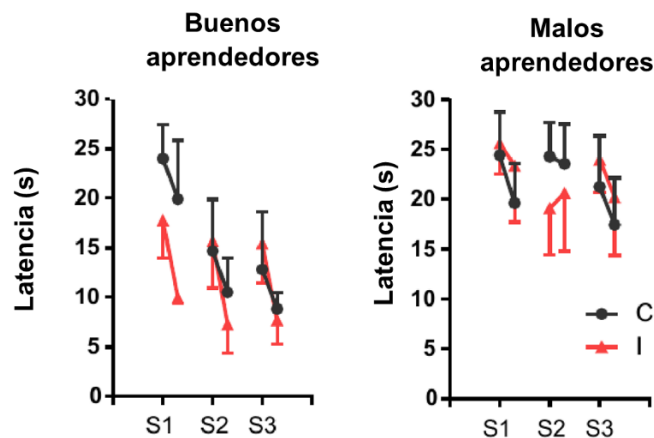


Figura 1.17: Progreso de aprendizaje a través de las sesiones evaluado con el promedio de la latencia. Se muestran los valores medios de latencia para nadar hacia el compartimento seguro del tanque para los primeros y últimos 5 ensayos de cada sesión. Los BA mejoran en cada sesión independientemente de haber sido mantenidos en condiciones C o A. Latencias menores a 15 segundos indican evitación. Los malos aprendedores no mejoraron a lo largo de las sesiones de aprendizaje. Para C $n=4$, y para A $n=5$. ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de sesión $F_{(2, 14)} = 4.908$ $p = 0.0243$. Prueba de comparaciones múltiples de Holm Sidak, * denota $p < 0.05$ para S1 vs S3 en C. Para C, $n = 4$, y para A, $n = 5$. El panel derecho muestra los test de MCP y MLP (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(1, 7)} = 22.27$, $p = 0.0022$. Prueba de comparaciones múltiples de Holm Sidak, * indica $p < 0.05$ y ** indica $p < 0.01$ ambos para C vs I. Para C $n = 4$, y para A $n = 5$.

No obstante, a lo largo de las sesiones sólo en los individuos en el grupo C aumentó el porcentaje de respuestas evitatorias, también mejoraron significativamente el número de ensayos hasta llegar a criterio y la latencia de escape (Comparación múltiple de Tuckey: Respuestas evitatorias S1 vs. S2: $p =$

0,010 y S1 vs. S3: $p = 0,002$, $n = 5$ para el grupo A y $n = 4$ para el grupo C; Figura 1.18).

Adicionalmente, sólo los individuos del grupo C mostraron buena MCP y MLP (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto del tratamiento $F_{(1,7)} = 61,6$, $p = 0,0001$, grupo A: $n = 5$; grupo C: $n = 4$; Figura 1.18). Solo los individuos del grupo C mostraron buena MCP y MLP (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto del tratamiento $F_{(1,7)} = 61,6$, $p = 0,0001$, grupo A: $n = 5$; grupo C: $n = 4$; Figura 1.18).

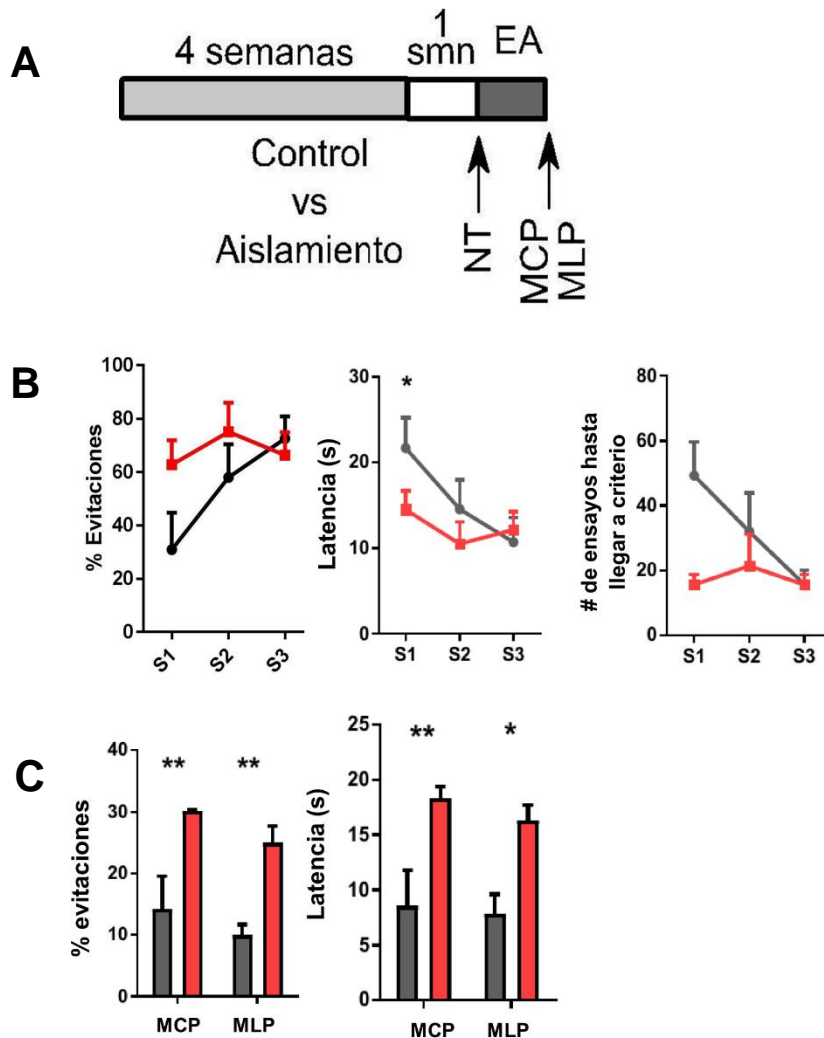
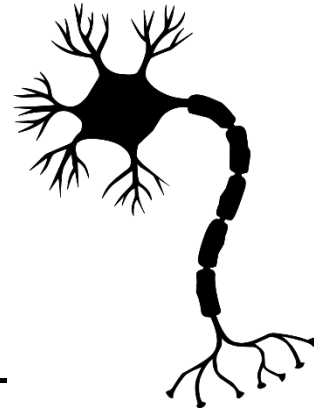
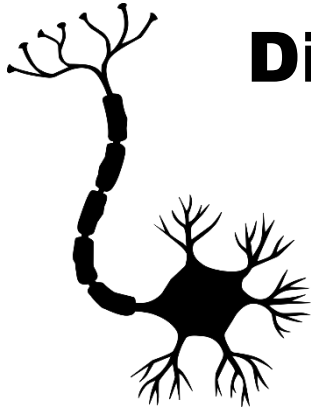


Figura 1.18: El aislamiento social perjudica el rendimiento cognitivo en una tarea de aprendizaje por EA. Panel A: Representación esquemática del diseño experimental. Los peces fueron sometidos a cada tratamiento, control (C; negro) o aislamiento (A; rojo) durante 4 semanas. Luego, ambos grupos fueron mantenidos bajo las condiciones del tratamiento control durante otra semana para eliminar el estrés agudo producido por las condiciones de aislamiento social. **Panel B:** Porcentaje de respuestas evitatorias a través de las sesiones de aprendizaje de los peces C y A (ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de la sesión $F_{(2,14)} = 7,53$ con $p = 0,006$. Test de comparaciones múltiples de Tuckey * $p < 0,05$ para S1 vs. S2, y para S1 vs. S3. Para C $n=4$ y para A, $n=5$). **Panel C:** Porcentaje de respuestas evitatorias en los tests de MCP y MLP. ANOVA de dos vías para muestras repetidas, efecto de grupo $F_{(2,14)} = 61,6$ con $p = 0,0001$. Test de comparaciones múltiples de Bonferroni: * $p < 0,05$. Para C $n=4$ y para A $n=5$).

De estos estudios podemos concluir que el aislamiento social afecta negativamente las habilidades cognitivas de los individuos de trucha arcoiris.

CAPÍTULO 1

Discusión de los resultados



DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los circuitos neuronales son estructuras dinámicas, y sus modificaciones a lo largo de la vida de los organismos están fuertemente asociadas al aprendizaje, ajuste y adaptación al ambiente (Gonda *et al.*, 2011). En este trabajo se demostró que la trucha arcoíris tiene capacidad de aprender una tarea de tipo asociativa por medio de un paradigma como el de EA, ampliamente utilizado en diferentes especies de vertebrados para evaluar el aprendizaje emocional. No obstante, solo el 50% de los individuos que completaron el protocolo de aprendizaje pudieron ser clasificados como buenos en el aprendizaje (BA). Diferencias similares en las habilidades cognitivas individuales han sido observadas en otras especies de teleósteos (Budaev *et al.*, 2002; Lucon-Xiccato y Bisazza, 2017). Por ejemplo, en *Danio rerio* (pez cebra) solo el 37% de los peces que son entrenados en un protocolo de EA pueden ser considerados buenos aprendedores (Aoki *et al.*, 2013), en el caso de *Hemigrammus caudovittatus* (Tetra Buenos Aires) se ha observado que el desempeño y habilidad cognitiva de los individuos varía entre 16-46 % en función del hábitat de origen (Zhuikov 1999). Las diferencias individuales en el desempeño en protocolos de EA también existen en mamíferos, en los que se ha observado que el nivel de temor y las estrategias utilizadas para hacer frente a las amenazas, se traducen en diferencias en el desempeño en protocolos de EA (Fuller 1970; Benus *et al.*, 1989; Weinberger y Martinez 1992; Gorka *et al.*, 2016). También se ha descubierto que las diferencias en las habilidades cognitivas en los peces, varían en función del tamaño del cerebro, aquellos peces con cerebros más grandes poseen habilidades cognitivas

superiores (Kotrschal *et al.*, 2013; Kotrschal *et al.*, 2014). En este marco, sería interesante evaluar la contribución de la neurogénesis adulta al tamaño cerebral y luego a las habilidades cognitivas de los individuos.

En los experimentos realizados se evaluó el desempeño de la trucha arcoíris en un paradigma de aprendizaje emocional, utilizando un protocolo de EA. Pudimos establecer una relación estructura función entre el Dm y esta tarea cognitiva. En mamíferos, los aprendizajes de tipo emocional y por medio de EA involucran diferentes regiones de la amígdala cerebral (Maren 2003; Choi *et al.*, 2010; Moscarello y Ledoux 2013; Ramirez *et al.*, 2015). En los peces teleósteos, diferentes núcleos del palium y subpalium telencefálicos serían el equivalente a la amígdala cerebral de los mamíferos. Analizando la expresión génica se ha propuesto que el núcleo supra comisural de la zona ventral del telencéfalo (Vs) es homólogo a la parte ventral de la amígdala central. Por otro lado, el núcleo post comisural de la zona ventral del telencéfalo (Vp) es homólogo a la región dorsal de la amígdala central de los mamíferos (Ganz *et al.*, 2012). Otra prueba que sostiene esta homología es la presencia de receptores Cb1 en la región Dm de *Apteronotus leptorhynchus* y pez cebra (Lam *et al.*, 2006; Harvey-Girard *et al.*, 2013), mientras que en los roedores los receptores Cb1 se encuentran en las neuronas de la amígdala basolateral (Matsuda *et al.*, 1993). En este marco, es posible que tanto la región Vs como Vp (amígdala subpalial) y el Dm (amígdala palial) constituyan el complejo amigdaloides en los teleósteos (Ganz *et al.*, 2015). En esta línea, se ha demostrado que la región Dm en el cerebro de la trucha arcoíris recibe aferencias desde la zona ventral del telencéfalo (Vv) y desde la región Vsy que se proyectan

referencias hacia el lóbulo hipotalámico y hacia la región Vs (Folgueira *et al.*, 2004a; Folgueira *et al.*, 2004b). Giassi y colaboradores (Giassi *et al.*, 2012) también describieron referencias de la región Dm hacia el hipotálamo. En base a todas estas pruebas, es que la amígdala basolateral de los mamíferos es propuesta como región evolutivamente homóloga al Dm del telencéfalo de los teleósteos.

Además de la evidencia anatómica, existe evidencia empírica que prueba que la región Dm del palium telencefálico está involucrada en el aprendizaje emocional y el comportamiento motivacional en diferentes especies de teleósteos (Portavella *et al.*, 2005; von Throta *et al.*, 2014). Se ha demostrado en el pez dorado (Portavella *et al.*, 2003, Portavella *et al.*, 2004 a y b) y en el pez cebra (Lal *et al.*, 2018), que la región dorso medial (Dm) del telencéfalo es necesaria para el aprendizaje por evitación activa (EA). Experimentos en pez dorado (*Carassius auratus*), han revelado que la ablación del Dm elimina por completo los aprendizajes adquiridos durante un protocolo de EA (Portavella *et al.*, 2004). En este marco, se ha identificado en la región Dm del cerebro de pez cebra, una población de neuronas glutamatérgicas fundamentales para el aprendizaje por evitación activa y el aprendizaje condicionado por temor (Lal *et al.*, 2018).

En este trabajo se analizó si el aprendizaje por EA aumenta la actividad neuronal en la región Dm del telencéfalo de la trucha arcoíris. Luego de evaluar la memoria de corto plazo (30 minutos luego de finalizar las sesiones de aprendizaje) pudieron correlacionarse las habilidades cognitivas solo con la actividad neuronal (evaluada de manera indirecta mediante la expresión de c-Fos) de la región Dm.

Los resultados hallados demuestran por primera vez que se establece una relación entre actividad neuronal en la región Dm del telencéfalo y el desempeño en un protocolo de EA en los peces teleósteos. El hallazgo de esta asociación entre actividad neuronal y comportamiento es consistente con los experimentos de lesión telencefálica realizados en pez dorado (Portavella *et al.*, 2002; Portavella *et al.*, 2004; Portavella *et al.*, 2005) y con el hallazgo de una población de neuronas, necesarias para el aprendizaje por evitación activa, en el Dm telencefálico del pez cebra.

También se analizó la participación de la región dorsal del telencéfalo (Dd) en la codificación de la memoria de largo plazo (evaluada 24 hs luego de finalizado el protocolo de aprendizaje). Se encontró una gran activación neuronal tanto en la región Dd como así también en la región Dm del telencéfalo de los individuos que pudieron definirse como buenos aprendedores. Nuevamente, se encontró una correlación entre la actividad neuronal y el rendimiento en la evaluación de la memoria de largo plazo. En este marco, se ha descrito a la región Dd, como una red recurrente que posee conexiones recíprocas complejas con diferentes estructuras del pallium y subpallium en el telencéfalo del pez eléctrico *Apteronotus leptorhynchus* (Elliot *et al.*, 2017).

En la trucha arcoíris se han podido describir la conectividad entre las estructuras telencefálicas (Folgueira *et al.*, 2004a, 2004b). Las regiones Vs, Vv y Vp del subpallium, están fuertemente interconectadas y proyectan terminales hacia el Dm, Dc y Dd del pallium telencefálico, a la vez que la región Dd se conecta con las regiones Dm y Dc. Es muy probable que esta conectividad que

involucra el complejo amigdaloides de los teleósteos (Vs, Vv, Vd y Dm) esté implicada en el procesamiento de la memoria emocional. Específicamente, Aoki y colaboradores (2013) identificaron en el telencéfalo del pez cebra una región dorsal en la que las neuronas se activan luego de evaluar el aprendizaje en un protocolo similar al empleado en esta tesis (Aoki *et al.*, 2013). Aoki y colaboradores identificaron la región del pallium asociada a la memoria como Dc, no obstante, la localización de la región que se activa en los experimentos realizados en ese trabajo, indicaría que podría tratarse de la región dorsal del telencéfalo (Dd). Además, otros autores (Vargas *et al.*, 2009), han demostrado que lesiones en la región Dd, interfieren en la consolidación, pero no así la evocación de las memorias adquiridas en un condicionamiento por EA. No obstante, Vargas y colaboradores no hicieron una correcta evaluación del aprendizaje, dado que la memoria fue evaluada utilizando el protocolo de aprendizaje, o sea, presentando los estímulos condicionados e incondicionados. Para realizar una evaluación correcta de la tarea aprendida hay que omitir la presentación del estímulo aversivo. En este marco, los individuos con una lesión en la región Dd pudieron volver a aprender las reglas del protocolo de EA. Al considerar estos hallazgos en conjunto, puede proponerse a la región Dd como una región involucrada en la evocación de memorias en la región palial del telencéfalo de los peces teleósteos.

En base a trabajo previamente realizado en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, se sabe que existen en la región peri-ventricular del Dm del telencéfalo de la trucha arcoíris progenitores neuronales y que el aislamiento social tiene un impacto negativo en la producción de neuronas nuevas en esta región del

telencéfalo (Mazzitelli Fuentes 2016). Sabiendo que el Dm participa en el procesamiento de información durante el aprendizaje por EA (presente tesis) y que el aislamiento social disminuye la neurogénesis en Dm, se planteó evaluar la habilidad cognitiva de truchas aisladas socialmente. Las truchas socialmente aisladas mostraron poca retención en las sesiones de aprendizaje y severos déficits en la memoria de corto y largo plazo. El mismo tipo de déficit cognitivo fue encontrado en peces cíclidos aislados durante 10 días y luego entrenados en una tarea de aprendizaje espacial (Lombardi Brandao *et al.*, 2015). Esta evidencia sugiere que el aislamiento social conlleva a déficits en la plasticidad neuronal los cuales derivan en déficits cognitivos.

La interacción social influye fuertemente en la fisiología y comportamiento de los animales (Blanchard *et al.*, 2001; Lindsey *et al.*, 2014). En algunos experimentos Øverli y colaboradores encontraron que mantener 6 días aislados a individuos de trucha arcoíris es suficiente para inducir estrés crónico (Øverli *et al.*, 2002). En el pez cíclido *Archocentrus nigrofasciatus* se encontró que solo 24 horas de aislamiento social son suficientes para incrementar los niveles de cortisol en sangre (Early *et al.*, 2006). También se ha encontrado que estresores sociales disminuyen la proliferación celular en el telencéfalo de la trucha arcoíris (Sørensen *et al.*, 2012). No obstante, nosotros hemos observado una disminución de la neurogénesis en la región Dm pero no alteraciones en la proliferación de progenitores neurales, lo que podría estar indicando alteraciones en la señales de diferenciación neuronal presentes en los nichos neurogénicos (Mazzitelli Fuentes, tesina de licenciatura).

En diferentes especies de peces se ha encontrado que el aislamiento social altera la actividad locomotora y las señales relacionadas al estrés (Hannes y Frank 1983; Gómez-Laplaza y Morgan 1991; Shams *et al.*, 2015; Sørensen *et al.*, 2012). Debido a que en el test del “Novel Tank” no se encontraron diferencias en la motivación o la actividad exploratoria de las truchas que habían estado aisladas, se determinó que todos los grupos experimentales realizaran el protocolo de aprendizaje. En función de estos resultados, los déficits en la memoria de los peces que estuvieron aislados pueden explicarse por alteraciones en los mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la consolidación y evocación de la memoria. La incorporación de nuevas neuronas al circuito del Dm podría ser una de las formas de plasticidad involucradas. No obstante, deberían realizarse más experimentos para corroborarlo.

CAPÍTULO 1

Conclusiones



CONCLUSIONES CAPÍTULO 1

En base a los experimentos realizados con *O.mykiss*, en esta tesis se pudo concluir que: las truchas poseen potencial de aprendizaje en un protocolo de evitación activa. La capacidad de aprendizaje difiere entre los individuos, dado que solo la mitad de los individuos entrenados mostraron buen desempeño en el aprendizaje y buena memoria de corto y largo plazo. A nivel telencefálico, el aprendizaje se asoció a aumentos en la actividad neuronal, y en los niveles de proliferación celular de la región Dm.

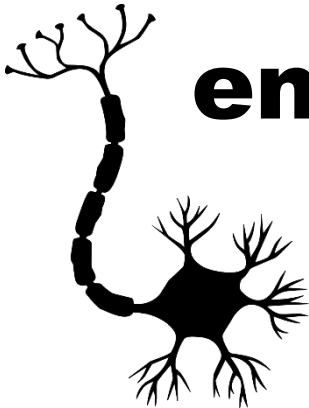
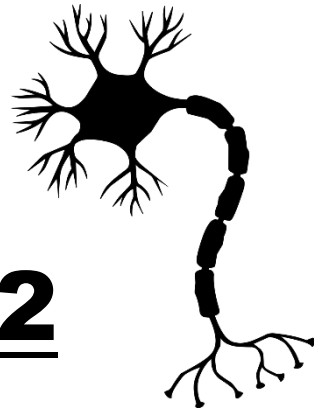
Por otro lado, si bien el aislamiento social no influyó en los niveles de proliferación celular en el telencéfalo, este tratamiento generó una disminución en los niveles de neurogénesis adulta, observándose una disminución en la incorporación de nuevas neuronas en la región Dm. Además, el aislamiento social influyó negativamente en el desempeño individual en el paradigma de aprendizaje y la evocación de memorias de corto y largo plazo.

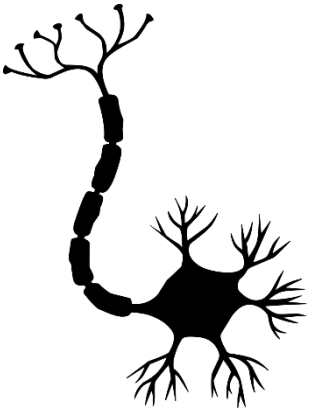
Los resultados aquí presentados permiten establecer una robusta relación estructura función entre la actividad neuronal en la región Dm del telencéfalo y el aprendizaje de una tarea de evitación activa en *O. mykiss*.

CAPÍTULO 2

Regeneración neuronal

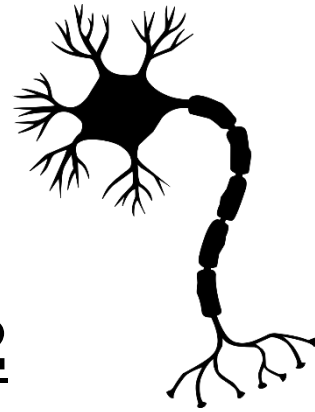
en *Danio rerio*





CAPÍTULO 2

Introducción



INTRODUCCIÓN

Neurogénesis regenerativa

La neurogénesis regenerativa es el proceso por el cual la producción de neuronas puede verse estimulada o restablecida en el sistema nervioso para recomponer tejido dañado o funciones específicas (Jessberger 2009). La regeneración neuronal implica recomposición de la arquitectura tisular del tejido nervioso en respuesta a una lesión. Algunos vertebrados no mamíferos adultos pueden regenerar considerables regiones de su sistema nervioso central. La neurogénesis regenerativa, al igual que la neurogénesis constitutiva, es un rasgo evolutivamente conservado en los vertebrados, pero que ha ido reduciéndose a lo largo de la escala evolutiva. Diferentes estudios realizados con vertebrados no mamíferos (grupos basales de vertebrados), constatan que existe regeneración de tejido nervioso luego de daños en la retina, la médula espinal, el cerebro y el cerebelo (Zupanc *et al.*, 2012; Skaggs *et al.*, 2014; Zambusi *et al.*, 2020).

Los estudios de regeneración fueron fuertemente impulsados en el siglo XIX por el descubrimiento de la capacidad de regenerar extremidades de algunos anfibios (específicamente salamandras y ranas). De estos estudios, surgió la primera descripción detallada del proceso de regeneración de células nerviosas, en este caso en la salamandra. Durante la década de 1950 se realizaron varios avances fundamentales en el estudio de la regeneración neuronal, observándose que anfibios y peces eran capaces regenerar partes dañadas del cerebro, al igual que los axones del nervio óptico de los peces, incentivando así el estudio de la

regeneración neuronal en vertebrados no mamíferos (Singer 1952; Altman 1962; Carlson 2007; Brockes y Kumar 2008). En los años subsiguientes se desarrollaron investigaciones que permitieron describir procesos de regeneración de células de la retina de peces. Estos trabajos demostraron que las células gliales de la retina, no solo tenían función de soporte, sino que también podrían jugar un papel importante en la regeneración neuronal (Raymond *et al.*, 2004; Bernardos *et al.*, 2007). Con el desarrollo de técnicas de marcado radiactivo para estudiar la migración celular en el cerebro, pudo hacerse un seguimiento del movimiento de células gliales después de una lesión y determinar el grado de contribución de estas células a la regeneración del tejido nervioso, lográndose la primera descripción de regeneración de células nerviosas en el cerebro de peces (Goldman 2014). Hacia la década de 1980 comenzó a estudiarse la mecánica que subyace a la regeneración neuronal en estos modelos animales, poniendo especial énfasis a factores de crecimiento y las señales moleculares implicadas en la regeneración neuronal en peces (Bhatt *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2010; Kyritsis *et al.*, 2014). Posteriormente se describió la existencia de células madre neurales presentes en tejido nervioso de organismos adultos, que hasta el momento solo se pensaba que estaban presentes en el desarrollo temprano del cerebro. Estas células madre eran reclutadas durante la regeneración neuronal (Gage *et al.*, 1995; Doetsch *et al.*, 1997; Lepousez *et al.*, 2015). En conjunto, todos los conocimientos que se elaboraron sobre la regeneración neuronal en los vertebrados llevaron a generación de nuevas hipótesis, muchas de las cuales fueron puestas a prueba con los peces como principal modelo de estudio.

En numerosas especies de peces se ha descrito la existencia de una eficiente recomposición tisular del SNC a partir de células madre neurales (Kroehne *et al.*, 2011). Específicamente, el estudio de la regeneración neuronal utilizando peces como modelo experimental data de mediados del siglo pasado (para una revisión ver Lust y Tanaka 2018). Sin embargo, en las últimas décadas, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en el modelo más utilizado para investigar la regeneración del telencéfalo, tectum óptico, cerebelo y médula espinal.

En 1901, el científico italiano Raffaele Dubois describió en el pez teleósteo *Carassius auratus* (pez dorado) la capacidad de regenerar tejido nervioso luego de extirpar parte del cerebro (Dubois 1901). Este trabajo fue el puntapié para el estudio de la regeneración neuronal en los peces teleósteos, dado que fue uno de los primeros reportes de regeneración neuronal en vertebrados y específicamente en peces. Desde entonces, se han utilizado diferentes métodos para lesionar el cerebro de los peces y estudiar la regeneración neuronal. Considerando a los peces teleósteos, los primeros estudios en los que se realizaron cirugías cerebrales, fueron en su mayoría desarrollados sobre el telencéfalo, y consistieron en la realización de remociones bilaterales (Hainsworth *et al.*, 1967), remoción de un hemisferio telencefálico (Maron 1963; Hainsworth *et al.*, 1967; Overniev y Currow 1969) o remoción telencefálica completa. Posteriormente, se desarrollaron métodos que permitieron aumentar la selectividad del área a dañar y restringir los daños a regiones delimitadas del cerebro. Años más tarde, fue posible efectuar lesiones sobre el tejido cerebral utilizando objetos punzantes (Kishimoto *et al.*,

2011; Kyristis *et al.*, 2012; Diotel *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2014; Lust y Tanaka 2018).

Por otro lado, si bien la regeneración neuronal es un proceso distribuido en todo el cerebro de los peces, existen diferencias en el potencial regenerativo de las diferentes regiones cerebrales y también en las distintas subdivisiones de una misma región (Lust y Tanaka 2018). Las diferencias en la capacidad regenerativa se relacionan con los tipos de progenitores presentes en la región cerebral dañada, la distancia entre el sitio de lesión respecto a las regiones proliferativas y la actividad mitótica de los grupos de progenitores neurales que se activan al ser necesaria una reparación (Lindsey *et al.*, 2014). Por lo tanto, las distintas regiones cerebrales poseen diferentes potenciales regenerativos. En este marco, el desarrollo de diferentes protocolos de lesión ajustados a regiones específicas del cerebro, fue fundamental para poder analizar de forma integral el proceso de regeneración neuronal.

Protocolos de lesión

Se han utilizado diferentes métodos para efectuar lesiones. Entre los métodos más utilizados para realizar lesiones en el tejido cerebral se encuentran las lesiones mecánicas (Schmidt *et al.*, 2014; Kishimoto *et al.*, 2012) y las lesiones excitotóxicas (Skaggs *et al.*, 2014). En la lesión mecánica, generalmente un objeto punzante se introduce en el cerebro atravesando los huesos del cráneo hasta llegar al cerebro, o dependiendo de la región cerebral puede introducirse una aguja a través de las narinas (Kishimoto *et al.*, 2012; Diotel *et al.*, 2013; Sanchez-

Gonzalez *et al.*, 2022). En una serie de estudios pioneros realizados en el pez lebistes (o guppy) tanto en estadios juveniles como adultos se analizó la restauración morfológica del telencéfalo dorsal luego de infligir una lesión punzante (Richter y Kranz 1970). En peces juveniles y adultos se observó una proliferación reactiva en la zona ventricular dorsal en respuesta a la lesión y en consecuencia una elevada migración de células hacia el parénquima interno durante el curso de la regeneración. Luego de seis meses no se registraron rastros de la lesión y la arquitectura tisular se encontraba aparentemente recuperada. Otro pez modelo utilizado para el estudio de la regeneración neuronal en respuesta a daños experimentales infringidos por lesión punzante es el pez eléctrico *Apteronotus leptorhynchus*. Luego de efectuar un daño en el cerebro del pez eléctrico, se observó el inicio de una cascada de respuestas fisiológicas que involucraron: respuesta apoptótica, remoción de las células muertas y formación de nuevas neuronas (Sîrbulescu y Zupanc 2009). Existe entonces evidencia que permite concluir que los procesos regenerativos del SNC ocurren a lo largo de todo el eje rostro-caudal del cerebro, y que la regeneración neuronal es un mecanismo generalizado entre los peces teleósteos.

Alcanzar la regeneración neuronal desde progenitores neurales constitutivos o latentes requiere un ajustado control sobre diferentes parámetros del ciclo celular (Alunni y Bally-Cuif 2016). Se han descrito diferentes maneras de regeneración tisular que involucran procesos de transdiferenciación, de diferenciación, y activación de progenitores endógenos (Kroehne *et al.*, 2011). En respuesta a un daño en el tejido nervioso, la regeneración neuronal implica un aumento de la

proliferación y la neurogénesis, la migración y conexión sináptica de nuevas neuronas al sitio de lesión (Endo *et al.*, 2007; Kaslin *et al.*, 2008). Adicionalmente, diferentes estudios llevados a cabo en pez cebra indican que la regeneración neuronal es posible gracias a la combinación de procesos fisiológicos, celulares y moleculares que intervienen en las vías de la neurogénesis constitutiva y eventos moleculares exclusivos de la regeneración neuronal (Alunni y Cuif 2016; Bollaerts *et al.*, 2018; Ceci *et al.*, 2018).

Células madre neurales

Existe heterogeneidad morfológica y molecular entre las células madre neuronales involucradas en la respuesta a un daño y muchas de esas diferencias se basan en distintos mecanismos moleculares que controlan la quiescencia y la actividad proliferativa de los progenitores (Marz *et al.*, 2010; Glover *et al.*, 2017; Lindsey *et al.*, 2019). Qué progenitores intervienen en el proceso de regeneración tisular, dependerá de la región del cerebro dañada. En muchos casos son los mismos progenitores implicados en la neurogénesis homeostática, en otros casos participan progenitores que permanecían en estado quiescente y reingresan en el ciclo celular luego de efectuada una lesión (Glover *et al.*, 2017). Las diferencias entre las poblaciones de progenitores se basan en sus perfiles de respuesta a hormonas, metabolismo, factores de crecimiento, y las señales derivadas de la cascada de eventos desencadenada luego de un daño en el tejido (Glover *et al.*, 2017). Por ejemplo, en las zonas neurogénicas del telencéfalo del pez cebra se encuentran progenitores de glía radial, que en condiciones de homeóstasis se encuentran con el ciclo celular suspendido, manteniendo unas pocas células en

estado de división sólo para mantenimiento de la neurogénesis adulta constitutiva. Si se efectúa un daño en esa región telencefálica, esas células madre quiescentes vuelven a entrar en el ciclo celular, dando lugar a progenitores que son capaces de regenerar linajes neuronales completos y repoblar la zona dañada (Krohene *et al.*, 2011). En el telencéfalo, ya sea en estado homeostático, como en un contexto regenerativo, las células madre neuronales resultan fundamentales para el mantenimiento de la integridad tisular (Ming y Song 2011).

Se han analizado diferentes aspectos de los procesos regenerativos luego de daños en el SNC, desde su potencial para recuperar las condiciones anatómicas previas al daño, hasta los mecanismos celulares y proliferativos involucrados en el reclutamiento de progenitores para la reparación (Zupanc y Clint 2003; Kizil *et al.*, 2012; Kishimoto *et al.*, 2012; Kyristis *et al.*, 2012; Lust y Tanaka 2019). Kishimoto y colaboradores realizaron una injuria experimental en el telencéfalo de pez cebra y observaron un incremento en la proliferación de precursores neuronales en la zona ventricular del telencéfalo dañado respecto del hemisferio contralateral que mantuvieron intacto en el experimento para considerarlo control. Estos autores documentaron el curso temporal de los eventos proliferativos, observando que luego de efectuada la lesión, la proliferación de células madre comienza 3 días post lesión y alcanza el máximo al séptimo día luego de la injuria. A los 35 días luego del daño, la zona afectada se encuentra repoblada de neuronas nuevas provenientes de la zona ventricular y que mediante procesos de migración tangencial y radial llegaron al sitio de lesión. En otro tipo de experimentos, se encontró que el tratamiento con un inhibidor de la gamma secretasa disminuye

significativamente el proceso de regeneración, sugiriendo que la vía de señalización de Notch actúa regulando la neurogénesis regenerativa de manera similar a lo demostrado para la neurogénesis homeostática en peces y mamíferos (Carlen *et al.*, 2009). Haciendo uso de los métodos de marcación *in vivo* de ADN, pudo encontrarse que las células regeneradas en el sitio de lesión expresan el marcador Tbr-1, lo que sugiere la adopción de un fenotipo neuronal glutamatérgico por parte de las células regeneradas (Kroehne *et al.*, 2011). A nivel mecanístico, se observó que la inflamación disparada en respuesta a una injuria cerebral, activa programas moleculares que resultan permisivos y necesarios para llevar a cabo la regeneración de tejido neural (Kishimoto *et al.*, 2012). Mediante inyección cerebroventricular de partículas inmunogénicas y ensayos de inmunosupresión Kyritsis y colaboradores (Kyritsis *et al.*, 2012), demostraron que el proceso inflamatorio regulado por el sistema inmunológico es necesario y suficiente para estimular la proliferación de los progenitores neuronales en el telencéfalo. De esta manera establecieron que la inflamación, producto de una injuria cerebral experimental, dispara una cascada de eventos y señales que activan programas moleculares que conducen a la proliferación y reparación del tejido siendo capaces de llevar a cabo la regeneración del tejido neural.

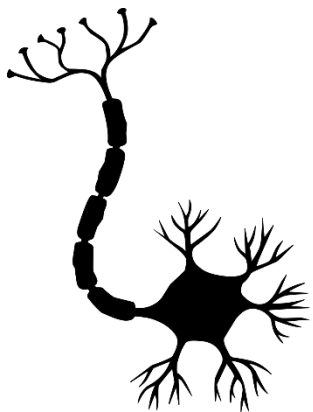
Una serie de estudios realizados en teleósteos, han identificado un conjunto de moléculas relacionadas con la función regenerativa del SNC. Entre estas moléculas se encuentran el estradiol, sintetizado por progenitores neurales (Diotel *et al.*, 2013; Mouriec *et al.*, 2008) ciertos quimiotractantes como Cxcr-4, Cxcr-5 y Cxcl-12 que fueron descritos en progenitores neurales del cerebro adulto (Diotel *et al.*, 2010; Kizil

et al., 2012) y el neuropéptido somatostatina, cuya expresión incrementa espacio-temporalmente de manera específica en las regiones cerebrales lesionadas y regeneradas (Clint y Zupanc 2003). Estos estudios indican que existen factores endógenos que actúan como moduladores del proceso regenerativo.

También se han investigado los procesos y vías metabólicas involucradas en el proceso de regeneración celular (Kishimoto *et al.*, 2012; Kyristis *et al.*, 2012; Kyristis *et al.*, 2012).

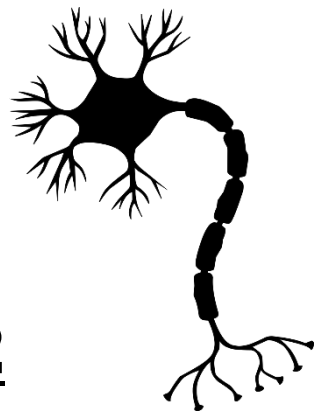
Como se ha expuesto anteriormente, la regeneración neuronal ha sido ampliamente estudiada en el pez cebra, desde sus bases moleculares hasta una escala anatómica, pero poco se ha investigado su modulación. Se sabe que la actividad de las células madre neuronales puede verse modificada por el ambiente y por estímulos sensoriales. Se ha encontrado que diferentes estímulos ambientales como el ejercicio o la alimentación podrían incrementar la activación de las) células madre neurales quiescentes (NSCs (Lindsey *et al.*, 2014a; Lindsey *et al.*, 2014b).

Los hallazgos presentados en el primer capítulo de esta tesis indican que el ambiente influye en la proliferación celular en el telencéfalo y la neurogénesis adulta. Teniendo en cuenta que la regeneración neuronal y la neurogénesis podrían compartir mecanismos, resultaría interesante investigar cómo el ambiente puede modular el proceso de regeneración. Indagar en estos aspectos podría proporcionar información sobre la existencia de bases mecánicas comunes entre la neurogénesis adulta y la regeneración neuronal.



CAPÍTULO 2

Objetivos específicos



Objetivos específicos

2.1) Lesión en la región dorso-medial (Dm) del telencéfalo de *D. rerio* Lesionar y realizar el seguimiento temporal de los procesos de proliferación y regeneración neuronal.

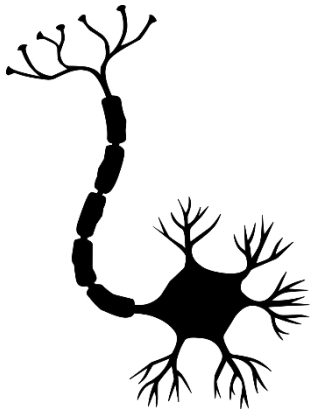
2.1. a) Desarrollar un protocolo para lesionar de forma reproducible la región Dm de telencéfalo de *D. rerio*.

2.1. b) Evaluar la recomposición tisular en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*. Caracterizar temporalmente la respuesta proliferativa iniciada luego de efectuada una lesión en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*.

2.2) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*: Evaluar la susceptibilidad del proceso de regeneración neuronal a factores ambientales y sociales.

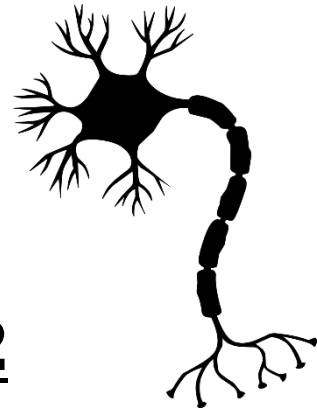
2.2.a) Evaluar si el entorno influye en la actividad proliferativa del telencéfalo de *D. rerio* post lesión en la región Dm.

2.2.b) Estudiar la neurogénesis regenerativa en peces expuestos a diferentes condiciones ambientales y sociales.



CAPÍTULO 2

Materiales y métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

2.1) Metodología general para el trabajo con *Danio rerio* (pez cebra)

2.1.a) Modelo experimental: *Danio rerio* (pez cebra)

Se utilizaron ejemplares de *Danio rerio* (pez cebra) criados en el laboratorio de Investigaciones Biomédicas del departamento de Física Médica, Centro Atómico Bariloche donde fue desarrollada esta tesis. Se utilizaron individuos adultos de entre 8 y 10 meses de edad cuyo peso corporal promedio fue de 425 mg. Los peces fueron criados bajo condiciones constantes de temperatura (26°C), pH (7,4), con un fotoperiodo controlado (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) y alimentados 3 veces al día. Trabajar con organismos criados en condiciones controladas otorga a los ensayos experimentales altos márgenes de reproducibilidad. Por su parte, *D. rerio* (pez cebra) es un excelente modelo experimental dado que por habitar temperaturas templado-cálidas (26-28 °C), su fisiología y metabolismo son sumamente activos. Entre otras ventajas que presenta la utilización de pez cebra como modelo experimental se encuentran: su pequeño tamaño, facilidad de cría, amplia disponibilidad de bibliografía de investigaciones realizadas en fisiología y comportamiento con protocolos para experimentación.

2.1.b) Protocolo de sacrificio de ejemplares experimentales, disección del cerebro, fijación y preparación del tejido para inmunohistoquímica

Para ser sacrificados, los peces fueron anestesiados profundamente de forma individual transfiriéndolos a una solución de tricaina metanosulfato al 0,2 % p/v,

preparada con agua de los acuarios de origen de los ejemplares experimentales (MS222, Sigma). Una vez profundamente anestesiados, los individuos fueron transferidos a una solución de buffer fosfato salino (PBS 10 mM) con temperatura cercana a 0°C donde los individuos fueron decapitados. Las cabezas de los individuos sacrificados se incubaron 3 minutos en la solución de PBS a temperatura ambiente. Esta incubación se realizó para que los glóbulos rojos se extruyeran de los capilares del cerebro y así disminuir la autofluorescencia del tejido. Los cerebros fueron extraídos y, para evitar la degradación biológica del tejido y conservar su integridad, se los sumergió en 15 ml de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (preparado en buffer fosfato salino) a 4 °C durante 24 hs. Luego de la fijación del tejido con PFA, los cerebros fueron lavados en una solución de buffer fosfato salino (PBS 10 mM) durante 5 minutos. Finalmente, para poder criopreservar el tejido, los cerebros fueron deshidratados sumergiéndolos por 48 hs. a 4 °C en una solución de sacarosa al 30% preparada en PBS. Finalmente, para su congelación cada cerebro fue embebido en un medio de montaje específico para criopreservación de tejido a -20 °C (OCT). Para congelar el tejido embebido en el medio de montaje se utilizó nitrógeno líquido (-195,8°C), posibilitando una congelación rápida, fundamental para conservar la integridad del tejido porque minimiza el tamaño de los cristales formados en la congelación. El tejido fue conservado en un freezer a -20°C para su posterior utilización en inmunofluorescencias. El tejido congelado fue cortado utilizando un criostato (Microm, HM 550) a una temperatura de entre -16°C y - 20°C. Se cortaron secciones coronales del telencéfalo de 20 um de espesor que fueron dispuestas

en portaobjetos cargados positivamente y conservadas en un freezer a -20°C para su posterior utilización en ensayos de inmunofluorescencia.

2.1.c) Inmunofluorescencias

Las inmunofluorescencias fueron realizadas sobre las secciones coronales de 20 μm anteriormente mencionadas. Todas las inmunofluorescencias se realizaron siguiendo el mismo protocolo general, no obstante, en función del marcador de interés se usaron diferentes anticuerpos primarios y entonces fue necesario ajustar el protocolo general de inmunofluorescencias según las propiedades de los anticuerpos utilizados. Las modificaciones serán especificadas oportunamente.

Protocolo general de inmunofluorescencia:

- 1) 3 lavados de 5 minutos en buffer tris salino (TBS) 1X, $\text{pH}=7.4$, con agitación a temperatura ambiente (T amb.).
- 2) Incubación de 20 minutos en cloruro de amonio 100 mM con agitación a T amb.
- 3) 3 lavados de 5 minutos en 0.3%-TritonX-100 TBS 1X con agitación a T amb.
- 4) Incubación de 30 minutos en HCl 2N a 37°C .
- 5) Incubación de 10 minutos (para neutralización del HCl 2N) en buffer borato 0.1M ($\text{pH}=8.5$) en agitación a T amb.
- 6) Incubación de 60 minutos en solución de bloqueo (6% seroalbúmina bovina, 6% suero normal de cabra en 0.3%-TritonX-100 TBS 1X) con agitación a T amb.
- 7) Incubación de 24 hs con anticuerpos primarios a 4°C . (cuya concentración será indicada en cada caso) preparados en solución de bloqueo o suero de cabra.
- 8) 4 lavados de 5 minutos en TBS 0.3%-Triton X-100 1X a T amb.

- 9) Incubación de 120 minutos con anticuerpos secundarios preparados en solución de bloqueo en concentración 1:500 con agitación a T amb.
- 10) 3 lavados de 5 minutos en TBS 0.3%-TritonX-100 1X con agitación a T amb.
- 11) Montaje con Fluorescence Mounting Medium (Abcam).

Se realizaron inmunofluorescencias para la detección de uno o dos de los siguientes marcadores:

- **Neurotrace:** Tinción de los cuerpos de Nissl, que se componen de ARN ribosómico asociado al retículo endoplasmático rugoso y son muy abundantes en las neuronas.
- **PCNA:** Marcador celular endógeno, que implica un antígeno nuclear presente en células que se encuentran en proliferación. Es una proteína que se sintetiza durante las fases G1 y S del ciclo celular y se ubica en el núcleo celular.
- **BrdU:** La bromodeoxiuridina es un análogo de la timidina que una vez suministrado se incorpora al ADN de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. Si este trazador exógeno se combina con marcadores neuronales endógenos, puede demostrarse la formación de nuevas neuronas.
- **HuCD:** Es un marcador neuronal endógeno, se compone de proteínas unidas ARN y se ubica en el citoplasma de las neuronas.

Para detectar el marcador de interés se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios según correspondiera:

- **PCNA** anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA 1:300 (PC10, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- **BrdU** anticuerpo monoclonal de rata anti-BrdU 1:500 (ab6326, Abcam)

- *HuCD*: Anti-HuC/HuD 1:500 (ab210554, ABCAM) hecho en conejo

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios en una dilución 1:500 preparados en suero de burro. Todos son anticuerpos policlonales

- anti-Rata IgG Alexa Fluor 488 (ab150165, Abcam).
- anti-Ratón IgG Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam).
- anti-Ratón IgG Alexa Fluor 594 (ab150120, Abcam).

2.1.d) Análisis de Imágenes

La cuantificación de los marcadores de interés se realizó mediante imágenes obtenidas con un microscopio de epifluorescencia Nikon (Eclipse e800) equipado con una cámara CCD (Leica DC350, FX). Para la co-localización de marcadores como el BrdU y HuCD, se utilizaron imágenes obtenidas en un microscopio de excitación de dos fotones, ensamblado en el Laboratorio de Fotónica y Optoelectrónica del Centro Atómico Bariloche (CNEA). El análisis de las imágenes fue realizado con el software ImageJ. Se utilizaron entre 3 y 4 secciones de 20 um de espesor de cada telencéfalo analizado teniendo en cuenta que se encuentren sobre o adyacentes al sitio de lesión. Se cuantificaron los distintos marcadores tanto en el hemisferio lesionado como en el contralateral y tomando como referencia la regionalización telencefálica propuesta por Wulliman 1996 y por Ganz et. al, 2014. Las cuantificaciones y análisis se realizaron en las siguientes áreas del pallium telencefálico: Vd, Dm, Dd, y DI y Dp.

2.1.c) Análisis estadísticos

Los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 8 y el software Sigma Plot 11. Según la distribución estadística de los datos se calcularon y graficaron la media o mediana, y se consideró el error estándar. Para las comparaciones de datos se realizaron pruebas t-student de dos colas o ANOVA de una y dos vías para muestras repetidas. En el caso de las comparaciones múltiples se utilizó como prueba a posteriori la prueba de Holm-Sidak. Con los datos que no se distribuían de forma estadísticamente normal, se utilizaron los tests no paramétrico correspondientes. En todos los tests estadísticos se consideró un intervalo de confianza del 95% en ambos extremos de la distribución de los datos.

2.2) Lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm)

Si bien existen numerosos protocolos de lesión telencefálica desarrollados para utilizar en pez cebra (Kishimoto *et al.*, 2011; Kyristis *et al.*, 2012; Diotel *et al.*, 2013; Skaggs *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2014), ningún trabajo hasta la fecha desarrolló un protocolo estandarizado de lesión, que sea reproducible, involucre siempre la misma región telencefálica y minimice los daños colaterales en otras regiones del telencéfalo. En esta tesis se desarrolló un protocolo de lesión mecánica de la región dorsomedial (Dm) del telencéfalo, basado en el protocolo de lesión planteado por Diotel *et al.*, 2013 y Schmidt *et al.*, 2014 adaptándolo para direccionar la lesión a la región Dm.

Como se mencionó anteriormente, pueden utilizarse diferentes métodos para efectuar una lesión experimental en el telencéfalo del pez cebra, los métodos más utilizados para realizar lesiones en el tejido cerebral son las lesiones mecánicas (Schmidt *et al.*, 2014; Kishimoto *et al.*, 2012) y las lesiones excitotóxicas (Skaggs *et al.*, 2014).

Para efectuar la cirugía los peces fueron profundamente anestesiados con Tricaina al 3% (0,15 mg/MI) (Sigma) preparada en agua proveniente de los acuarios de origen de los ejemplares experimentales. Los peces fueron extraídos de sus peceras individualmente, con movimientos suaves utilizando una red especial para peces y transferidos a la anestesia. Los peces fueron anestesiados para minimizar el estrés generado por manipulación y mantenerlos inmóviles durante la cirugía, y para minimizar el estrés fisiológico los peces permanecieron fuera del agua 20 segundos cronometrados. La cirugía se realizó sobre una plataforma cóncava de gomaespuma, embebida en anestesia, para preservar la cubierta mucosa de los peces, que es una defensa fundamental ante infecciones. La plataforma cóncava tenía una cavidad hecha a medida para las dimensiones de *D. rerio* y fue cubierta con gasas estériles embebidas en agua con anestesia. Los peces anestesiados fueron retirados de la anestesia utilizando una cuchara acolchada con agua diseñada especialmente para trasladar a los peces, sin tocarlos, hasta la plataforma de cirugía descrita anteriormente. Los ejemplares fueron ubicados en posición de cúbito prono bajo el objetivo de una lupa binocular (Olympus). Utilizando el aumento de 10x de la lupa por transparencia de los huesos de la caja craneana se visualizaron las principales regiones cerebrales

localizándose el telencéfalo (Figura 2.1). En todos los ejemplares la región Dm se ubicó estableciendo dos líneas de referencia, la que marca el eje de simetría bilateral y una línea recta perpendicular al eje de simetría bilateral que une el centro de las pupilas (Figura 2.1). Las líneas de referencia facilitaron insertar la aguja en el mismo sitio del telencéfalo en todos los ejemplares. La lesión se efectuó con una aguja de 0,25 mm de diámetro (BD UltraFine 31G) cuyo largo fue reducido a 2 mm para evitar atravesar todo el telencéfalo en la cirugía. La profundidad de la lesión se determinó en función de la profundidad a la que se encuentra el telencéfalo descrita por Diotel *et al.*, 2013 en su protocolo de lesión.

La aguja se insertó verticalmente desde el exterior de la cabeza de forma perpendicular y dorsomedialmente en uno de los hemisferios a través del neurocráneo hasta llegar al telencéfalo. La aguja fue retirada y para la recuperación post-quirúrgica se trasladó a los individuos experimentales a un acuario con agua limpia y aireación constante durante al menos 24 horas. Se monitoreó la recuperación evaluando la respiración (tomando como referencia la frecuencia de las operculaciones), la locomoción y la respuesta al estímulo alimentario.

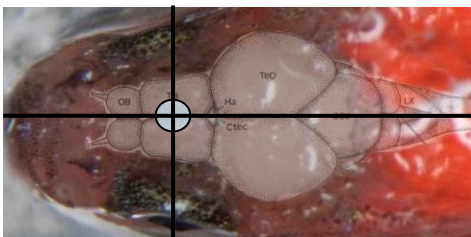


Figura 2.1: Cabeza y cerebro de pez cebra. Esquema en vista dorsal del cerebro del pez. El círculo blanco delimita la sección de la región Dm donde se efectuaron las lesiones.

2.2.a) Reproducibilidad del protocolo de lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm)

La reproductibilidad del protocolo de lesión desarrollado se evaluó midiendo la superficie lesionada en la región Dm en el telencéfalo en peces que fueron sacrificados 1 día post lesión (1 DPL). La superficie de la lesión se midió utilizando el software FIJI a partir de fotografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia en tejido al que se le realizó una tinción de cuerpos de Nissl.

2.2.b) Recomposición tisular en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*

La recomposición tisular se evaluó cuantificando la progresión de la regeneración del tejido cerebral en el tiempo, midiendo la superficie telencefálica que permanecía lesionada 1, 7 y 30 días post lesión.

Tanto para analizar la reproducibilidad de la lesión como la recomposición tisular, se utilizó una tinción con Neurotrace. Mediante esta tinción pudo ubicarse el sitio de la lesión y con un software de análisis de imágenes medir la superficie de la lesión en los puntos temporales propuestos.

2.2.c) Respuesta proliferativa a la lesión en la región dorso medial (Dm) del telencéfalo de *D. rerio*

En otro conjunto de experimentos, se evaluaron los niveles de proliferación celular en el telencéfalo al cabo de 1, 7 y 30 días luego de efectuada la lesión. Como medida de la proliferación se evaluó la expresión del marcador PCNA en el telencéfalo de *D. rerio*. Para la detección de los núcleos PCNA+ se llevaron a cabo

inmunofluorescencias según lo descrito anteriormente en el inciso **(2.1.c)** de la presente sección de este capítulo. La cuantificación de células PCNA + se realizó sobre fotografías obtenidas con un microscopio de epifluorescencia, y utilizando el complemento “Cell Counter” del software de análisis de imágenes ImageJ.

2.3) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*

Para evaluar la influencia del entorno sobre el proceso de regeneración neuronal se mantuvo a peces con el telencéfalo lesionado con el protocolo desarrollado en esta tesis, en acuarios con diferentes entornos. En función de trabajos previos (Kishimoto *et al.*, 2012, Kizil *et al.*, 2012) y de la caracterización de la respuesta proliferativa realizada en el inciso **(2.2.d)** de esta sección, 7 días después de efectuada la lesión, los grupos de progenitores del telencéfalo muestran una actividad mitótica marcadamente superior a la presente en condiciones homeostáticas. Conociendo el comportamiento de los progenitores luego de efectuada una lesión telencefálica, se quiso indagar qué consecuencias trae sobre la regeneración neuronal mantener a peces con el telencéfalo lesionado en condiciones de aislamiento social o en ambientes enriquecidos. Para evaluar los efectos del entorno en la regeneración neuronal se configuraron tres tipos de acuarios descritos a continuación (Figura 2.2):

- *Aislamiento social (AS)*: Acuarios pequeños individuales de 1,4 litros, dónde los peces estaban imposibilitados de interactuar con otros (ni siquiera de forma visual) y sin plantas, ni grava ni refugios.

- *Ambiente enriquecido (E)*: Acuarios de 6 litros compartidos por 6 peces donde se permitía la libre interacción entre individuos y los peces contaban con elementos como plantas, grava y refugios.
- *Condiciones control (C)*: Acuarios de 2,8 litros compartidos por 6 peces donde se permitía la libre interacción entre individuos, pero sin plantas, grava y refugios.



Figura 2.2: Acuarios experimentales para evaluación de la influencia del ambiente en la regeneración neuronal. Peces de condiciones control (C); Peces de aislamiento social (AS); Peces de ambiente enriquecido (E).

2.3.a) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*: Influencia del ambiente en la actividad proliferativa del telencéfalo de *D. rerio* post lesión en la región Dm.

La influencia del ambiente sobre la respuesta proliferativa post lesión en el telencéfalo de *D. rerio*, se evaluó manteniendo peces con el telencéfalo lesionado en acuarios de AS (n=6) y de E (n=6) durante 7 días, luego de este lapso de tiempo los individuos fueron sacrificados. Los peces fueron sacrificados, su cerebro extraído y el tejido procesado utilizando la metodología detallada en la

sección **(2.1)** de esta sección. Sobre el tejido proveniente de este experimento, se realizaron inmunofluorescencias para detección de PCNA siguiendo el protocolo descrito en la sección **(2.1.c)** de la presente sección. Finalmente, utilizando un microscopio de epifluorescencia se obtuvieron imágenes con las que se cuantificaron los núcleos PCNA+ utilizando el complemento “Cell counter” del software ImageJ.

2.3. b) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*: Destino y fenotipo adquirido por los progenitores activos en respuesta a una lesión telencefálica en peces bajo diferentes condiciones ambientales.

En otra serie de experimentos los peces con la región Dm del telencéfalo lesionada permanecieron en acuarios de AS (n=6), E(n=6) y C (n=6) durante 7 días y se les suministró un pulso de BrdU para marcar los progenitores activados como consecuencia de la lesión y poder determinar su destino cuando el tejido cerebral se encontrara completamente regenerado.

Según lo observado en la caracterización de la respuesta proliferativa post lesión telencefálica, en la sección **(2.2.d)** de este capítulo de la presente tesis), y como se indicó anteriormente, 7 días luego de efectuada la lesión, existe una alta actividad proliferativa en el telencéfalo. En este sentido, 7 días luego de efectuada la lesión resulta un momento ideal para marcar con BrdU los progenitores que se encuentren en división. La utilización de BrdU permite luego poder evaluar el destino y localización de los progenitores. La administración del BrdU a los peces

se realizó mediante un protocolo de inmersión que permite una incorporación homogénea del análogo de timidina.

Protocolo de administración de BrdU:

El BrdU se administró vía inmersión. Luego de haber sido lesionados y permanecer una semana en AS, E o C cada grupo de peces fue trasladado por 4 días a 3 acuarios especiales de 350 ml, distribuidos en una densidad de peces de 1 pez cada 50 ml de agua.

A continuación, se describe el protocolo de inmersión

Día 1) Inmersión de los peces durante 1 noche en solución 2,5 mM de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, ABCAM) con pH 6 – 7, preparada en agua de acuario.

Día 2) Recambio y descarte completo del agua con BrdU de los acuarios, seguido por recambios parciales de 50 ml de agua cada 2 horas. Debido a que el BrdU se metaboliza y excreta por las vías renales, es fundamental mantener la higiene y sanidad del agua del acuario.

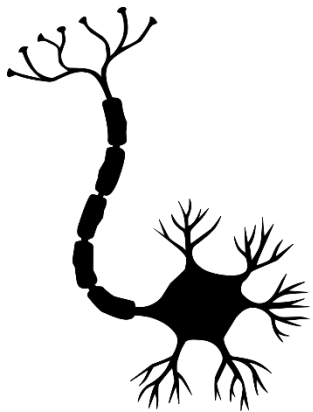
Día 3) Transferencia de los peces a acuarios aislados en menor densidad durante 1 día.

Día 4) Regreso de los peces a los acuarios experimentales de AS, E y C.

Luego de la inmersión en BrdU, los peces fueron devueltos a sus acuarios experimentales (AS; E y C) donde permanecieron durante 7 semanas. Finalmente, y luego de 8 semanas de haber sido lesionados, los peces fueron sacrificados y su tejido procesado utilizando los protocolos descritos en la sección **(2.1)** del presente capítulo de esta tesis.

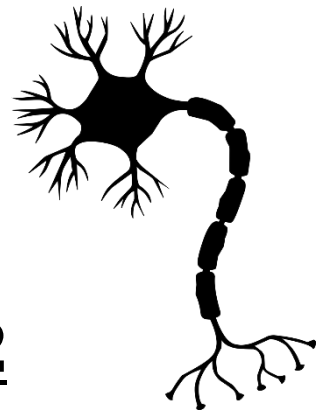
Sobre el tejido telencefálico de los peces de estos ensayos se realizaron inmunofluorescencias para la detección de dos marcadores: BrdU y HuCD siguiendo los protocolos descritos en la sección **(2.1.c)**. Para la visualización simultánea de estos marcadores en el tejido y la obtención de imágenes para poder realizar las cuantificaciones de los marcadores se utilizó un microscopio de excitación de dos fotones. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron reconstruidas con el software ImageJ, y las cuantificaciones de las células BrdU+ y HuCD+, se realizaron de forma manual utilizando el complemento “Cel Counter” del software ImageJ. En los conteos y análisis posteriores se consideraron las siguientes variables:

- **Número de nuevas células incorporadas 8 semanas post lesión (8 smnpl)**: Mediante la cuantificación de las células BrdU+.
- **Número de nuevas neuronas halladas 8 smnpl**: Mediante la cuantificación de las células que presentaban co-localización de BrdU y HuCD (las células que expresaron en simultáneo las marcas de BrdU y HuCD).
- **Porcentaje de nuevas células diferenciadas a neuronas 8 smnpl**: (calculado como el cociente entre las células BrdU+ y las células que fueron BrdU+ y HuCD+ simultáneamente).



CAPÍTULO 2

Resultados



RESULTADOS

2) Regeneración neuronal: *Danio rerio*

2.2) Lesión en la región dorso-medial (Dm) del telencéfalo de *D. rerio*

2.2.a) Puesta a punto del protocolo de lesión en región dorso medial del telencéfalo (Dm)

Para determinar la reproducibilidad del protocolo de lesión desarrollado se evaluó el impacto de la lesión en el telencéfalo en varios individuos lesionados simultáneamente, y se analizaron las siguientes variables: estado general de los individuos post cirugía (operculaciones, movilidad y apetito), ubicación antero-posterior de la lesión y superficie lesionada en cada individuo.

El 100% de los individuos lesionados sobrevivió a la cirugía, y no manifestó disfunciones locomotoras ni comportamentales post quirúrgicas. Se logró lesionar una superficie de $85,33 \pm 2,27 \text{ um}^2$ (n=8) de la región Dm y permaneciendo sin daño una superficie de $251,92 \pm 6,177 \text{ um}^2$ (n=8).

2.2.b) Recomposición tisular en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*

Para analizar el curso temporal de la regeneración tisular luego de efectuada la lesión se midió la superficie lesionada 1, 7 y 30 días luego de efectuada la lesión en secciones de telencéfalo. Se realizó sobre el tejido una tinción fluorescente de los cuerpos de Nissl, se obtuvieron fotografías y se midió en cada sección la superficie de la lesión.

Luego de 7 días de efectuada la cirugía, la superficie de la lesión ($\bar{X}=17,34 \pm 0,753 \text{ um}^2$; N=8) fue significativamente menor que la superficie de la lesión 1 DPL (Test de Mann Whitney U=0; T = 84.000, $p < 0,001$; Figura 2.3). Mientras que 30 días post lesión (30 DPL) la superficie de la lesión ($\bar{X} = 4,71 \pm 0,862 \text{ um}^2$) fue significativamente menor a la superficie de lesión 7 DPL ($t_{(10)}=33,19$, $p < 0,001$; Figura 2.3).

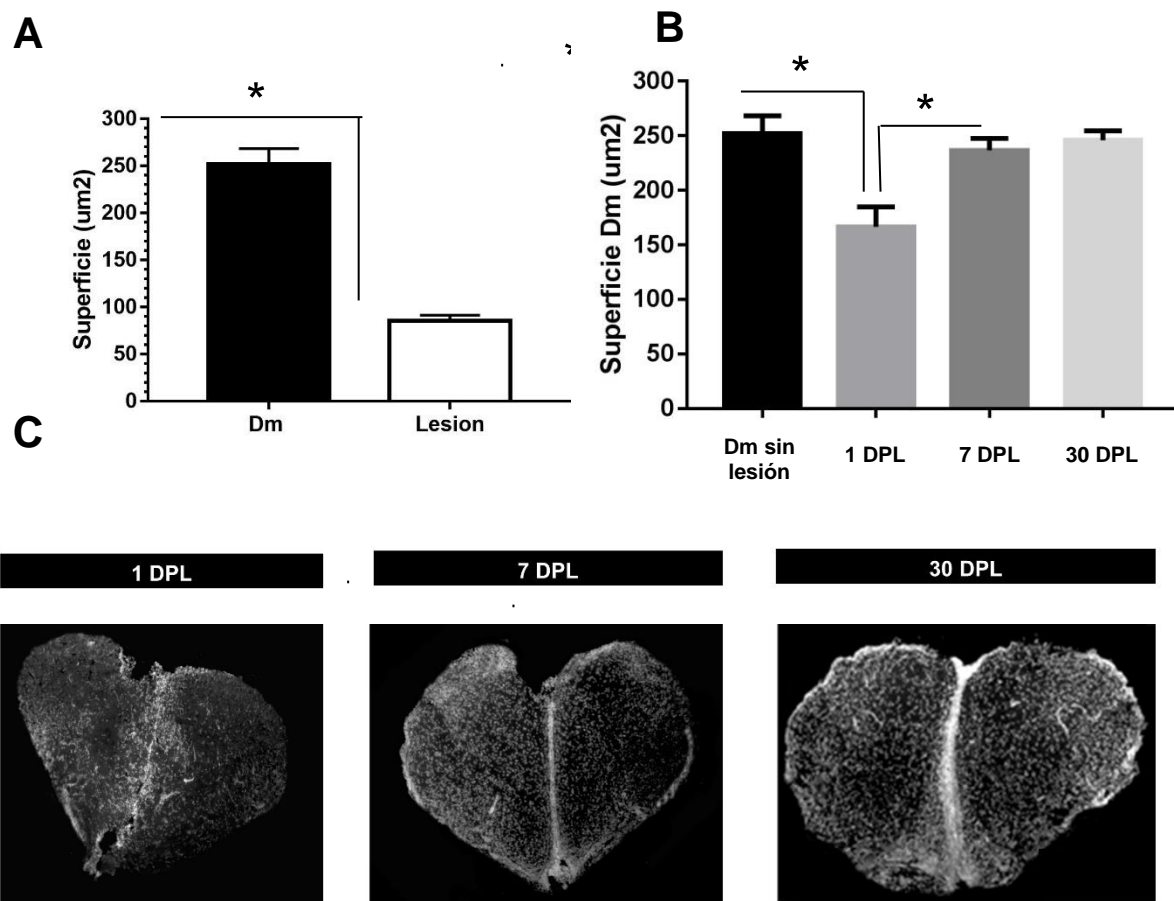


Figura 2.3: Superficie lesionada y progresión de la regeneración en el Dm telencefálico de pez cebra. **Panel A:** Comparación entre la superficie total de la región Dm del telencefalo ($251,92 \pm 6,177 \text{ um}^2$) y de la superficie lesionada en el telencefalo ($85,33 \pm 2,27 \text{ um}^2$) de pez cebra expresada en um^2 . **Panel B:** Evolución temporal de la recomposición tisular en el Dm 1, 7 y 30 DPL. 7 días luego de la cirugía, la superficie de la lesión ($\bar{X}=17,34 \pm 0,753 \text{ um}^2$; N=8) fue significativamente menor que la superficie de la lesión 1 DPL (Test de Mann Whitney U=0; T = 84.000, $p < 0,001$). Mientras que 30 días post lesión (30 DPL) la superficie de la lesión ($\bar{X} = 4,71 \pm 0,862 \text{ um}^2$) fue significativamente menor a la superficie de lesión 7DPL ($t_{(10)}=33,19$, $p < 0,001$). **Panel C:** Fotos representativas de secciones transversales de telencefalo marcadas con una tinción de cuerpos de Nissl (Neurotrace), mostrando el tamaño de la lesión 1DPL, 7 DPL y 30 DPL (no están a escala).

2.2.c) Respuesta proliferativa gatillada por la lesión en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*

Para evaluar los efectos de la lesión sobre la proliferación celular en la región Dm del telencéfalo del pez cebra se evaluó el curso temporal de la respuesta proliferativa cuantificando los núcleos PCNA+ en diferentes regiones telencefálicas. En la Tabla 2.1 y la Figura 2.4 se resumen los resultados de los conteos de células PCNA + encontradas en el hemisferio lesionado y en el hemisferio contralateral 1 DPL, 7 DPL y 30 DPL. También se indican los resultados de las comparaciones estadísticas entre los niveles de proliferación de los dos hemisferios.

Al considerar solo los hemisferios lesionados, se encontraron diferencias significativas en la cantidad de células PCNA+ entre todos los puntos temporales considerados (ANOVA de una vía $F_{(2)} = 1373,622$, $p < 0,001$; Análisis a posteriori: Prueba de Holm Sidak para comparaciones múltiples 1 DPL vs. 7 DPL: $t=26,78$; para 1 DPL vs. 30 DPL: $t=25,703$; para 7 DPL vs. 30 DPL: $t= 52,411$. Para todas las comparaciones $p < 0,001$), con un * se indican las diferencias significativas. (Figura 2.4).

	Células PCNA + por sección de 20 um Hemisferio contralateral ($\bar{X} \pm SD$)	Células PCNA + por sección de 20 um Hemisferio lesionado ($\bar{X} \pm SD$)
Control (sin lesión)	29 ± 2,16	28,75 ± 1,89
1 DPL	65,00 ± 5,5	120,75 ± 4,79 (*)
7 DPL	90,25 ± 7,76	213,75 ± 5,85 (*)
30 DPL	31,05 ± 3,95	31,25 ± 2,5

Tabla 2.1. Proliferación celular (medida con PCNA) en respuesta al daño en el Dm del telencéfalo de pez cebra. Los núcleos PCNA fueron cuantificados en 3 secciones de telencéfalo de 20 um por cada individuo experimental. El (*) denota diferencias significativas de los niveles de proliferación entre los dos hemisferios cerebrales (Prueba t pareada: Para 1DPL $t_{(6)} = -15,33$, $p < 0,001$. Para 7 DPL $t_{(6)} = -25,4$, $p < 0,001$; N = 8).

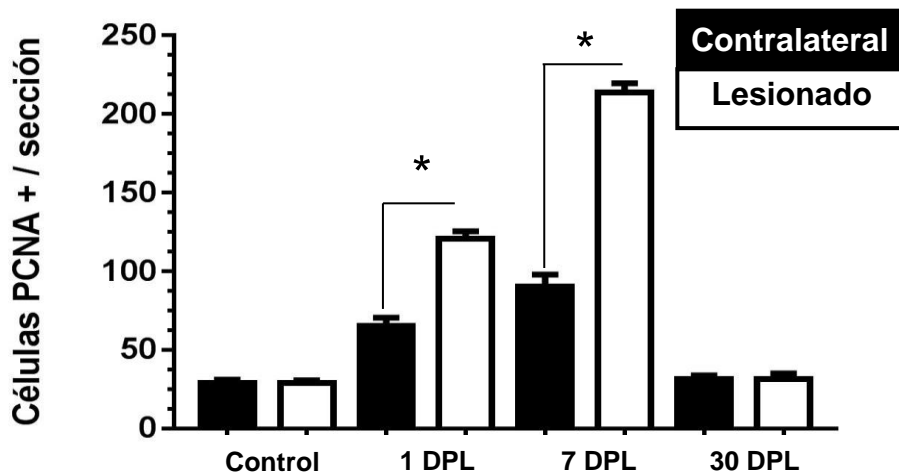


Figura 2.4: Proliferación celular disparada por el daño en el telencéfalo de pez cebra. Panel A: Comparación entre la cantidad de células PCNA+ de ambos hemisferios telencefálicos 1 DPL, 7 DPL y 30 DPL. (Prueba t pareada: Para 1DPL $t_{(6)} = -15,33$, $p < 0,001$. Para 7 DPL $t_{(6)} = -25,4$, $p < 0,001$; N = 8).

2.3) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*

2.3.a) Influencia del ambiente en la actividad proliferativa del telencéfalo de *D. rerio* post lesión en la región Dm

Para evaluar la influencia del entorno sobre la respuesta proliferativa asociada a la lesión se distribuyó a peces con el telencéfalo lesionado en acuarios con 3 tipos de condiciones ambientales: aislamiento social (AS), ambiente enriquecido (AE) y condiciones control (C). Luego de 7 días de permanecer en estos acuarios los individuos fueron sacrificados y se cuantificaron los niveles de proliferación celular.

Mediante la detección y conteo células PCNA+ (antígeno de proliferación celular), se evaluó la proliferación celular en la región Dm del telencéfalo de peces con la región Dm lesionada y mantenidos en las tres condiciones experimentales: aislamiento social (AS), ambiente enriquecido (AE) y el grupo control (C). En todos los casos, sin importar el ambiente en el que permanecieron los peces, el hemisferio lesionado presentó niveles de proliferación significativamente mayores a los del hemisferio contralateral (Tabla 2.2; para todas las comparaciones se realizó una prueba t-pareada; grupo AS $t_{5;6} = -4,332$; grupo AE $t_{5;6} = -20,769$; grupo C $t_{2;5} = -4,311$; para todas las comparaciones $p < 0,05$).

En la tabla 2.2 se resumen los niveles de proliferación hallados en las diferentes regiones telencefálicas y los resultados de las comparaciones entre los peces que permanecieron en condiciones (C), (AS) y (AE). Siete días luego de

efectuada la lesión, los individuos que permanecieron en condiciones de AE son los que mayores niveles de proliferación presentaron en todas las regiones a excepción de la región Dd (Tabla 2.2). Considerando la región Dm del hemisferio lesionado, esta fue la que presentó mayores niveles de proliferación independientemente del ambiente en el que permanecieron los individuos (ANOVA de una vía: $F_2 = 61,59$; $p < 0,001$; Prueba a posteriori de Holm Sidak: $t_{AE \text{ vs. } C} = 7,83$; $p < 0,001$; $t_{AE \text{ vs. } AS} = 10,378$). Al considerar todo el telencéfalo, se hallaron diferencias significativas entre los niveles de proliferación celular (número de células PCNA+) de los peces que permanecieron en los acuarios de AS, AE, y C (Análisis de varianza de Kruskal Wallis: $H_{2} = 12,150$; $p < 0,001$). Los niveles de proliferación, fueron significativamente menores en los peces que permanecieron en AS respecto a los que permanecieron en condiciones de AE y C (Prueba a posteriori: Método de Dunn: $Q=3,77$; $p<0,05$; Figura 2.6).

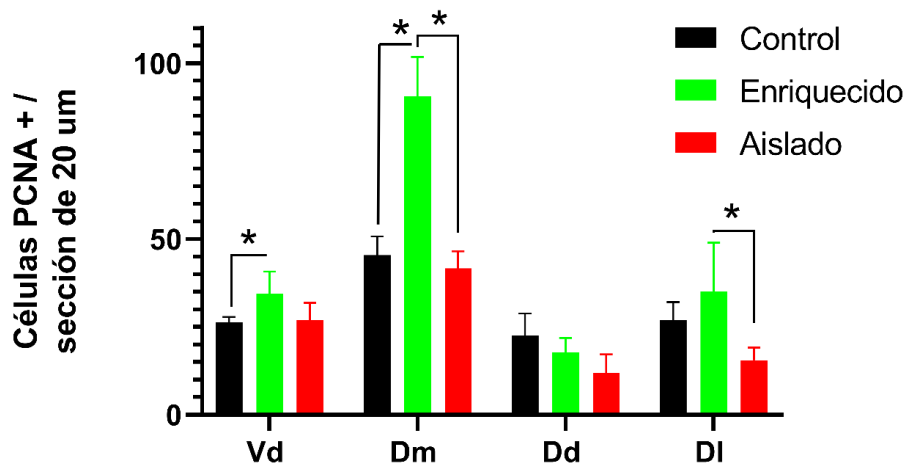


Figura 2.6. Proliferación celular en las diferentes regiones del hemisferio lesionado de *D.rerio* 7 DPLen peces que permanecieron en aislamiento social (barras rojas), ambiente enriquecido (barras verdes) y condiciones control (barras negras). Considerando la región Dm del hemisferio lesionado, esta fue la que presentó mayores niveles de proliferación independientemente del ambiente en el que permanecieron los individuos (ANOVA de una vía: $F_2 = 61,59$; $p < 0,001$; Prueba a posteriori de Holm Sidak: AE vs. C $t = 7,83$; $p < 0,001$; AE vs. AS $t = 10,378$). Al considerar todo el telencéfalo, se hallaron diferencias significativas entre los niveles de proliferación celular (número de células PCNA+) de los peces que permanecieron en los acuarios de AS, AE, y C (Análisis de varianza de Kruskal Wallis: $H_{2} = 12,150$; $p < 0,001$). Los niveles de proliferación, fueron significativamente menores en los peces que permanecieron en AS respecto a los que permanecieron en condiciones de AE y C (Prueba a posteriori: Método de Dunn: $Q=3,77$; $p<0,05$). En todos los casos $N = 5$.

	Control ($\bar{X} \pm SD$)		Ambiente enriquecido ($\bar{X} \pm SD$)		Aislamiento social ($\bar{X} \pm SD$)	
Región	Hemisferio lesionado	Hemisferio contralateral	Hemisferio lesionado	Hemisferio contralateral	Hemisferio lesionado	Hemisferio contralateral
Vd	25,967 ± 1,227	19,633± 1,416	34,556 ± 6,177 (*)(**)	23,694 ± 5,226	26,889 ± 4,965*	15,722 ± 5,567
Dm	45,233 ± 3,8	28,5± 2,828	90,639 ± 11,172 (*)(**)	37,167 ± 10,382	41,667± 4,899	25,056 ± 5,039
Dd	22,533 ± 4,426	9,1± 0,548	17,722 ± 4,176 (*)(**)	8,278 ± 2,611	12 ± 5,173	9,556 ± 3,284
DI	27,8 ± 3,818	17,6± 3,525	35,056 ± 13,905 (*)(**)	15,806 ± 8,432	15,5 ± 3,644	10,611± 6,27
Total hemisferio	121,53 ± 6,5	74,83 ± 7,42	177,98 ± 25,73 (*)(**)	84,94 ± 20,54	96,06 ± 13,45	60,95 ± 15,5
Total telencéfalo	196,37 ± 3,38		262,91 ± 45,26 (**)		157 ± 21,15	

Tabla 2.2 Respuesta proliferativa medida 7 días luego de efectuada la lesión en diferentes regiones del telencéfalo de pez cebra. Todas las comparaciones se realizaron mediante pruebas t-pareadas; grupo AS $t_{5,6} = -4,332$; grupo AE $t_{5,6} = -20,769$; grupo C $t_{2,5} = -4,311$; para todas las comparaciones $p < 0,05$. Un (*) denota diferencias significativas entre hemisferios ($n = 5$), dos (**) denotan diferencias significativas entre condiciones experimentales.

2.3. b) Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*:

Para determinar el curso de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo se realizaron lesiones experimentales y 7 días luego de efectuada la lesión se suministró a los peces un pulso de BrdU y se mantuvo a los peces lesionados en condiciones C, AS o AE según correspondiera. Luego de 7 semanas se evaluaron sobre tejido regenerado las siguientes variables:

- Número de células BrdU+,
- Número de células que expresaron simultáneamente el marcador BrdU y HuCD
- Porcentaje de células nuevas que expresaron el marcador HuCD.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.3.

Luego de 8 semanas, solo se encontraron células BrdU + en la región Dm del hemisferio lesionado del telencéfalo, indistintamente de las condiciones en las que habían permanecido los peces. Analizando solo el hemisferio lesionado se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de células BrdU+ incorporadas en la región Dm de los peces que permanecieron en AS, E y C (ANOVA de muestras repetidas $F_{2;4} = 11,57$, $p < 0,005$; Figura 2.7). En los peces que permanecieron en AE la cantidad de células BrdU+ en la región Dm del telencéfalo fue significativamente mayor a la cantidad de células BrdU+ cuantificadas en el telencéfalo de peces que permanecieron en AS y C (Prueba de Holm Sidak $t_{AE \text{ vs } AS} = 4,626$; $p < 0,001$; $t_{AE \text{ vs } C} = 3,456$; $p < 0,01$).

Se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de células que expresaron simultáneamente los marcadores BrdU+ y HuCD+ en la región Dm del

telencéfalo de los peces mantenidos en AS, AE y C (ANOVA de una vía para muestras repetidas, $F_{11; 5} = 6,95$; $p < 0,01$; Figura 2.7). En los peces que fueron mantenidos en AS, la expresión de BrdU+ y HuCD+ fue significativamente menor a la cuantificada en el telencéfalo de los que permanecieron en AE y C, (Prueba de Holm Sidak para comparaciones múltiples $t_{C \text{ vs. AS}} = 3,45$; $t_{AE \text{ vs. AS}} = 3,713$; $p < 0,05$; Figura 2.7).

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células que se diferenciaron a neurona entre los individuos de los grupos AE y C y no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de nuevas células que se diferenciaron a neuronas en la región Dm de los peces que permanecieron en AS y en AE. (Prueba de Kruskal Wallis $H_{2; 4} = 7,420$; $p < 0,05$). Finalmente, en los peces que permanecieron en condiciones AE la diferenciación a neuronas en el telencéfalo fue significativamente mayor a la observada en los peces que se encontraban en condiciones C (Prueba de Tukey para comparaciones múltiples AE vs. C: $q_{2; 4} = 3,398$; $p < 0,05$, Figura 2.7).

Adicionalmente, en todos los grupos (AS, AE, C) hubo incorporación de nuevas células en la región Dm del hemisferio contralateral (sin lesionar). Aunque en todos los casos, en cantidades significativamente menores a las observadas en el hemisferio lesionado para AS (Prueba t: $t_{6; 4} = 5,668$; $p < 0,05$), AE (Prueba de Mann Whitney, $T_4 = 26$; $p < 0,05$), C (Prueba t, $t_{6; 4} = 6,208$; $p < 0,05$). En el hemisferio contralateral el porcentaje de colocación de marcadores (BrdU+ y HuCD+) fue similar entre todos los grupos de peces (Tabla 3).

	Control ($\bar{X} \pm SD$)		Ambiente enriquecido ($\bar{X} \pm SD$)		Aislamiento social ($\bar{X} \pm SD$)	
	Hemisferio lesionado	Hemisferio contralateral	Hemisferio lesionado	Hemisferio contralateral	Hemisferio lesionado	Hemisferio contralateral
Células BrdU⁺	21,33 ± 3,14 (*)	11,5 ± 0,43	23,65 ± 3,6 (*)(**)	14,35 ± 4,5	14,5 ± 0,79 (*)	9,71 ± 1,5
Células BrdU⁺/H uCD⁺	11,75 ± 1,77	7,58 ± 1,32	15,14 ± 3,38 (*)(**)	8,9 ± 4,43	9,25 ± 0,73 (*)	5,88 ± 0,5
% de células HuCD	55,08 ± 1,42	65,93 ± 11,04	63,64 ± 5,57 (*)(**)	11,5 ± 0,43	63,78 ± 3,6	61,11

Tabla 2.3. Células BrdU⁺ y HuCD⁺ en el telencéfalo de peces 8 SPL que permanecieron en AS, AE y C. Por cada individuo experimental se promediaron según corresponda los núcleos BrdU⁺ y HuCD, presentes en 3 secciones de 20 μ m de telencéfalo. Un (*) denota diferencias significativas entre hemisferios, dos (**) denotan diferencias significativas entre condiciones experimentales. (n = 5). Cantidad de células BrdU⁺ incorporadas en la región Dm de los peces que permanecieron en AS, E y C (ANOVA de muestras repetidas $F_{2,4} = 11,57$, $p < 0,005$; Prueba de Holm Sidak $t_{AE vs AS} = 4,626$; $p < 0,001$; $t_{AE vs C} = 3,456$; $p < 0,01$). Células que expresaron simultáneamente los marcadores BrdU⁺ y HuCD⁺ en la región Dm del telencéfalo de los peces mantenidos en AS, AE y C (ANOVA de una vía para muestras repetidas, $F_{11;5} = 6,95$; $p < 0,01$; Prueba de Holm Sidak para comparaciones múltiples $t_{C vs AS} = 3,45$; $t_{AE vs AS} = 3,713$; $p < 0,05$). Porcentaje de células que se diferenciaron a neurona entre los individuos de los grupos AE y C en la región Dm de los peces que permanecieron en AS y en AE. (Prueba de Kruskal Wallis $H_{2;4} = 7,420$; $p < 0,05$). En los peces que permanecieron en condiciones AE la diferenciación a neuronas fue significativamente mayor a la observada en los peces que se encontraban en condiciones C (Prueba de Tukey para comparaciones múltiples AE vs. C: $q_{2;4} = 3,398$; $p < 0,05$). En todos los casos n = 5.

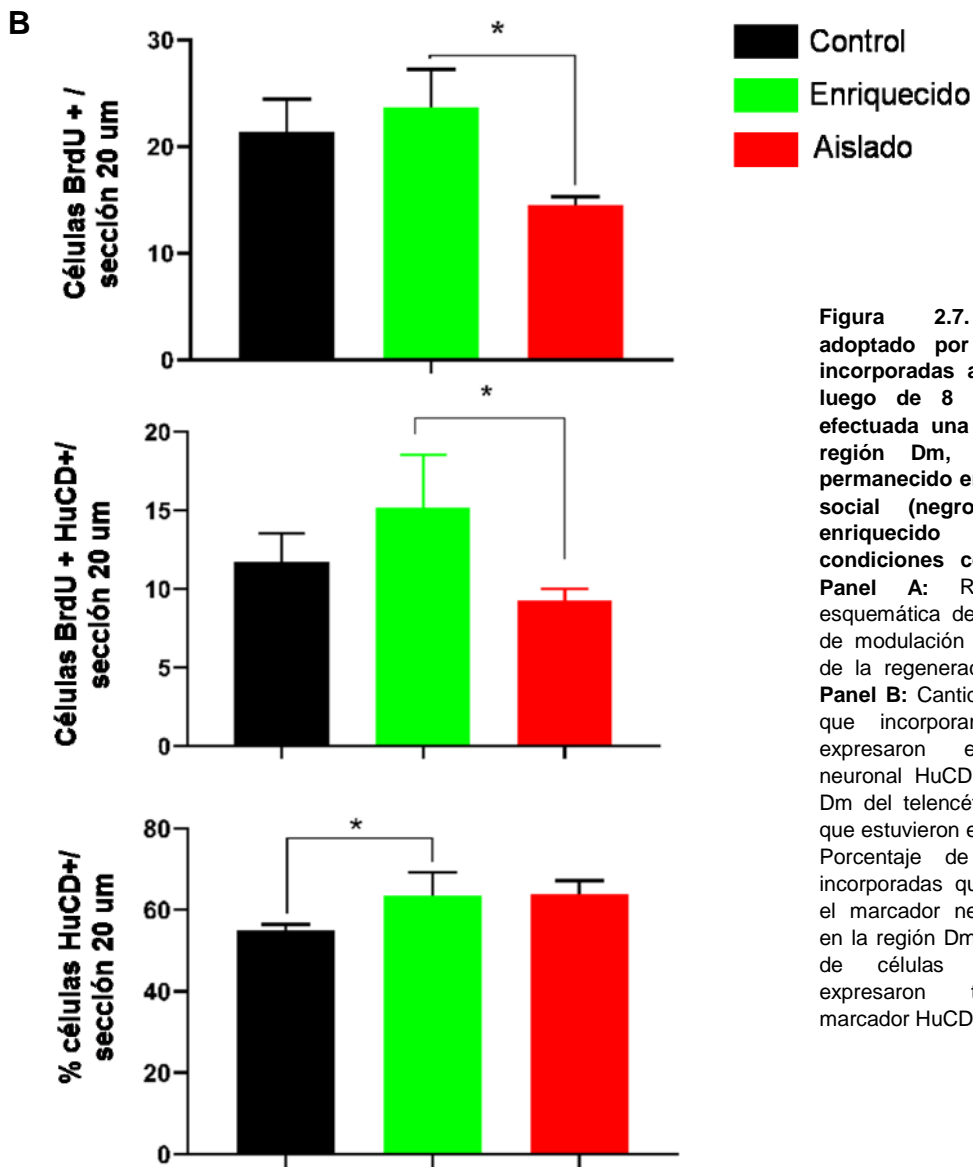
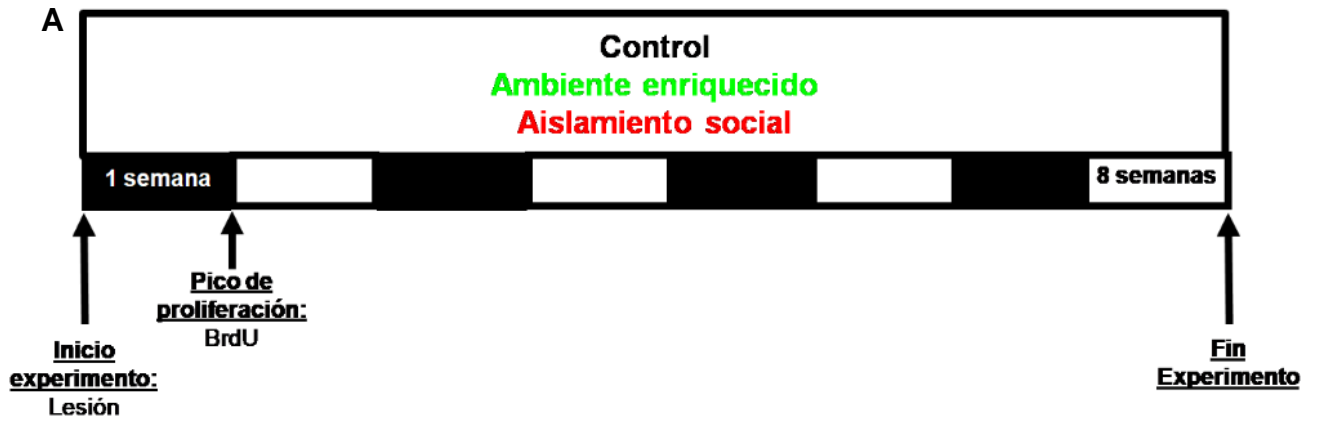


Figura 2.7. Fenotipo adoptado por las células incorporadas al telencéfalo luego de 8 semanas de efectuada una lesión en la región Dm, y habiendo permanecido en aislamiento social (negro), ambiente enriquecido (verde) y condiciones control (rojo). **Panel A:** Representación esquemática del experimento de modulación vía ambiental de la regeneración neuronal. **Panel B:** Cantidad de células que incorporaron BrdU y expresaron el marcador neuronal HuCD en la región Dm del telencéfalo de peces que estuvieron en AS, AE y C. Porcentaje de las células incorporadas que expresaron el marcador neuronal HuCD en la región Dm, y porcentaje de células BrdU+ que expresaron también el marcador HuCD.

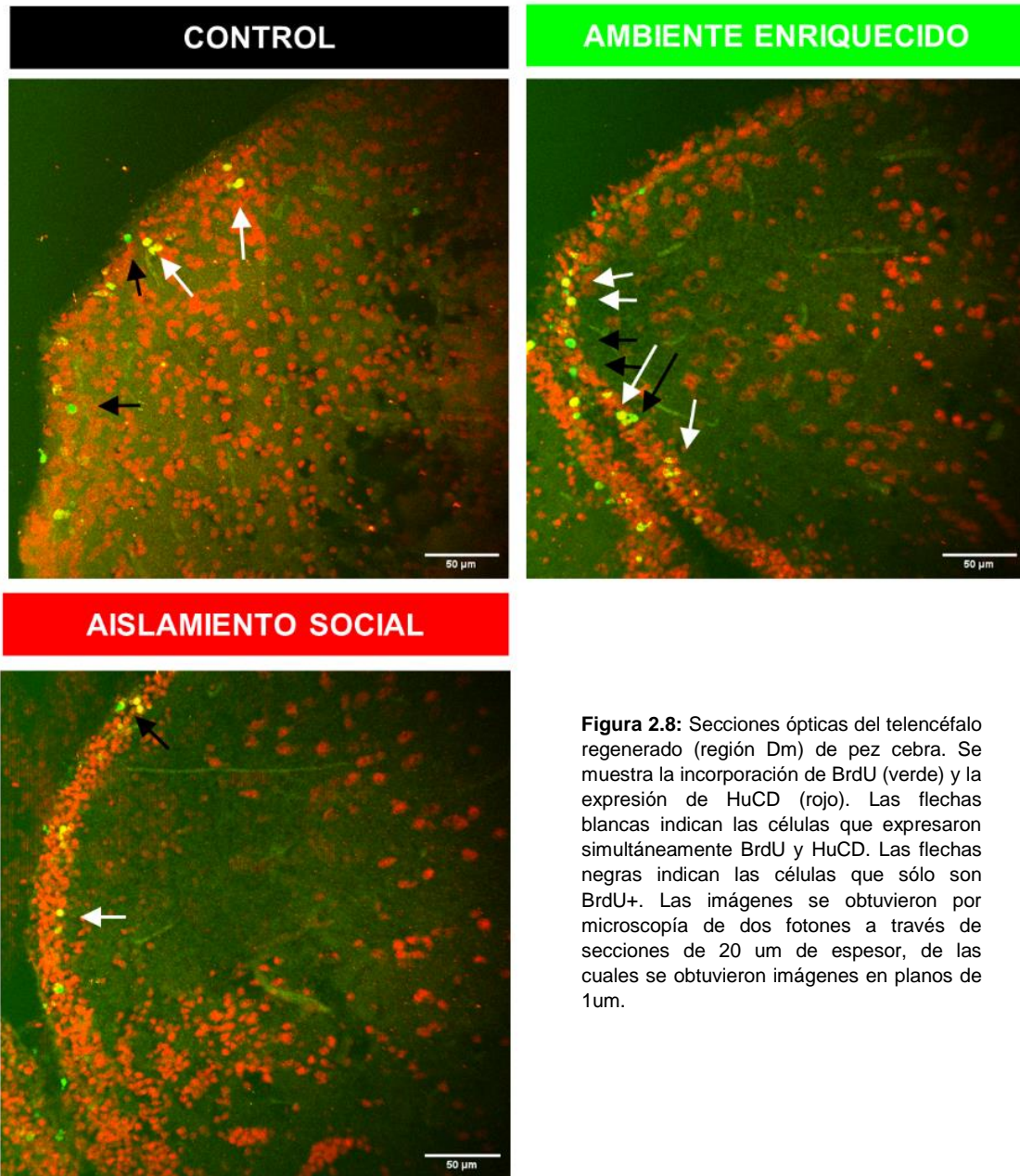


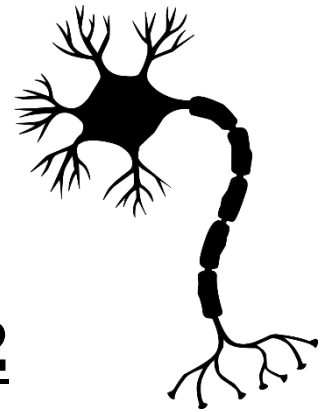
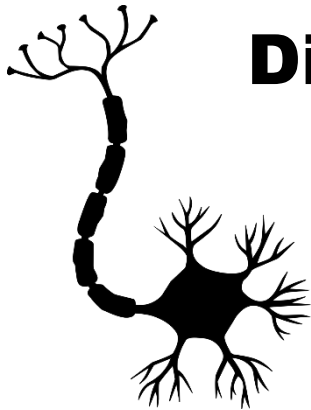
Figura 2.8: Secciones ópticas del telencéfalo regenerado (región Dm) de pez cebra. Se muestra la incorporación de BrdU (verde) y la expresión de HuCD (rojo). Las flechas blancas indican las células que expresaron simultáneamente BrdU y HuCD. Las flechas negras indican las células que sólo son BrdU+. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de dos fotones a través de secciones de 20 μm de espesor, de las cuales se obtuvieron imágenes en planos de 1 μm.

Los resultados obtenidos permiten inferir que la regeneración neuronal puede ser influenciada por el entorno, en específico por estímulos positivos como el ambiente enriquecido. No obstante, al no observarse diferencias entre los niveles de proliferación y neurogénesis regenerativa de los grupos control y aislamiento social podría considerarse que se mantienen los niveles basales de neurogénesis

regenerativa. Esto podría indicar la existencia de mecanismos que aseguren y prioricen la regeneración neuronal, aun en condiciones que resulten negativas para la actividad circuital en el telencéfalo.

CAPÍTULO 2

Discusión de los resultados



DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Lesión en la región Dm del telencéfalo: Protocolo de lesión

En esta tesis se ha logrado desarrollar un protocolo de cirugía en el que pudo reproducirse la magnitud, ubicación y extensión de la lesión en la región dorso medial (Dm) de telencéfalo de pez cebra. Gracias al desarrollo de este protocolo de lesión pudieron diseñarse experimentos orientados a investigar de qué manera el entorno social y ambiental afectan al proceso de neurogénesis regenerativa. Por su simpleza y reproducibilidad se escogió el protocolo de lesión por objeto punzante para lesionar el telencéfalo. Este tipo de lesión ya ha sido empleado en otros trabajos de investigación realizados en modelos teleósteos, de modo que se dispone de una caracterización detallada de aspectos generales de las respuestas fisiológicas desencadenadas por este tipo de daño (Kroehne *et al.*, 2011; Kizil *et al.*, 2012, Kyritsis, *et al.*, 2012; Diotel *et al.*, 2013; Lindsey *et al.*, 2014). Debido a los objetivos propuestos en este trabajo, era imprescindible minimizar el daño en el tejido nervioso y conservar la funcionalidad de las neuronas de la región Dm para mantener la integridad y la actividad circuital del telencéfalo. En este marco, cobra importancia el hecho de poder lesionar solo una fracción del Dm y no dañar toda la región, de manera que los individuos lesionados logren al menos un parcial procesamiento de la información, dado que un daño extenso podría generar en los individuos deficiencias que afecten la interacción con su entorno. Por lo tanto, procuramos mantener la funcionalidad de los circuitos neuronales implicados en la interacción con el ambiente, lesionando aproximadamente un 30% del Dm de un solo hemisferio. A futuro, sería interesante estudiar el comportamiento

electrofisiológico de la región Dm en individuos con el telencéfalo dañado, para determinar la funcionalidad del tejido regenerado y potenciales mecanismos circuitales que compensen la funcionalidad de los circuitos dañados.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que la respuesta proliferativa está fuertemente condicionada por el método y localización de la lesión, además del fenotipo de las neuronas que haya que regenerar (Lindsey *et al.*, 2014). Por ejemplo, ante lesiones con objetos punzantes a través del cráneo se activan los progenitores que componen la glía radial como consecuencia de la estimulación de proteínas específicas asociadas a la inflamación glial por la lesión (Marz *et al.*, 2010; Kishimoto *et al.*, 2012). Pero si la lesión se produce a través de los orificios nasales no se observa activación de la glía radial (Krohene *et al.*, 2011; Baumgart *et al.*, 2012). La lesión a través del cráneo es comparable a una ablación extensa donde se daña la ependimoglia y el ventrículo, permitiendo que el fluido cerebroespinal se infiltre en el parénquima (Marz *et al.*, 2010). Por otro lado, en una ablación de tipos neuronales específicos (ablación selectiva) utilizando drogas en un enfoque experimental farmacológico (Caldwell *et al.*, 2019), el daño neuronal queda limitado a poblaciones particulares de neuronas permitiendo conservar la integridad del tejido neuronal y de los progenitores necesarios para su reparación.

En este trabajo de Tesis, se efectuó una lesión con un objeto punzante a través del cráneo hacia la región medial del telencéfalo, una zona donde se describieron altos niveles de neurogénesis (Ganz *et al.*, 2006), llevando a la activación de los progenitores ubicados en la región ventricular, como ha sido

descrito previamente en otros trabajos (Krohene *et al.*, 2011; Marz *et al.*, 2011; Kishimoto *et al.*, 2012). Dado que en este trabajo no se pretendía dañar algún tipo de neurona en particular, el protocolo de lesión por objeto punzante elegido se ajustaba a nuestros objetivos. Como el método de lesión elegido es altamente dependiente del operador, su estandarización fue estrictamente necesaria para su posterior utilización en diseños experimentales que permitan explorar los factores que influyen en el proceso de regeneración neuronal.

Estandarizar el protocolo de lesión permite desarrollar diseños experimentales reproducibles en los que se minimice la variabilidad de los ensayos experimentales y que la magnitud del tejido a reparar sea equivalente.

Lesión en la región Dm del telencéfalo: Recomposición tisular

Efectuando una lesión unilateral se provocó un daño de aproximadamente un tercio de la superficie de la región dorso-medial (Dm) de un hemisferio del telencéfalo. La lesión efectuada desencadenó en primera instancia una respuesta inflamatoria que pudo observarse en todo el telencéfalo a 1 DPL, mientras que 7 DPL los signos de inflamación habían disminuido y, tanto en el sitio de lesión como en las zonas adyacentes se observaron gran cantidad de progenitores activos.

Luego de 30 días de efectuada la lesión la regeneración tisular fue a simple vista completa, sin daño evidente, no se observaron progenitores activos, ni tejido cicatrizal. Si bien se sabe que los progenitores contribuyen a la rápida regeneración del tejido nervioso, se desconocen las características, el tiempo de

maduración, adquisición del fenotipo final y la funcionalidad de las células producidas por la neurogénesis regenerativa.

Lesión en la región Dm del telencéfalo: Proliferación de progenitores neuronales

Mediante los experimentos realizados se comprobó que la lesión gatilla una respuesta proliferativa, reactiva en la región Dm del telencéfalo. Tanto el tiempo de recomposición tisular como los niveles de proliferación celular asociados a respuesta proliferativa, fueron comparables a los encontrados por otros autores (Kishimoto *et al.*, 2012; Diotel *et al.*, 2013). La lesión unilateral en la región Dm del telencéfalo desencadenó una activación de progenitores neuronales, observada en diferentes regiones del telencéfalo, probablemente debido a que las señales proinflamatorias del sistema inmune circulan de forma sistémica en sangre o líquido cefalorraquídeo. Veinticuatro horas luego de la lesión, se evidenció, mediante expresión de PCNA, un incremento en la proliferación de progenitores neuronales, generalizado en el telencéfalo dorsal. Luego de siete días, se observó un pico en la actividad proliferativa, alcanzando valores siete veces mayores a la actividad basal. Este incremento decae a valores basales (proliferación homeostática) luego de 30 días de efectuada la lesión. Por otro lado, en el hemisferio contralateral también se observó, el mismo patrón de incremento de la proliferación celular, aunque en menor escala respecto del hemisferio lesionado. El aumento de la proliferación celular en ambos hemisferios telencefálicos luego de una lesión unilateral, indican que las alteraciones en el microambiente celular del telencéfalo afectan al sitio de lesión, con efectos que alcanzan lugares que se

encuentran distantes al sitio de lesión, incluyendo el hemisferio sano. La actividad proliferativa se concentró en la región periventricular y en la región Dm del hemisferio lesionado. Resultaría interesante evaluar el proceso de regeneración durante un desafío cognitivo que involucre a la región Dm como el utilizado en trucha arcoíris, y evaluar si la actividad neuronal desencadenada por el desafío cognitivo podría ser un modulador positivo de la regeneración.

Esta validación de una respuesta proliferativa derivada de la lesión, resultó fundamental para proseguir con los experimentos de modulación de la regeneración.

Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*: proliferación de progenitores neuronales.

En función de trabajos previamente realizados (Opendak y Gould, 2015) es sabido que la estimulación sensorial, motora y social presente en un ambiente experimentalmente enriquecido, actúan sobre el cerebro mediante la inducción de respuestas plásticas en los circuitos locales y sus circuitos eferentes. La estimulación se asocia a altos niveles de neurotrofinas, plasticidad glial y neuronal, e incrementos en la actividad basal de los circuitos neuronales, lo que conlleva al aumento de la proliferación celular en varios nichos neurogénicos (Pham et al. 2002; Branchi *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006; Mora *et al.*, 2007; Angelucci et al. 2009, Dizil *et al.*, 2020). Al igual que lo observado en otras especies de peces teleósteos, la estimulación sensorial que ofrece un ambiente enriquecido junto con la estimulación social, generan actividad circuital que favorece la producción de nuevas neuronas en la neurogénesis adulta. Por estos

motivos, nos propusimos evaluar la eficiencia del proceso regenerativo ante diferentes contextos ambientales y sociales.

Entre los individuos que habían permanecido en diferentes ambientes, la respuesta proliferativa desencadenada en respuesta a la lesión en Dm mostró importantes variaciones. Los individuos que permanecieron en ambiente enriquecido aumentaron sus niveles de proliferación, en Dm del hemisferio lesionado, en un ~100% con respecto a los individuos que permanecieron en condiciones control o aislados. Estos hallazgos están en concordancia con experimentos donde se evaluó la proliferación celular en Dm de peces cebra mantenidos en condiciones de ambiente enriquecido (von Krogh *et al.*, 2010). Esto nos indica que este ambiente impacta positivamente en la activación de progenitores neuronales de Dm tanto en condiciones homeostáticas como ante una respuesta regenerativa.

Si bien el ambiente enriquecido indujo una mayor actividad proliferativa en la región Dm, también se observaron incrementos en los niveles de proliferación en otras regiones adyacentes al sitio de lesión, como Vd y DI del hemisferio lesionado. El aumento de los niveles de proliferación en DI, pueden relacionarse con que esa región está involucrada en la exploración espacial, y el ambiente enriquecido representaría un mayor requerimiento de la actividad basal de DI (Kemperman y Gage 1997; van Praag *et al.*, 1999; Mazzitelli fuentes *et al.*, 2022). A su vez, se ha demostrado que DI se conecta sinápticamente con Dm, de modo tal que podrían estar actuando señalizaciones sinápticas tanto de manera anterógrada como retrógrada (Ng *et al.*, 2012). Por otro lado, Vd es una región

propuesta como parte del complejo amigdaloides en peces, participando en procesamiento de información emocional, y comparte conexiones sinápticas con Dm (Porter y Mueller, 2020). Por lo tanto, los incrementos en los niveles de proliferación asociados al ambiente enriquecido que se observaron en DI y Vd, podrían subyacer a la conectividad sináptica que comparten estas regiones con Dm, a la cercanía al sitio de lesión, y quizás a una susceptibilidad de diferentes progenitores neuronales a las señales moleculares desencadenadas durante la regeneración (Schimizu *et al.*, 2018). Al analizar las otras regiones telencefálicas, las diferencias entre los niveles de proliferación no presentaron el mismo patrón observado en la región Dm.

Sin embargo, los individuos que permanecieron aislados no evidenciaron cambios en los niveles de proliferación celular respecto de los controles. Interesantemente, este resultado coincide con lo observado en los niveles de proliferación homeostática en el Dm de trucha arcoiris en condiciones de aislamiento social y controles, ver Figura 1.14 en Capítulo 1. Si bien el aislamiento social pueda impactar en la funcionalidad circuital en Dm, esto no estaría impactando en los niveles de progenitores neuronales activados, tanto en condiciones homeostáticas como regenerativas. Estos resultados sugieren que, quizás, los niveles de proliferación en Dm estarían en valores mínimos o bien que la actividad de Dm sería insensible a estas condiciones sociales.

Modulación de la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo de *D. rerio*: Neurogénesis.

En todos los grupos experimentales, luego de 8 semanas de efectuada la lesión, solo se encontraron nuevas células (BrdU+) en la región Dm, ninguna otra región telencefálica incorporó nuevas células durante el proceso regenerativo. Sugiriendo que todas las células regeneradas en regiones adyacentes a Dm, han sido derivadas mediante procesos de migración celular a restaurar la región lesionada. Esta hipótesis debería ser evaluada mediante un seguimiento temporal del proceso regenerativo. Alternativamente, podría ocurrir una muerte selectiva de nuevas neuronas en regiones adyacentes a Dm y que no demanden regeneración tisular, quizás para favorecer una estabilidad circuital de regiones telencefálicas que serían entradas o salidas sinápticas de Dm. Esto último favorecería una correcta sinaptogénesis de la región a restaurar con sus circuitos diana que estarían en condiciones más estáticas de lo normal. Para ensayar esta idea, deberíamos evaluar muerte neuronal en diferentes regiones telencefálicas a diferentes tiempos de regeneración tisular. Apoyando esta hipótesis, otros autores han observado que solo un tercio de las células regeneradas se diferencian y sobreviven como neuronas maduras en el sitio de la lesión (März *et al.*, 2010; Kroehne *et al.*, 2011; Kishimoto *et al.*, 2012). Tanto en los individuos que permanecieron en ambiente enriquecido como en aislamiento social, el 64% de las nuevas células incorporadas en la región Dm del telencéfalo se diferenció en neurona. Esto indicaría que los procesos de diferenciación neuronal no dependen

del entorno, y por lo tanto de la actividad circuital asociada a cada tipo de ambiente.

Dado que el aislamiento social disminuyó la neurogénesis adulta en Dm de trucha arcoiris, esperábamos observar una menor neurogénesis regenerativa en peces mantenidos en aislamiento. Sin embargo, no observamos diferencias en el número de neuronas nuevas (células BrdU+HuCD+) en el Dm de peces cebra aislados respecto de sus controles. La ausencia de efectos del aislamiento social en la sobrevivencia de las neuronas regeneradas y en la activación de progenitores neuronales, sugiere una diferencia interespecífica en la sensibilidad al aislamiento social entre peces cebra criados y trucha arcoiris. Otro factor a tener en cuenta son las condiciones de cría y mantenimiento de los individuos experimentales, dado que los peces cebra han sido criados en condiciones controladas de laboratorio, mientras que las truchas arcoiris fueron mantenidas bajo condiciones ambientales naturales.

Por otro lado, el grupo que permaneció en ambiente enriquecido mostró un incremento del ~50% en el número de neuronas regeneradas (células BrdU+HuCD+) respecto de los individuos mantenidos en condiciones control. Considerando que la actividad circuital tiene fuerte influencia sobre la neurogénesis adulta (Lindsey *et al.*, 2019) y que a su vez el entorno influencia fuertemente la actividad circuital, es necesario analizar los niveles de neurogénesis adulta considerando el ambiente en el que permanecieron cada grupo de individuos. Diferentes condiciones ambientales estimulan de diferente forma los circuitos neurales de la región Dm, generando diferentes dinámicas

circuitales. Las neuronas recién nacidas sobreviven y se integran en la red neuronal preexistente creando sinapsis, como lo demuestra la expresión de marcadores sinápticos (Kroehne *et al.*, 2011; Ceci *et al.*, 2018). En este sentido, el ambiente enriquecido estimula la actividad neuronal de la región Dm con lo cual podemos relacionar los mayores niveles de neurogénesis hallados con la estimulación ambiental. Por otro lado, gracias a estudios realizados en mamíferos, se sabe que la actividad circuital estimula la conexión de las nuevas neuronas a los circuitos preexistentes (Song *et al.*, 2012). Las neuronas que no se conectan a los circuitos preexistentes son eliminadas, por lo tanto, cualquier factor que favorezca la actividad circuital de Dm, en este caso el ambiente enriquecido, favorecerá la sobrevivencia de las nuevas neuronas. No obstante, poco se sabe sobre el grado de sobrevivencia de las células producidas por regeneración, y en última instancia su contribución a la funcionalidad a largo plazo del circuito implicado en el daño (Schimizu *et al.*, 2018).

Dado que los peces lesionados fueron mantenidos en las diferentes condiciones experimentales durante todo el proceso regenerativo, y teniendo en cuenta que los progenitores neuronales en división fueron marcados con BrdU luego de 7 días de lesión, podemos pensar que los efectos en la neurogénesis observados en Dm puedan deberse solamente a que el AE estimuló la proliferación en esa región. Entonces, a priori, no se estarían viendo efectos en la sobrevivencia de las neuronas nuevas. Es más, las diferencias observadas en proliferación (ver Figura 2.6) fueron mayores a las observadas en neurogénesis (ver Figura 2.7).

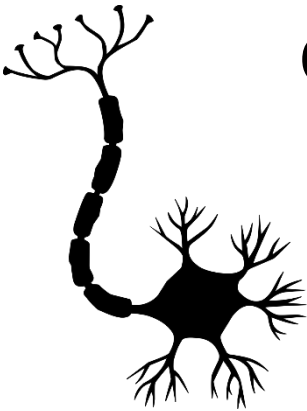
Estas observaciones podrían deberse a que los mecanismos de reparación tisular impliquen una proliferación celular excesiva asociada a una baja sobrevida celular, y que la actividad circuital pueda regular la necesidad de nuevas neuronas a demanda. La baja sobrevida puede deberse a mecanismos donde se activan programas de muerte celular, donde la sobrevida de las nuevas neuronas depende de su integración funcional. Si bien la apoptosis es uno de los mecanismos más conocidos de muerte celular, no es claro el rol de este proceso en la regeneración del tejido nervioso (Seidah 2003). Hasta el momento, en numerosos trabajos realizados en peces, se ha planteado que, ante una noxa en el tejido nervioso, la apoptosis sería el principal mecanismo de eliminación de células dañadas para permitir la regeneración (Fauset 2008; Li *et al.*, 2016). En los peces, la eliminación de células muertas a través de la apoptosis permite una eliminación selectiva de las células muertas, mientras que la en contraste con la muerte por necrosis que ocurre en los mamíferos en caso de daño en el tejido nervioso. Esta hipótesis se sostiene en función de la descripción del aumento de la actividad apoptótica en las primeras etapas del proceso de regeneración neuronal y la activación de los factores de transcripción relacionados con la regeneración neuronal, como Sox2 y Ascl1 (Sohni y Wan Ibrahim 2014; Kyritsis *et al.*, 2015). También se encontró en médula espinal lesionada de peces cebra, una sobre expresión de los genes Bax, caspasa-3 y caspasa-9 genes involucrados en la apoptosis (McCurley y Callard 2008). En este marco, sería interesante hacer un seguimiento por estudio clonal y obtención de imágenes *in vivo* de los progenitores que al momento de la lesión activaron su ciclo celular, y ver cuántos efectivamente

contribuyen a la reparación tisular. Como perspectiva a futuro, también sería interesante evaluar la funcionalidad del tejido nervioso regenerado mediante ensayos de electrofisiología, protocolos de aprendizaje específicos que se asocien a los circuitos neuronales de la región Dm, o aprendizajes que impliquen otras regiones del cerebro para evaluar la influencia de la actividad circuital de todo el cerebro, en la reparación tisular.

Es posible concluir que el ambiente enriquecido favorece la regeneración neuronal en la región Dm del telencéfalo estimulando la activación de las células madre neuronales y que el aislamiento social no tendría efecto sobre la regeneración neuronal en Dm.

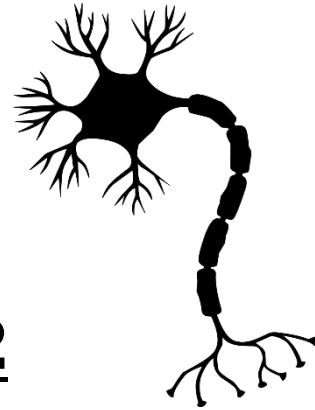
Teniendo en cuenta que en este trabajo sólo se estudió la regeneración neuronal a nivel neuroanatómico, como perspectiva a futuro podemos proponer estudios sobre la regeneración neuronal incorporando la variable del aprendizaje.. El aprendizaje emocional resulta fundamental para enfrentar los desafíos ambientales, y en este marco para poder evaluar la contribución de la actividad circuital a la reparación del tejido cerebral dañado adquiere importancia efectuar una lesión que conserve una cantidad significativa de tejido para mantener la estructura y funcionalidad del telencéfalo. La región Dm del telencéfalo se encuentra altamente vinculada al aprendizaje emocional, como se comprobó en el capítulo 1 de esta tesis mediante el protocolo de aprendizaje por evitación activa. Sería interesante evaluar si los diferentes niveles de proliferación y neurogénesis asociados a cada tipo de ambiente, tienen correlato a nivel comportamental en un protocolo de aprendizaje por evitación activa. También, sería interesante evaluar

la dinámica del circuito neuronal afectado por la lesión, y a su vez, si esa estimulación de las redes neuronales que se conservaron, influye en el proceso de regeneración neuronal.



CAPÍTULO 2

Conclusiones



CONCLUSIONES CAPITULO 2: Regeneración neuronal en pez cebra

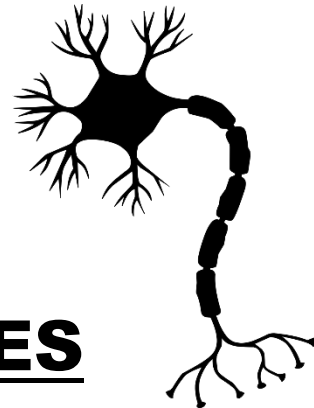
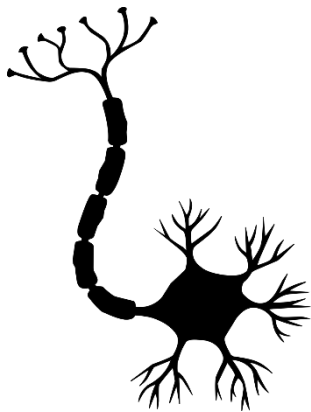
Se desarrolló un protocolo de lesión para dañar una porción limitada de la región Dm (aproximadamente el 30%) de forma reproducible, sin producir mayores perjuicios a la integridad física y fisiológica de los individuos lesionados. La reproducibilidad de la cirugía nos permitió validar las lesiones y mantener las variables fisiológicas de los individuos dentro de rangos estrechos. La mayoría de los trabajos que abordan el estudio de la regeneración neuronal, si bien realizan lesiones dirigidas a regiones cerebrales particulares, no pretenden limitar el daño producido. Para los posteriores objetivos de este trabajo, era necesario dañar pero al mismo tiempo, mantener cierta funcionalidad de los circuitos dañados, por eso era necesario conservar circuitos neuronales dentro de la región Dm. Finalmente, el desarrollo de este protocolo tuvo también por objetivo su utilización futura en diseños experimentales que permitan evaluar la funcionalidad de los circuitos neuronales regenerados en la región Dm del telencéfalo.

Se corroboró la capacidad de recomposición de tejido nervioso dañado en el telencéfalo del pez cebra. Tanto el perfil temporal y la magnitud de la respuesta proliferativa observada luego de efectuada la lesión también fueron comparables con las reportadas para pez cebra por otros autores (Kishimoto *et al.*, 2012). No obstante, para conocer en detalle el comportamiento de los progenitores neurales en respuesta a una lesión, a lo largo del tiempo, habría que analizar la proliferación celular considerando más puntos temporales y los tipos de divisiones conservativas contra las neurogénicas. El objetivo en esta tesis era solo encontrar un punto temporal con alta proliferación celular que permitiera hacer el

seguimiento de una cohorte completa de células generadas en un contexto de neurogénesis regenerativa.

Finalmente, pudo comprobarse que el enriquecimiento del ambiente impacta positivamente, tanto sobre la proliferación celular en el telencéfalo como sobre la incorporación de nuevas células en una región dañada. Considerando los niveles de proliferación celular y la incorporación de nuevas células, ambos fueron superiores en individuos que permanecieron en ambiente enriquecido respecto a los hallados en individuos que permanecieron en condiciones control. Por otro lado, el aislamiento social no produjo cambios en la respuesta regenerativa, al menos en las condiciones ensayadas. El porcentaje de nuevas células que se diferenciaron a neuronas se mantuvo constante, sin importar el ambiente en el que permanecieron los individuos, siendo la región Dm la única que incorporó nuevas células. Estos hallazgos resaltan el impacto negativo de las condiciones standard en las cuales los animales de investigación son mantenidos, limitando procesos de plasticidad cerebral como los son la neurogénesis adulta, tanto en condiciones homeostáticas como en respuesta regenerativa.

CONCLUSIONES
FINALES



CONCLUSIONES FINALES

En función de los experimentos realizados con trucha arcoíris y pez cebra, en el marco de esta tesis puede concluirse que tanto la proliferación celular, la neurogénesis adulta y la regeneración neuronal son fenómenos que aportan significativamente a la plasticidad neuronal en los peces teleósteos. Por otro lado, son fuertemente dependientes de la estimulación sensorial que implican los procesos de aprendizaje y/o el entorno. El aislamiento social, tuvo efectos negativos sobre el aprendizaje, la proliferación celular, y la neurogénesis adulta. Por otro lado, no observamos lo mismo con la regeneración neuronal, sobre la cual el aislamiento social no tuvo efectos negativos y en la que los peces conservaron los niveles basales de actividad regenerativa. Los individuos socialmente aislados fueron incapaces de consolidar aprendizajes, y tanto la proliferación celular y la incorporación de nuevas neuronas en el cerebro fue baja. Por otro lado, los ambientes estimulantes y desafiantes se asociaron a altos niveles de proliferación celular que redundaron en un aumento en la incorporación de nuevas neuronas durante la regeneración neuronal. En este marco, puede concluirse que tanto los factores ambientales como los sociales influyen de forma similar a la neurogénesis adulta y regenerativa.

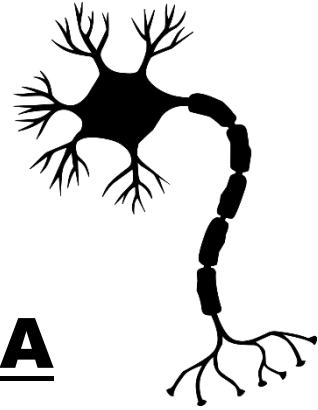
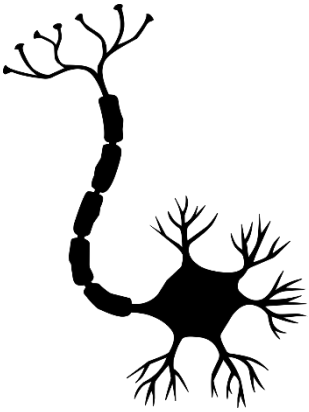
En base a lo anteriormente expuesto, resulta evidente que la interacción con el entorno condiciona estas formas de plasticidad neuronal, pero a su vez, la capacidad de generar nuevas neuronas condiciona la interacción con el ambiente e influye en procesos complejos como el aprendizaje.

Tanto la neurogénesis adulta como la regeneración neuronal se ven influenciadas positivamente por el ambiente enriquecido (modificaciones en los niveles de proliferación y de neurogénesis adulta). La susceptibilidad de ambos procesos a los mismos factores indicaría una relación entre ambas, ya sea por compartir bases genómicas, mecánicas y fisiológicas o por que la regeneración neuronal se sustenta en la neurogénesis adulta.

Es necesario considerar que la sobrevivencia, sinaptogénesis y la integración neuronal de las nuevas neuronas, dependen de la actividad y función del circuito de inserción. En este sentido, la estimulación de circuitos dañados tuvo efectos positivos sobre la regeneración de los mismos.

Por otro lado, desde una perspectiva translacional, es necesario profundizar en el estudio de la regeneración neuronal, analizar su fisiología y bases moleculares, con el fin de encontrar si es posible replicar en el sistema nervioso de los mamíferos las condiciones que permiten la existencia de mecanismos reparativos en los peces.

BIBLIOGRAFIA



Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., & Götz, M. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental Biology*, 295(1), 278-293.

Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., & Götz, M. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental Biology*, 295(1), 278-293.

Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson Jr, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*, 94(4), 991-1026.

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509), 1127-1128.

Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335.

Alunni, A., & Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development*, 143(5), 741-753.

Alunni, A., Krecsmarik, M., Bosco, A., Galant, S., Pan, L., Moens, C. B., & Bally-Cuif, L. (2013). Notch3 signaling gates cell cycle entry and limits neural stem cell amplification in the adult pallium. *Development*, 140(16), 3335-3347.

Alvarez-Buylla, A., & Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335(6184), 353-354.

Alvarez-Buylla, A., & Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Journal of Neuroscience*, 8(9), 3528-3539.

Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2008). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 227-238.

Alvarez-Buylla, A., Ling, C. Y., & Nottebohm, F. (1988). High vocal center growth and its relation to neurogenesis, neuronal replacement and song acquisition in juvenile canaries. *Journal of Neuroscience*, 8(5), 1636-1646.

Andrea Megela Simmons,^{a,b} Seth S. Horowitz,^{a,b} and Rebecca A. Brown^b

Aoki, T., Kinoshita, M., Aoki, R., & Agetsuma, M. (2013). "Cognitive development in wild bonnet macaques: Order of landmark use for spatial memory and monitoring of hidden objects." *Animal Behaviour*, 86(2), 239-246.

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), 963-970.

Ausas, M. S., Mazzitelli-Fuentes, L., Roman, F. R., Crichigno, S. A., De Vincenti, A. P., & Mongiat, L. A. (2019). Social isolation impairs active avoidance performance and decreases neurogenesis in the dorsomedial telencephalon of rainbow trout. *Physiology & behavior*, 198, 1-10.

Ayari, B., El Hachimi, K. H., Yanicostas, C., Landoulsi, A., & Soussi-Yanicostas, N. (2010). Prokineticin 2 expression is associated with neural repair of injured adult zebrafish telencephalon. *Journal of neurotrauma*, 27(5), 959-972.

Barnea, A., & Nottebohm, F. (1994). Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 11217-11221.

Bellenchi, G. C., Volpicelli, F., Piscopo, V., Perrone-Capano, C., & di Porzio, U. (2013). Adult neurogenesis in mammals: variations and confusions. *Brain Structure and Function*, 219(4), 1189-1200.

Benus, R. F., den Daas, S., & Koolhaas, J. M. (1989). Environmental factors affecting aggression and defeat in male rats. *Behavioural Processes*, 19(3), 215-231.

Bernardos, A. C., Dominguez-Caro, L., Alonso, M. T., & Garcia-Sancho, J. (2007). Functional relevance of neuronal calcium sensor-1 and phosphoinositide interactions. *Journal of Cell Science*, 120(18), 3167-3177.

Bernocchi, G., Bonfanti, L., & Facchetti, F. (1990). Identification of neuronal-like cells in the proliferative layers of the adult mammalian brain. *Brain Research*, 506(2), 350-354.

Bernocchi, G., Bonfanti, L., & Facchetti, F. (1990). Identification of neuronal-like cells in the proliferative layers of the adult mammalian brain. *Brain Research*, 506(2), 350-354.

Bernstein, J. J., & Sadlack, F. J. (1969, January). Formation of new neurons during abortive regeneration of goldfish telencephalon-an autoradiographic study. in *anatomical record* (vol. 163, no. 2, pp. 154-+). Div john wiley & sons inc, 111 River ST, Hoboken, NJ 07030 USA: WILEY-LISS.

Bhatt, A. M., Machin, N. A., Sillitoe, R. V., & Johnson, S. L. (2004). The surfaces of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae: A scanning electron microscope atlas. *Developmental Dynamics*, 231(3), 593-608.

Blanchard, R. J., McKittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001). Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & behavior*, 73(3), 261-271.

Bonaguidi, M. A., & Song, J. (2018). Neural stem cells as a source for brain repair: what we have learned. In *Neural Stem Cells in Development, Adulthood and Disease* (pp. 217-232). Academic Press.

Bond, A. M., Ming, G. L., & Song, H. (2015). Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later. *Cell stem cell*, 17(4), 385-395.

Bonfanti, L., Rossi, F., & Zupanc, G. K. (2011). Towards a comparative understanding of adult neurogenesis: mind the gap. *Frontiers in Neuroscience*, 5, 1-13.

Brandão, M. L., Braithwaite, V. A., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2015). Isolation impairs cognition in a social fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 171, 204-210.

Brockes, J. P., & Kumar, A. (2008). Comparative aspects of animal regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 525-549.

Brown, C., & Laland, K. N. (2003). Social learning in fishes: a review. *Fish and fisheries*, 4(3), 280-288.

Brown, C., Laland, K., & Krause, J. (2017). "Fish cognition and behavior." John Wiley & Sons.

Budaev, S. V. (2010). Using principal components and factor analysis in animal behaviour research: caveats and guidelines. *Ethology*, 116(5), 472-480.

Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K. M., ... & Kyzar, E. (2012). "Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish." *Nature Protocols*, 7(12), 1816-1829.

Cacialli, P., Gradogna, A., Grilli, M., & Ristori, E. (2017). Adult neurogenesis in zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2403.

Caldwell, L. J., Davies, N. O., Cavone, L., Mysiak, K. S., Semenova, S. A., Panula, P., ... & Becker, T. (2019). Regeneration of dopaminergic neurons in adult zebrafish depends on immune system activation and differs for distinct populations. *Journal of Neuroscience*, 39(24), 4694-4713.

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.

Carlen, M., Meletis, K., Göritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., ... & Frisén, J. (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nature Neuroscience*, 12(3), 259-267.

Carlson, B. M. (2007). *Principles of regenerative biology*. Elsevier Academic Press.

Carpenter, R. E., Sabirzhanov, B., & Summers, C. H. (2009). Molecular substrates of social fear conditioning in the dorsolateral pallium (hippocampus) of rainbow trout. *Soc Neurosci Abs*, 35(478.9).

Ceci, M., Mariano, V., & Romano, N. (2018). Zebrafish as a translational regeneration model to study the activation of neural stem cells and role of their environment. *Reviews in the neurosciences*, 30(1), 45-66.

Chapouton, P., Jagasia, R., & Bally-Cuif, L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays*, 29(9), 745-757.

Chapouton, P., Jagasia, R., & Bally-Cuif, L. (2010). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays*, 32(10), 768-780.

Chapouton, P., Skupien, P., Hesl, B., Coolen, M., Moore, J. C., & 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.

Choi, J. S., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2010). The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. *Learning & Memory*, 17(3), 139-147.

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A. R., DeLeo, A. M., Pastrana, E., & Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, 82(3), 545-559.

Colson, V., Perrichon, P., Eslan, F., Dalla Valle, L., & Pasqualini, C. (2015). "Personality, sex and reproductive success in a social cichlid." *Animal Behaviour*, 99, 197-204.

Cominski, T. P., Jiao, X., Catuzzi, J. E., Stewart, A. L., & Pang, K. C. (2014). The impact of corticosterone on fear extinction versus fear generalization in male rats. *Neuroscience*, 278, 367-374.

Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, 15(1), 353-375.

Davis, R. E., Schlumpf, B. E., & Klinger, P. D. (1984). Systemic colchicine inhibits goldfish optic nerve regeneration. *Toxicology and applied pharmacology*, 73(2), 268-274.

Dawley, E. M., Dawley, R. M., & St John, S. J. (2000). Structural and functional evidence for multiple neurogenic regions in the adult rat brain. *Developmental Brain Research*, 122(2), 207-213.

Dawley, E. M., Dawley, R. M., & St John, S. J. (2000). Structural and functional evidence for multiple neurogenic regions in the adult rat brain. *Developmental Brain Research*, 122(2), 207-213

Day-Wilson, K. M., Jones, D. N. C., Southam, E., Cilia, J., & Totterdell, S. (2006). Medial prefrontal cortex volume loss in rats with isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuroscience*, 141(3), 1113-1121.

de Girolamo, P., & D'Angelo, L. (2021). Neurotrophins in the Brain of Teleost Fish: The State of the Art. *Recent Advances in NGF and Related Molecules: The Continuum of the NGF "Saga"*, 289-307.

de Lourdes Ruiz-Gomez, M., Kittilsen, S., Höglund, E., Huntingford, F. A., Sørensen, C., Pottinger, T. G., ... & Øverli, Ø. (2008). Behavioral plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with divergent coping styles: when doves become hawks. *Hormones and behavior*, 54(4), 534-538.

Di Cicco, E., Tozzini, E. T., Rossi, G., & Cellerino, A. (2011). The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Experimental gerontology*, 46(4), 249-256.

Diotel, N., Beil, T., Strähle, U., & Rastegar, S. (2013). Differential expression of id genes and their potential regulator *znf238* in zebrafish adult neural progenitor cells and neurons suggests distinct functions in adult neurogenesis. *Gene expression patterns*, 13(6), 229-243.

Diotel, N., Beil, T., Strähle, U., & Rastegar, S. (2013). Differential expression analysis of estrogen receptors ER α and ER β in the zebrafish brain using a new pharmacological tool. *Neuroscience*, 231, 1-12.

Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S. K., Pellegrini, E., Vaillant, C., ... & Kah, O. (2010). Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(2), 172-192.

Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5046-5061.

Duman, R. S., Nakagawa, S., & Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2), 401-407.

Dunlap, K. D. (2016). Fish neurogenesis in context: assessing environmental influences on brain plasticity within a highly labile physiology and morphology. *Brain, Behavior and Evolution*, 87(3), 156-166.

Dunlap, K. D., Castellano, J. F., & Prendaj, E. (2006). Social interaction and cortisol treatment increase cell addition and radial glia fiber density in the diencephalic periventricular zone of adult electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Hormones and behavior*, 50(1), 10-17.

Dunlap, K. D., Castellano, J. F., & Prendaj, E. (2006). Social interaction and cortisol treatment increase cell addition and radial glia fiber density in the diencephalic periventricular zone of adult electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Hormones and behavior*, 50(1), 10-17.

Dunlap, K. D., Harris, R. E., Schaffler, D. H., & Aizenman, C. D. (2006). "Dependence of visual cell survival on synaptic competition during development of the vertebrate retina." *Journal of Neuroscience*, 26(22), 5721-5732

Durán, E., Sánchez, E., & Vargas, J. P. (2010). Effects of medial pallium lesions on spatial learning in goldfish. *Behavioural Brain Research*, 212(1), 35-41.

Earley, R. L., Edwards, J. T., Aseem, O., Felton, K., Blumer, L. S., Karom, M., & Grober, M. S. (2006). Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*). *Physiology & Behavior*, 88(4-5), 353-363.

Ebbesson, L. O. E., & Braithwaite, V. A. (2012). Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. *Journal of Fish Biology*, 81(7), 2151-2174.

Ekstrom, P., Johnsson, 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.

Endo, T., Yoshino, J., Kado, K., & Tochikai, S. (2007). Brain regeneration in anuran amphibians. *Development, growth & differentiation*, 49(2), 121-129.

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.

Ferrari, M. C., Gonzalo, A., & Messier, F. (2010). "Effects of predation risk on foraging behavior and habitat use in guppies." *Ecology*, 91(4), 1007-1014.

Folgueira, M., Anadón, R., & Yáñez, J. (2004). 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.

Font, E., Desfilis, E., Pérez-Canellas, M., & García-Verdugo, J. M. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behavior and Evolution*, 58(5), 276-295.

Fuller, R. J. (1970). The influence of woodland structure and management on bird populations in upland broadleaved forests in Wales. *Journal of Applied Ecology*, 7(2), 435-450.

Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A., & Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 18(18), 6631-6644.

Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A., & Ray, J. (2007). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *Journal of neurobiology*, 36(2), 249-266.

Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A., & Ray, J. (1995). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 15(12), 7539-7547.

Ganz, J., & Brand, M. (2016). Adult neurogenesis in fish. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(7), a019018.

Ganz, J., Kaslin, J., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., & Brand, M. (2012). Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. *Journal of Comparative Neurology*, 520(3), 633-655.

Ganz, J., Kaslin, J., Hochmann, S., Freudenreich, D., & Brand, M. (2015). Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. *Glia*, 63(6), 1074-1084.

Ganz, J., Kaslin, J., Hochmann, S., Freudenreich, D., & Brand, M. (2015). Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. *Glia*, 63(6), 1074-1084

Ganz, J., Kaslin, J., Hochmann, S., Freudenreich, D., Brand, M., & Haffter, P. (2015). Thermosensory perception regulates speed of movement in response to temperature changes in zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 35(1), 385-398.

Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., ... & Brand, M. (2015). Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000Research*, 3(308), 308.

Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., ... & Brand, M. (2014). Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000Research*, 3.

García-Verdugo, J. M., Ferrón, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E., & Font, E. (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain research bulletin*, 57(6), 765-775.

Giassi, A. C., Duarte, T. T., Ellis, W., & Maler, L. (2012). Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: II. Extrinsic connections. *Journal of Comparative Neurology*, 520(15), 3338-3368.

Giassi, A. C., Duarte, T. T., Ellis, W., & Maler, L. (2012). Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: II. Extrinsic connections. *Journal of Comparative Neurology*, 520(15), 3338-3368.

Glover, K. A., Skilbrei, O. T., Skaala, Ø., & Nilsen, F. (2017). "Does domestication cause changes in growth reaction norms? A study of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon families exposed to environmental stress." *PLOS ONE*, 12(9), e0184979.

Glover, L. R., Schoenfeld, T. J., Karlsson, R. M., Bannerman, D. M., & Cameron, H. A. (2017). Ongoing neurogenesis in the adult dentate gyrus mediates behavioral responses to ambiguous threat cues. *PLoS biology*, 15(4), e2001154.

Goings, G. E., Sahni, V., & Szele, F. G. (2004). Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Research*, 996(2), 213-226.

Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 431-442.

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*, 80(8), 2390-2394.

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*, 80(8), 2390-2394.

Gómez-Laplaza, L. M., & Morgan, E. (1991). Aggressive behavior in the three-spined stickleback: The interaction of mirror image stimulation and prior experience. *Behaviour*, 119(1-2), 115-127.

Gonda, A., Herczeg, G., & Merilä, J. (2011). Population variation in brain size of nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*)-local adaptation or environmentally induced variation?. *BMC evolutionary biology*, 11, 1-11.

González-Granero, S., Lezameta, M., & García-Verdugo, J. M. (2011). Adult neurogenesis in reptiles. *Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology*, 169-189.

Gorka, S. M., Nelson, B. D., Phan, K. L., & Shankman, S. A. (2016). Insula response to unpredictable and predictable aversiveness in individuals with panic disorder and comorbid depression. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 1(6), 541-550.

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.

Graziadei, P. P., & Metcalf, J. F. (1971). Autoradiographic and electron microscopic studies of postnatal neurogenesis in the olfactory bulb of mice. *Brain Research*, 32(1), 99-109.

Hainsworth, F. R., Wilson, L. L., & Barnard, J. A. (1967). Effects of telencephalic ablation on discriminative behavior in the goldfish. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 64(2), 206-209.

Hannes, S. N., & Frank, E. (1983). The recruitment interview: A semi-directive method for eliciting cognitive maps. *European Journal of Operational Research*, 14(1), 55-69.

Harvey-Girard, E., Giassi, A. C., Ellis, W., & Maler, L. (2012). Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: IV. Expression of conserved transcription factors and implications for the evolution of dorsal telencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 520(15), 3395-3413.

Harvey-Girard, E., Giasson-Gariépy, K., Lepage, M., Simard, S., Billard, C., & Després, O. (2013). Serotonin modulates the locomotor network underlying swimming in the neonatal rat. *Journal of Neurophysiology*, 110(1), 164-175.

Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., & Otteson, D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in retinal and eye research*, 23(2), 183-194.

Hodos, W., & Butler, A. B. (1997). Evolution of sensory pathways in vertebrates. *Brain, Behavior and Evolution*, 50(4), 189-197.

Hotta, K., Funato, H., Nakamura, T., & Sato, T. (2020). "Fish memory: A new model for memory research." *Neuroscience Research*, 151, 1-10.

Ibi, D., Takuma, K., Koike, H., Mizoguchi, H., Tsuritani, K., Kuwahara, Y., ... & Yamada, K. (2008). Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *Journal of neurochemistry*, 105(3), 921-932.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., ... & Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10), 1153-1161.

Jarvis, E. D. (2004). Learned birdsong and the neurobiology of human language. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1016(1), 749-777.

Jessberger, S., Gage, F. H., Eisch, A. J., & Lagace, D. C. (2009). Regenerative neurogenesis: Origins, mechanisms, and implications. *Developmental Neurobiology*, 69(5), 387-395.

Kaslin, J., Ganz, J., & Brand, M. (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1489), 101-122.

Kaslin, J., Ganz, J., Geffarth, M., Grandel, H., Hans, S., Brand, M., ... & Wurst, W. (2008). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *Journal of Neuroscience*, 28(21), 6156-6166.

Kazanis, I. (2013). The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain: How plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed. *Brain*, 136(6), 1741-1764.

Kempermann, G. (2012). New neurons for 'survival of the fittest'. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 727-736.

Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). New nerve cells for the adult brain. *Scientific American*, 280(5), 48-53.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493-495.

Kihslinger, R. L., Lema, S. C., & Nevitt, G. A. (2006). Environmental rearing conditions produce forebrain differences in wild Chinook salmon *Oncorhynchus*

tshawytscha. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(2), 145-151.

Kirn, J. R., & Alvarez-Buylla, A. (2003). Birth and death of cells in brain song nuclei of canaries: a role for apoptosis. *Journal of Comparative Neurology*, 467(1), 48-56.

Kishimoto, J., Tsuchida, Y., Ueda, T., & Nakayama, H. (2011). Neural plasticity underlying acquisition of a new operant behavior in zebrafish. *Journal of Neurochemistry*, 119(1), 81-88.

Kishimoto, N., Shimizu, K., & Sawamoto, K. (2012). Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease models & mechanisms*, 5(2), 200-209.

Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K., & Sawamoto, K. (2012). Protocols for studying adult neurogenesis: insights and recent advances. *Methods in molecular biology*, 814, 291-304.

Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K., & Sawamoto, K. (2012). Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease Models & Mechanisms*, 5(2), 200-209.

Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K., & Sawamoto, K. (2012). Protocols for studying adult neurogenesis: insights and recent advances. *Methods in molecular biology*, 814, 291-304.

Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V., & Brand, M. (2012). Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Developmental neurobiology*, 72(3), 429-461.

Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., & Sawamoto, K. (2010). Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*, 28(3), 545-554.

Kotrschal, A., Rogell, B., Bundsen, A., Svensson, B., Zajitschek, S., Brännström, I., ... & Kolm, N. (2013). Artificial selection on relative brain size in the guppy reveals costs and benefits of evolving a larger brain. *Current Biology*, 23(2), 168-171.

Kotrschal, A., Rogell, B., Maklakov, A. A., & Kolm, N. (2014). Sex-specific plasticity in brain morphology depends on social environment of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(6), 981-988

Kranz, D., & Richter, W. (1970). Autoradiographic studies on the synthesis of DNA in the cerebellum and medulla oblongata of teleosts of various ages. *Zeitschrift für Mikroskopisch-anatomische Forschung*, 82(2), 264-292.

Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831-4841.

Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831-4841.

Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831-4841.

Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831-4841.

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. *Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027-2033.

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. *Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027-2033.

Kumar, S., & Mondal, A. C. (2018). Potential regulators of adult neurogenesis in the zebrafish brain. *Frontiers in neuroscience*, 12, 777

Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., ... & Brand, M. (2014). Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science*, 344(6189), 432-436.

Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., & Brand, M. (2012). Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science*, 338(6112), 1353-1356.

Kyritsis, N. (2012). Acute Inflammation Initiates the Regenerative Response in the Adult Zebrafish Brain. *Science (New York, N.Y.)* 338 (6112): 1353–56. doi:10.1126/science.1228773.

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, 525.

Lal, P., Tanabe, H., & Suster, M. L. (2018). A spatiotemporal analysis of memory formation in the larval zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, 96.

Lal, P., Tanabe, H., Suster, M. L., Ailani, D., Kotani, Y., Muto, A., ... & Kawakami, K. (2018). Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish. *BMC biology*, 16, 1-18.

Lal, P., Tanabe, H., Suster, M. L., Ailani, D., Kotani, Y., Muto, A., ... & Kawakami, K. (2018). Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish. *BMC biology*, 16, 1-18.

Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., van Praag, H., ... & Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology*, 4(12), e409.

Laplagne, D. A., Kamienkowski, J. E., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Zhao, C., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 2973-2981.

Lam, D., Schuck, A., Gaspersz, J., & Claassen, J. A. (2006). Risk factors for delirium in acutely admitted elderly patients: a prospective cohort study. *BMC Geriatrics*, 6(1), 6.

Leduc, A. O. H. C., Rohr, J. R., & Berrigan, D. (2013). "Impacts of temperature variability on fish performance and implications for aquaculture." *Journal of Applied Ecology*, 50(1), 51-58.

Lepousez, G., Valley, M. T., Lledo, P. M., & Gheusi, G. (2015). Adult neurogenesis and sensory processing in the olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, 41(6), 1-9.

Liedvogel, M., & Mouritsen, H. (2010). Cryptochromes—a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know? *Journal of the Royal Society Interface*, 7(suppl_2), S147-S162

Lim, J. H. A., Stafford, B. K., Nguyen, P. L., Lien, B. V., Wang, C., Zukor, K., ... & Huberman, A. D. (2016). Neural activity promotes long-distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nature neuroscience*, 19(8), 1073-1084.

Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2014). Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Developmental neurobiology*, 74(11), 1053-1077.

Lindsey, B. W., Aitken, G. E., Tang, J. K., Khabooshan, M., Douek, A. M., Vandestadt, C., & Kaslin, J. (2019). Midbrain tectal stem cells display diverse regenerative capacities in zebrafish. *Scientific Reports*, 9(1), 1-20.

Lindsey, B. W., Darabie, A. A., & Tropepe, V. (2012). The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 520(11), 2275-2316.

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., & Álvarez-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*, 90(5), 2074-2077.

Lois, C., & Álvarez-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*, 90(5), 2074-2077

Lois, C., & Álvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.

Lombardi Brandão, M., Brandão, R., Coimbra, N. C., & Oliveira, A. R. (2015). Theoretical and methodological basis of the elevated T-maze. *The Open Behavioral Science Journal*, 9(1), 11-29.

Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2017). Sex differences in spatial abilities and cognitive flexibility in the guppy. *Animal Behaviour*, 123, 53-60.

Lust, K., & Tanaka, E. M. (2018). Regeneration in axolotls: A model to aim for! *Experimental Cell Research*, 368(2), 221-228.

Lust, K., & Tanaka, E. M. (2019). A comparative perspective on brain regeneration in amphibians and teleost fish. *Developmental neurobiology*, 79(5), 424-436.

Mackay-Sim, A., & Patel, A. (1984). Continuous proliferation of germinal cells in the olfactory epithelium. *Cell and Tissue Research*, 235(3), 581-586.

Magnusson, J. P., Göritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D. O., Smith, E. M., Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science*, 346(6206), 237-241.

Manuel, R., Gorissen, M., & Zethof, J. (2014). "Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*): a review." *Journal of Comparative Psychology*, 128(3), 215-231

Maren, S. (2003). Fear conditioning and the amygdala. *Learning & Memory*, 10(6), 275-285.

Maren, S. (2008). Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *European Journal of Neuroscience*, 28(8), 1661-1666.

März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesi, B., Takamiya, M., ... & Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia*, 58(7), 870-888.

Matsuda, M., Yamanouchi, K., Nishihara, M., & Ogita, K. (1993). Inhibitory effect of chronic administration of a specific dopamine D1 receptor antagonist, SCH23390, on the development of behavioral sensitization induced by repeated administration of methamphetamine. *Brain Research*, 608(1), 105-110.

Mayer, U., Woldt, E., & Seeger, J. (2011). Adipocyte-brain connection: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) modulate adipocyte metabolism and gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 39615-39625.

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.

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.

Minelli, G., & Quaglia, A. (1968). The migration of olfactory nerve cells: a study with [3H] thymidine in the chick embryo. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 91(4), 552-560.

Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28(1), 223-250.

Ming, G. L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687-702.

Mongiat, L. A., & Schinder, A. F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1055-1061.

Moscarello, J. M., & LeDoux, J. E. (2013). Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. *Journal of Neuroscience*, 33(9), 3815-3823.

Mouriec, K., Gueguen, M. M., Manuel, C., Percevault, F., Thieulant, M. L., Pakdel, F., & Kah, O. (2008). Androgens upregulate cyp19a1b (aromatase B) gene

expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. *Biology of reproduction*, 78(1), 35-42.

Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2009). An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain, behavior and evolution*, 74(1), 30-42.

Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2009). BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies indicate neurogenesis in the adult brain of teleost fish (Cyprinidae). *Developmental Brain Research*, 198(2), 199-203. NIHMSID: NIHMS347908

Nottebohm, F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Science*, 229(4714), 734-740.

Ohab, J. J., Fleming, S., Blesch, A., & Carmichael, S. T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *Journal of Neuroscience*, 26(50), 13007-13016.

Otsuki, L., & Brand, A. H. (2020). Quiescent neural stem cells for brain repair and regeneration: lessons from model systems. *Trends in neurosciences*, 43(4), 213-226.

Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K. G. T., Pottinger, T. G., Korzan, W., Summers, C. H., & Nilsson, G. E. (2002). Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(4), 396-407.

Overniew, P., & Currow, J. (1969). Effects of telencephalic ablations on odor discrimination in the goldfish. *Physiology & Behavior*, 4(2), 265-267.

Parent, J. M., Vexler, Z. S., Gong, C., Derugin, N., & Ferriero, D. M. (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Annals of Neurology*, 52(6), 802-813.

Paton, J. A., & Nottebohm, F. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225(4666), 1046-1048.

Perathoner, S., Cordero-Maldonado, M. L., & Crawford, A. D. (2016). Loss of adenosine receptor A2ab causes abnormal visual axonal projections and chiasmatic commissure defects. *Neural Development*, 11(1), 5

Piatti, V. C., Esposito, M. S., & Schinder, A. F. (2011). The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*, 17(1), 43-58. PMID: PMC3256745 PMID: 17878717

Polenov, A. L., & Chetverukhin, V. K. (1993). [Proliferative potential of the ependyma and the subependymal zone of the brain in adult mammals]. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*, 104(5), 5-13.

Portavella, M., & Vargas, J. P. (2005). Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *European Journal of Neuroscience*, 21(10), 2800-2806.

Portavella, M., Salas, C., & Vargas, J. P. (2002). "Spatial learning and memory deficits induced by exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish (*Danio rerio*)." *Behavioural Brain Research*, 133(2), 203-209.

Portavella, M., Torres, B., & Salas, C. (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *Journal of Neuroscience*, 24(9), 2335-2342.

Portavella, M., Torres, B., & Salas, C. (2004a). Avoidance response in goldfish: neural and behavioral correlates. *Neuroscience*, 126(3), 767-776.

Portavella, M., Torres, B., & Salas, C. (2004b). Involvement of the telencephalic pallium in spatial discrimination tasks in the goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroscience Letters*, 360(3), 119-122.

Portavella, M., Torres, B., & Salas, C. (2005). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *Journal of Neuroscience*, 25(16), 4437-4445.

Portavella, M., Vargas, J. P., & Torres, B. (2003). *Salmo salar* and the time-place learning: experimental analysis of the effects of lesions to the telencephalic pallium on a time-place association task. *Neuroscience*, 119(1), 119-128.

Portavella, M., Vargas, J. P., & Torres, B. (2004). Olfactory and non-olfactory projections of the teleost telencephalon. *Brain Research Bulletin*, 63(4), 301-307.

Portavella, M., Vargas, J. P., Torres, B., & Salas, C. (2004). "The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish." *Brain Research Bulletin*, 63(5), 467-473. Published online 2007 Sep 20. doi: 10.1159/000108610

Powers, A. S. (2016). Plasticity and adult neurogenesis in amphibians and reptiles: more questions than answers. *Brain, Behavior and Evolution*, 87(3), 175-183.

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, 362-367.

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, 362-367.

Rakic, P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227(4690), 1054-1056.

Ramirez, S., Liu, X., Lin, P. A., Suh, J., Pignatelli, M., Redondo, R. L., ... & Tonegawa, S. (2015). Creating a false memory in the hippocampus. *Science*, 341(6144), 387-391.

Raymond, J. L., Lisberger, S. G., & Mauk, M. D. (2004). The cerebellum: a neuronal learning machine? *Science*, 301(5640), 163-166.

Rey, S., Lefrançois, C., Briand, C., & Severe, A. (2019). "Fish cognition to safeguard biodiversity." *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 337.

Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707-1710.

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(18), 8591-8595.

Richter, K., & Kranz, D. (1981). DNA synthesis in the germinal layer of the olfactory bulb in rats. A light and electron microscopic autoradiographic study. *Cell and Tissue Research*, 216(2), 253-267.

Richter, W., & Kranz, D. (1970). Radioautographic studies on the dependence of the 3H-thymidine index on age in the matrix-layers of the telencephalon of *Lebistes reticulatus* (Teleostei). *Zeitschrift für Mikroskopisch-anatomische Forschung*, 81(3), 530-554.

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. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2894-2903.

Rodríguez Viales, R., Diotel, N., Ferg, M., Armant, O., Eich, J., Alunni, A., ... & Kricha, S. (2015). The helix-loop-helix protein *id1* controls stem cell proliferation during regenerative neurogenesis in the adult zebrafish telencephalon. *Stem Cells*, 33(3), 892-903.

Rothenaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., ... & 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*, 138(8), 1459-1469.

Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857), 1328-1331.

Salas, C., Broglio, C., Durán, E., Gómez, A., Ocana, F. M., Jimenez-Moya, F., & Rodriguez, F. (2006). Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish*, 3(2), 157-171.

Sanchez-Gonzalez, R., Koupourtidou, C., Lepko, T., Zambusi, A., Novoselc, K. T., Durovic, T., ... & Ninkovic, J. (2022). Innate immune pathways promote oligodendrocyte progenitor cell recruitment to the injury site in adult zebrafish brain. *Cells*, 11(3), 520.

Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Development*, 8(1), 3.

Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2014). Neurogenesis in zebrafish—From embryo to adult. *Neural Development*, 9(1), 1-21.

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. *Journal of Neuroscience*, 13(6), 2351-2358.

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

Simmons, A. M., Horowitz, S. S., & Brown, R. A. (2007). Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the adult bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Behavior and Evolution*, 71(1), 41-53.

Singer, M. (1952). The influence of the nervous system on regeneration and transplantation. *The Quarterly Review of Biology*, 27(2), 169-200.

Sîrbulescu, R. F., Ilieş, I., & Zupanc, G. K. (2009). Structural and functional regeneration after spinal cord injury in the weakly electric teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 195, 699-714.

Skaggs, K., Goldman, D., & Parent, J. M. (2014). Excitotoxic brain injury in adult zebrafish stimulates neurogenesis and long-distance neuronal integration. *Glia*, 62(12), 2061-2079.

Sørensen, C., Johansen, I. B., & Øverli, Ø. (2013). Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *General and comparative endocrinology*, 181, 25-34.

Sørensen, C., Johansen, I. B., & Øverli, Ø. (2013). Physiology of social stress in fishes. *The physiology of fishes*, 4, 289-325.

Sørensen, C., Nilsson, G. E., Summers, C. H., & Øverli, Ø. (2012). Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Behavioural brain research*, 227(2), 311-318.

Strobl-Mazzulla, P. H., Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2010). Histone demethylase Jmjd2A regulates neural crest specification. *Developmental cell*, 19(3), 460-468.

Stukaneva, M. I., & Puschina, E. V. (2020). Features of adult neurogenesis in the mammalian brain. *Neurochemical Journal*, 14(1), 5-15.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., & Sawatari, E. (2002). "A method for the production of triploid gibel carp *Carassius auratus langsdorffii* by heat shock." *Fisheries Science*, 68(3), 640-642.

Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke*, 38(11), 3032-3039.

Tozzini, E. T., Baumgart, M., Battistoni, G., & Cellerino, A. (2012). Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging cell*, 11(2), 241-251.

Tseng, A. M., Airey, D. C., Miller, R. D., Zhang, H., Wang, Y., & Hsu, E. W. (2010). Statistical analyses of neuronal responses evoked by electrical stimulation: A comparative study. *Journal of Neuroscience Methods*, 193(2), 261-270.

Valzelli, L. (1973). The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia*, 31(4), 305-320.

van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in Neurosciences*, 32(5), 283-290.

van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2002). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(1), 82-90.

van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2002). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(1), 82-90.

Vargas, J. P., López, J. C., & Portavella, M. (2009). What are the functions of fish brain pallium?. *Brain research bulletin*, 79(6), 436-440.

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(8), 3302-3315.

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(8), 3302-3315.

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(9), 3302-3315

Warren, J. M. (1961). The effect of unilateral telencephalic ablation on predator avoidance in the guppy (*Lebistes reticulatus*). *Behaviour*, 17(3/4), 203-215.

Weinberger, N. M., & Martinez, J. L. (1992). Neuronal plasticity in auditory cortex: Shifts in receptive fields and enhancement of inhibitory mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 12(2), 462-472.

Wilson, A. D., & Godin, J. G. J. (2010). Boldness and intermittent locomotion in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Behavioral Ecology*, 21(1), 57-62.

Winocur, G. (1997). Functional architecture of memory: New insights from brain imaging studies. *Canadian Journal of Experimental Psychology/Revue canadienne de psychologie expérimentale*, 51(2), 88-104.

Wongwitdecha, N., & Marsden, C. A. (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behavioural brain research*, 75(1-2), 27-32.

Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., & Miwa, M. (2000). "In vitro production of fish offspring from cultured spermatogonial stem cells." *Science*, 290(5499), 297-299.

Zambusi, A., & Ninkovic, J. (2020). Regeneration of the central nervous system-principles from brain regeneration in adult zebrafish. *World journal of stem cells*, 12(1), 8.

Zambusi, A., de Carvalho, T. S., Machado, B. H., & Zoccal, D. B. (2020). Ventrolateral medullary respiratory network dysfunction in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 326, 113204

Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2006). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-660.

Zhukov, O. V., Bondarev, D. L., Yermak, Y. I., & Fedushko, M. P. (2019). Effects of temperature patterns on the spawning phenology and niche overlap of fish assemblages in the water bodies of the Dnipro River basin. *Ecologica Montenegrina*, (22), 177-203.

Zupanc, G. K. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, Behavior and Evolution*, 58(4), 250-275

Zupanc, G. K. (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of Comparative Physiology A*, 192(6), 649-670

Zupanc, G. K. (2008). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *Journal of physiology-paris*, 102(4-6), 357-373.

Zupanc, G. K. H., Sîrbulescu, R. F., & Zupanc, M. M. (2012). Dynamics and plasticity of the self-assembling adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(4), 737-745.

Zupanc, G. K., & Clint, S. C. (2003). Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia*, 43(1), 77-86.

Zupanc, G. K., & Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 213-233.

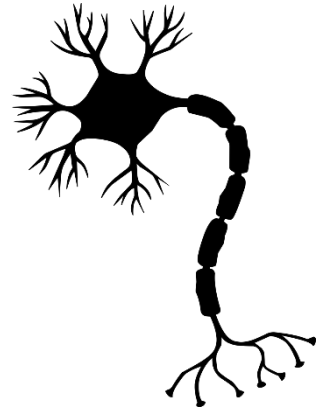
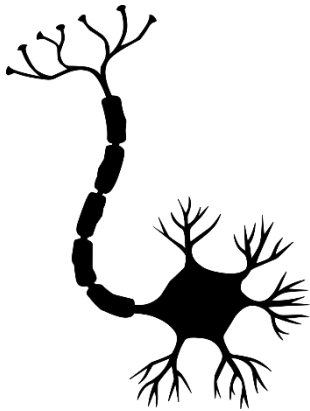
Zupanc, G. K., & Sîrbulescu, R. F. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European journal of neuroscience*, 34(6), 917-929.

Zupanc, G. K., & Zupanc, M. M. (1992). Cell proliferation in the adult lateral line system of a teleost fish and its regulation by acoustic trauma. *Journal of Neuroscience*, 12(6), 2491-2503.

Zupanc, G. K., Hinsch, K., & Gage, F. H. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 488(3), 290-319.

Zupanc, G. K., Horschke, I., Puzdrowski, R. L., & Otten, A. D. (2005). Cell proliferation in the adult fish brain: regional differences and effect of lesions. *Brain, Behavior and Evolution*, 66(4), 268-276.

APÉNDICE



APÉNDICE

Abreviaturas utilizadas por orden alfabético:

BA: Buenos aprendedores

MA: Malos aprendedores}

EA: evitación activa

C: Grupo control

A: Aislamiento

MCP: Memoria de corto plazo

MLP: Memoria de largo plazo

Dm: Región dorso-medial del telencéfalo de peces teleósteos

DI: Región dorso-lateral del telencéfalo de peces teleósteos

Vd: Región ventricular del telencéfalo de peces teleósteos

AS: Aislamiento social

AE: Ambiente enriquecido

DPL: Días post lesión

Smnpl: Semanas post lesión

SNC: Sistema nervioso central

SVZ: del inglés "Sub Ventricular Zone"; Zona sub ventricular del telencéfalo

SGZ: del inglés "Sub granular Zone"; Zona sub granular

GD: Giro dentado del Hipocampo



Social isolation impairs active avoidance performance and decreases neurogenesis in the dorsomedial telencephalon of rainbow trout



Maria Soledad Ausas^{a,b,1}, Laura Mazzitelli-Fuentes^{a,b,1}, Fernanda Ruth Roman^{a,b},
Sonia Alejandra Crichigno^c, Ana Paula De Vincenti^d, Lucas Alberto Mongiat^{a,b,*}

^a Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), Universidad Nacional del Comahue – CONICET, San Carlos de Bariloche, Argentina

^b Departamento de Física Médica, Centro Atómico Bariloche, CNEA – CONICET, San Carlos de Bariloche, Argentina

^c Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), Universidad Nacional del Comahue – CONICET, San Carlos de Bariloche, Argentina

^d Laboratorio de Neurociencia Molecular y Celular, Instituto de Biología Celular y Neurociencia (IBCN)-Universidad de Buenos Aires - CONICET, Argentina

ABSTRACT

Alterations in the social environment, such as isolating an individual that would normally live in a social group, can generate physiological responses that compromise an individual's capacity to learn. To investigate this, we tested whether social isolation impairs learning skills in the rainbow trout. We show that rainbow trout can achieve an active avoidance (AA) learning program with inter-individual variability. Moreover, c-Fos expression in dorsomedial telencephalon (Dm) correlates with the AA performance, indicating that this structure is involved in this cognitive task. Given that Dm participates in AA learning and this region is under plastic remodelling by addition of new-born neurons, we tested whether social isolation impinges on adult neurogenesis and, consequently, on the Dm cognitive outcome. Trout were reared for four weeks in control or isolated conditions. We found that social isolation diminished the percentage of adult-born neurons that are being incorporated into Dm network. Interestingly, the same isolation treatment also induced a severe deficit in the AA performance. Our results demonstrate a structure-to-function relationship between the Dm and the learning ability in an AA task, indicate that social isolation reduces the incorporation of adult-born neurons into Dm, and show that social isolation impairs the Dm-related cognitive function.

1. Background

During life, the social environment significantly influences the neurochemical balance and connectivity of the brain and in consequence the organisation of behaviour. This phenomenon seems to be conserved across vertebrates evolution. For example, rodents reared in social isolation show altered cognitive performance, with a decrease in the synapse number, impaired myelination, reduction of adult neurogenesis, and perturbation on neurochemical balance [1–5]. On the other hand, it has been shown that social isolation impairs a T-maze associative learning performance in a social cichlid fish [6], and alters thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish [7]. Moreover, rainbow trout under social stress exhibit a decrease in the proliferation of telencephalic neuronal progenitors [8], whereas social isolation decreases cell addition in the diencephalic ventricles of adult electric fish [9]. However, these studies did not address the problem in a circuit-to-function context, making it difficult to understand how social isolation affects neural networks. In this paper we aimed to relate a rainbow trout telencephalic region with a behavioural outcome, in order to explore plastic modifications induced by social isolation in both cognitive function and the related neuronal substrates.

Experimental data have shown that learning and memory systems are more conserved throughout evolution than previously thought, with teleost fish relying on homologous neural substrates for learning and memory processes as mammals [10]. For example, the amygdala and the hippocampus play an important role in the acquisition and retention of conditioned avoidance behaviour [11–15]. In teleosts, molecular and behavioural studies suggest that the telencephalic dorsomedial (Dm) region shares homology with the basolateral amygdala of mammals [10,16–18], whereas the dorsolateral (Dl) telencephalic region is proposed to share homology with the mammalian hippocampus [17,19,20].

The active avoidance (AA) paradigm is a delay conditioning variant procedure, that involves both emotional and temporal associations in order to relate a conditioning signal (neutral cue) with a subsequent and overlapped unconditioned stimulus (aversive cue). In consequence, fish learn to avoid the aversive side of an experimental tank by swimming to the safe one. This behavioural paradigm has been tested on a number of teleost fish [16,21–24]. Interestingly, the Dm region has been found to be relevant to achieve an associative learning in the AA paradigm [16,25,26], and also is known to be subjected to a continuous network remodelling by the addition of adult-born neurons [8,27–29].

* Corresponding author at: Departamento de Física Médica, Centro Atómico Bariloche, CNEA – CONICET, San Carlos de Bariloche, Argentina.

E-mail address: lucas.mongiat@cab.cnea.gov.ar (L.A. Mongiat).

¹ Equally contributed.

For these reasons, in this work we evaluated the rainbow trout's ability to learn an AA task, we linked this cognitive task to Dm region activity, and finally we assessed whether isolation modifies adult neurogenesis in Dm, and consequently the behavioural performance in the AA test.

2. Methods

2.1. Subjects

Adult hatchery-bred rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were supplied by the Centro de Salmonicultura Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina. Adult trout of approximately 1.5 years old were used (228 ± 22 g, mean weight \pm SD). Experimental individuals were reared in constantly aerated water tanks under natural photoperiod, and fed daily with 1% of body weight. During experimental time water temperature ranged from 10 to 15 °C.

2.2. BrdU administration

Fish were anaesthetised by immersion in a low dose (50 mg/l) of benzocaine (Ethyl 4-aminobenzoate) and then BrdU (50 µg/g body weight) was administered by i.p. injection. BrdU was diluted at 20 mg/ml in sterile PBS-DMSO (1:1).

2.3. Housing

Experimental individuals were maintained under constant aerated stream water. Two different treatments were used: *Isolation (I)* and *Control (C)*. The *I* experimental individuals were housed individually in small net cages (in cm, $l = 36 \times w = 26 \times h = 18$) that allow fish to turn and change swimming direction. The *C* fish were housed in large tanks (in cm, $l = 150 \times w = 150 \times H = 60$), in groups of 10, and supplemented with artificial shelters. After 4 weeks of treatment, fish were placed again in the common tank during one extra week. At the end of the fifth week, swimming performance was evaluated in the "Novel Tank" test, and then cognitive ability was assessed in the AA paradigm.

2.4. Novel Tank (NT)

Fish were placed on a novel tank (in cm, $l = 80 \times w = 40 \times h = 30$) and swimming performance was recorded for 20 min. The upper portion of the tank was defined at 13,3 cm from the bottom of the tank. Swimming performance was analysed using IdTracker [29,30] and Matlab R2017a software.

2.5. Active avoidance (AA)

Individuals were trained in a delay fear conditioning variant, with a variable overlap time paradigm. In this protocol, the fish have to associate a white led light as a neutral stimulus (conditioned stimulus) with a mild electric shock as an aversive stimulus (unconditioned stimulus). For stimulation, we selected 3.5 mV as the lowest voltage that evoked an aversive response. Experimental tank (in cm, $l = 90 \times w = 45 \times h = 55$) was divided in two identical compartments by a 10×10 cm hurdle. The training protocol was adapted from other AA learning tasks described for different teleost species [16,23,31]. Experimental individuals were subjected to one training session per day during 3 successive days. Each learning session consisted of a maximum of 60 trials, each trial had a maximum duration of 30 s, and a 30 s inter-trial interval (ITI). To avoid the shock, fish had to cross the hurdle within 15 s after the onset of the light (Avoidance response). If the trout did not change to the safe side after 15 s, then an electric shock was delivered for a maximum of 15 s. When fish changed to the safe compartment, the light or the light + electric shock were immediately turned off. Note that both stimuli culminate at the same time. Each session concluded when the subject reached an 80% of avoidance

responses during the last ten trials or a maximum of 60 trials. The criterion for considering a fish as good learner, was to reach an 80% of avoidance responses in < 30 trials during the third session. Latencies, CS-US overlap, as well as the SD for the CS-US overlap for all learner fish used in this manuscript are shown in Supplementary Fig. 1C.

Short-term memory (STM) was evaluated 30 min after the third session, whereas long-term memory (LTM) was tested 24 h later. Memory tests consisted in a maximum of 30 trials in which only the conditioned stimulus (light) was presented.

2.6. Tissue fixation and Immunohistochemistry

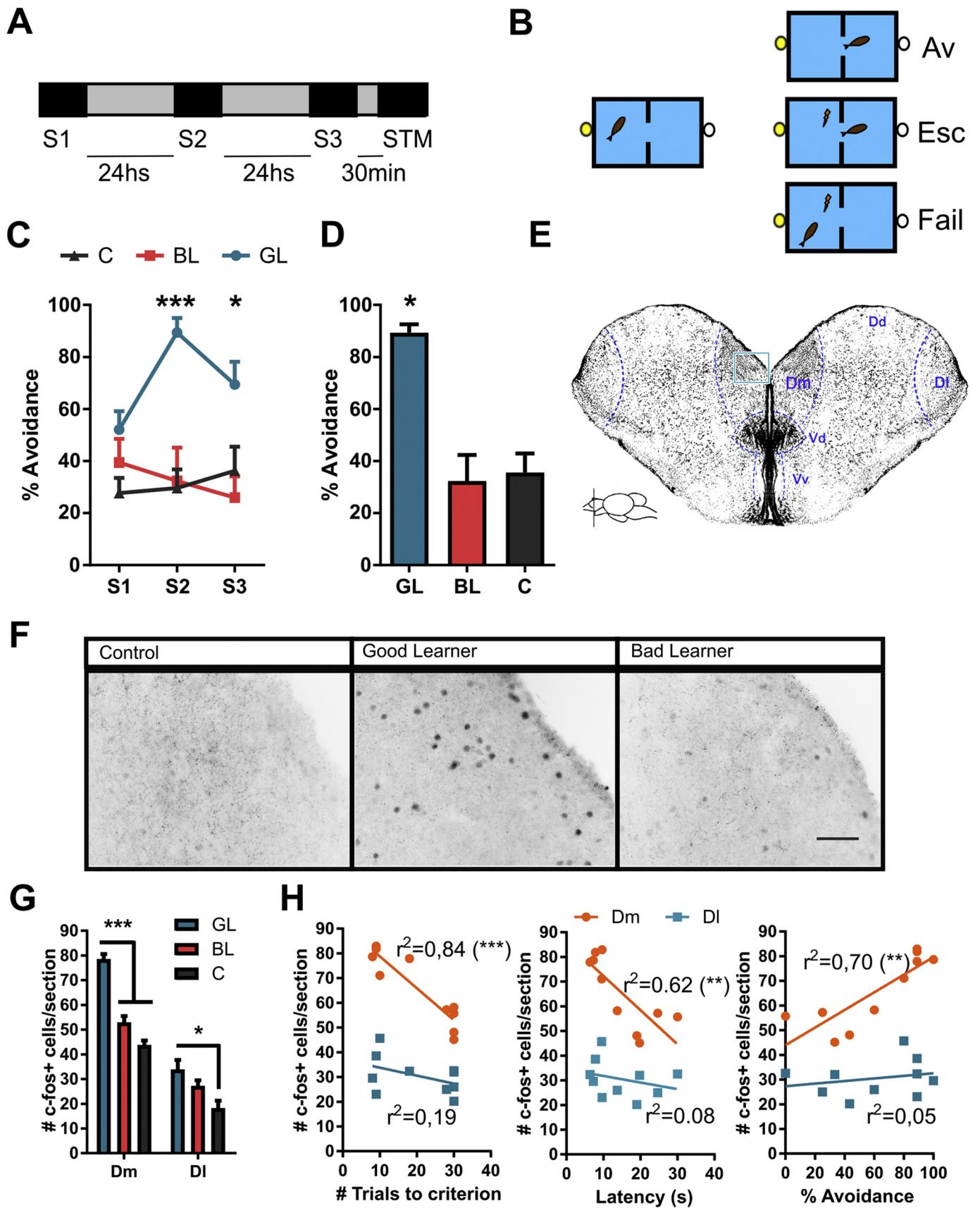
Ninety minutes after memory test, fish were deeply anaesthetised with 100 mg/l benzocaine and were intracardially perfused with 10 mM phosphate buffer (PBS) at 4 °C followed by 4% paraformaldehyde in 10 mM PBS. Brains were dissected, progressively dehydrated in 15% and 30% sucrose, frozen and stored at -20 °C. Telencephalic sections of 10 or 40 µm were cut on a cryostat (Microm, HM 550), and mounted on positively charged slides. Slides were rinsed three times with TBS (pH = 7.4) for 5 min, incubated with 0.05% sodium borohydride in ice-cold TBS for 15 min and rinsed three more times with TBS for 5 min. Then, slides were blocked with 6% bovine serum albumin in TBS for 1 h and incubated overnight at 4 °C with primary antibody diluted in 6% BSA in TBS. Then, they were washed with TBS four times for 5 min, and incubated with secondary antibody coupled to Cy2 or Cy3 (1:2000 dilution using 6% BSA in 0.3% TritonX-100/TBS) for 2 h at room temperature (RT). Sections were then washed six times (5 min each) in 0.3% TritonX-100/TBS, and mounted using DABCO-glycerol mounting medium. Finally, sections were dried overnight in the dark, and subsequently stored at 4 °C. When double immunostains were performed both primary antibodies were incubated at the same time. For BrdU immunodetection antigen retrieval was performed before blocking: 90 min in 50% formamide in 10 mM citrate buffer at 65 °C, then washed with sodium citrate for 15 min and incubated with 2 N HCl for 20 min at 37 °C, followed by 10 min neutralization in 0,1 M borate buffer (pH = 8,5). For PCNA immunostaining antigen retrieval was performed for 1 h (sodium citrate 10 mM at 60 °C, 3×5 min TBS wash) before incubation with the blocking solution. Antibodies used were: rabbit polyclonal anti-*c-Fos* 1:1000 (sc-253, Santa Cruz Biotechnology, Inc., raised against a peptide mapping within an internal region of *c-Fos* of human origin), rat monoclonal anti-*BrdU* 1:500 (ab6326, Abcam), mouse monoclonal anti-*PCNA* 1:400 (PC10, Dako, raised against a recombinant PCNA of human origin), rabbit monoclonal anti-*NeuN* 1:500 (ab177487, Abcam, raised against a synthetic peptide within human NeuN aa 1–100). Secondary antibodies were obtained from Jackson Immunoresearch Labs, Inc. For quantification analysis 5 telencephalic sections spaced 200 µm apart were used for each fish. Anatomical telencephalic regions were depicted in accordance with Folgueira and coworkers, 2004 [32,33].

2.7. Western blot

After 90 min of behavioural assays, rainbow trout were euthanised and telencephalon were dissected and mechanically lysed at 4 °C in TNE buffer (25 mM Tris-ClH [pH 7.4]; 1 mM EDTA; 137 mM NaCl) containing 0.5% Triton X-100, plus protease and phosphatase inhibitors. Proteins lysates were clarified by centrifugation and analysed by western blotting in a SDS-PAGE. The blots were scanned in a Storm 845 PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences).

2.8. Ethics

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 [34]. Fish are at the centre of our research



(caption on next page)

Fig. 1. Active avoidance (AA) learning in rainbow trout.

A) Time schedule for AA training. Each fish was trained for three daily sessions. Each session consisted of a maximum of 60 trials, separated by a 30-s ITI. The tests to analyse retrieval of trained avoidance behaviour was performed 30 min after the last training.

B) Schematic top view of the AA training. A LED light was presented as the conditioned cue for a maximum of 15 s in the compartment where fish were located. Three reaction types were observed. “Av”: the fish successfully crossed the hurdle avoiding the mild electric shock delivered as punishment. “Esc”: describes fish that received the punishment but subsequently escaped from that compartment within the 15 s. “Fail”: describes fish that neither avoided nor escaped during the whole trial of 30 s.

C) Percentage of Avoidance responses throughout learning sessions. C, control group; GL, good learners; BL, bad learners. Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(2, 12)} = 12.22$, $p = .0013$, Sidak's multiple comparisons test: *** $p < .0001$ for GL vs C, and for GL vs BL; * $p < .05$ for GL vs C, and for GL vs BL.

D) Short Term Memory Test (STM). Percentage of Avoidance responses 30 min after S3 in the absence of the aversive stimulus. One-way ANOVA, group effect $F_{(2, 12)} = 18.85$, $p = .0002$, Holm-Sidak's multiple comparisons test * denotes $p < 0.001$ for GL vs C and for GL vs BL.

E) Schematic view of cross section of rostral telencephalon labelled with fluorescent Nissl stain NeuroTrace®. Blue dashed lines delimit anatomical regions. Sagittal view of the telencephalon (bottom left) indicates the level of cross section. Boxed area is shown magnified in (F).

F) Optical sections of rainbow trout's Dm telencephalon (left hemisphere) depicting c-Fos expression 90 min after the STM session. Scale bar: 50 μm .

G) Number of cells expressing c-Fos in Dm and Dl of GL, BL and C trout. As no differences were found along the rostro-caudal axis the analysis show the mean value of Dm and Dl c-Fos along this axis. Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(2, 12)} = 72.89$ with $p < .0001$, region effect $F_{(1, 12)} = 148.7$ with $p < .0001$. Sidak's multiple comparisons test, *** denotes $p < .0001$ for GL vs C and BL, whereas * denotes $p < .005$ for GL vs C.

H) The number of cells expressing c-Fos correlates with AA learning performance. Three learning parameters were assessed: number of trials, latency to change compartment, and percentage of Avoidance responses. Pearson's correlation index is informed for each analysis, *** denotes $p < .0005$ and ** denotes $p < .001$.

and we have taken all possible measurements to reduce the number of experimental organisms. The authors declare no conflict of interests in this article.

3. Results

To assess rainbow trout's cognitive ability, individuals were trained in an active avoidance (AA) paradigm, see the Methods section for a detailed description (Fig. 1A, B). As control condition (C), trout were subjected to the AA training but the aversive stimulus was omitted. The C group showed no improvement in performance across sessions and failed the memory test. In the AA trained group, we found that a 50% of individuals exhibited a good learner (GL) performance whereas the other half performed as bad learners (BL) (Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(2, 12)} = 12.22$, $p = .0013$, $n = 5$ for each group), see Fig. 1C, D. Thirty minutes after the third session, a short- memory test (STM) was performed by omitting the aversive stimulus. We found that GL retained the learned rule and performed an $89.33 \pm 3.17\%$ of avoidance responses, whereas the C and BL groups exhibited less than a 36% of avoidance responses (ANOVA $F_{(2, 12)} = 18.85$, $p = .0002$, $n = 5$ for each group), see Fig. 1D (and Supp. Fig. 1C). Also, GL subjects performed better than the C and BL, and showed improvements in AA STM when different parameters were evaluated: number of trials to reach criterion, latency to switch into the safe chamber, and number of errors (Supp. Fig. 1A, B).

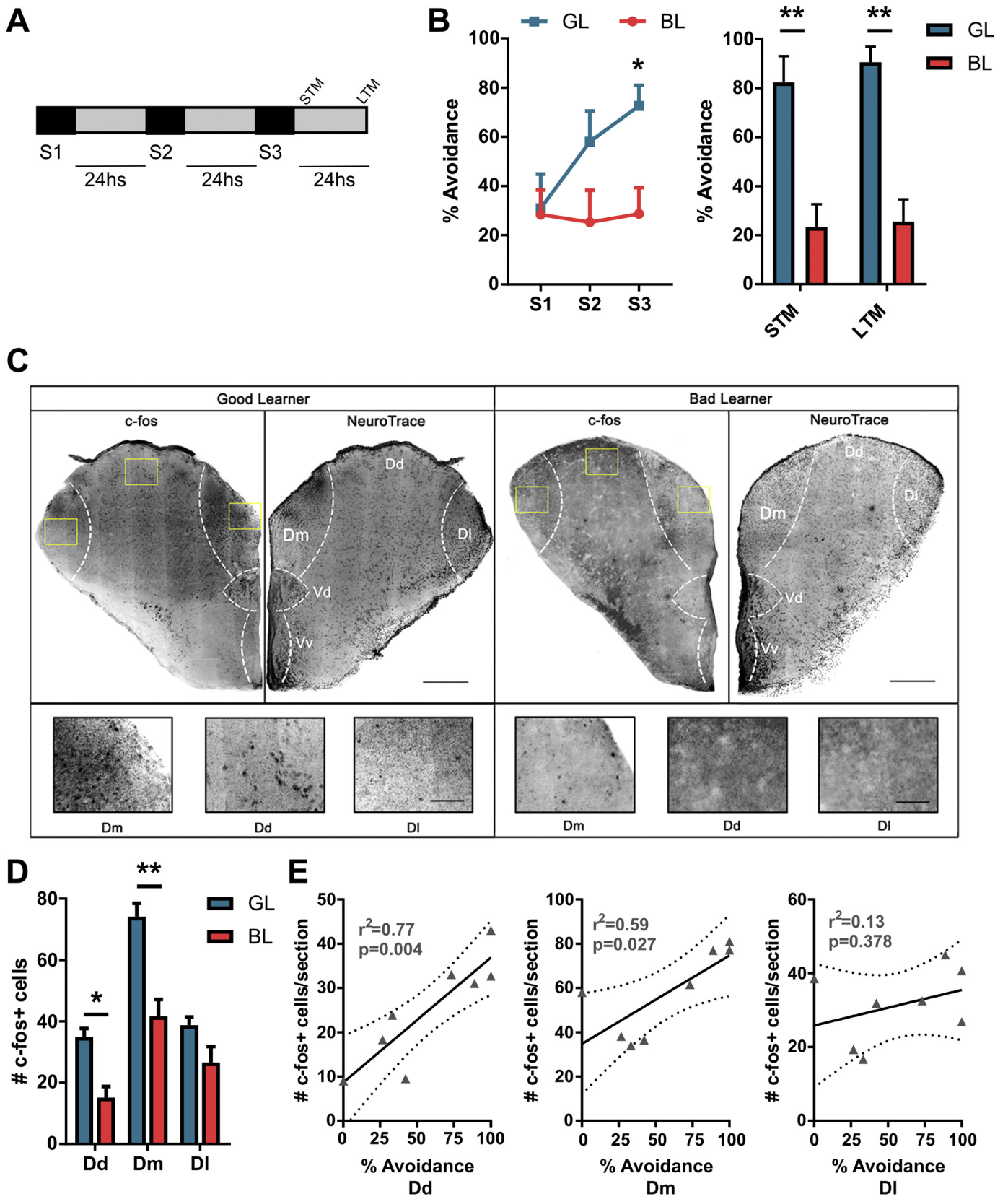
Given that Dm telencephalic region was demonstrated to be necessary for AA behaviour in goldfish [16,25,35] and zebrafish [26], we evaluated the involvement of Dm telencephalon during this cognitive process. For this purpose, 90 min after the memory test we evaluated the expression of the immediate early gene c-Fos, as a marker of neuronal activity [18,36]. The specificity of the c-Fos antibody was tested by western blot on telencephalic extracts from control and stressed trout, 90 min after each experimental condition (Supp. Fig. 2a). Fig. 1E illustrates the anatomical divisions of trout telencephalon, as well the rostro-caudal position of the telencephalic section. We found that 90 min after AA STM test, only GL fish exhibited an enhanced c-Fos expression in Dm, whereas BL exhibited c-Fos levels similar to the C group (Fig. 1F, G). Moreover, in Dm the c-Fos expression correlated with all the AA learning parameters evaluated in the memory test (Pearson correlation: # trials: $r^2 = 0.84$, latency: $r^2 = 0.62$, and % Avoidance: $r^2 = 0.70$, all with $p < .01$ and $N = 10$), whereas it did not correlate in Dl telencephalic region (Fig. 1H). We found no differences in c-Fos expression along the Dm rostro-caudal axis (Supplementary Fig. 2B). Telencephalic c-Fos expression is also enhanced by stress, nevertheless in our AA paradigm we did not find a relationship between the number of aversive stimuli and the levels of c-Fos label

(Supplementary Fig. 2C).

Here we demonstrated that in trout, Dm is activated after an AA short memory test. In zebrafish, it was shown that a dorsal telencephalic region located at the middle of the rostro-caudal axis increases neuronal activation when the subjects recall the learned task after 24 hs (that is a long memory test) [37]. Interestingly, the dorsal telencephalic region Dd has been proposed to be relevant for memory encoding in both electric fish and goldfish [38–40], see the Discussion for a detailed elaboration on this topic. On this basis, we decided to assess c-Fos expression after an AA LTM test (24 hs after learning), in rainbow trout. The Fig. 2A depicts the behavioural training program, after which c-Fos was evaluated (90 min after the LTM). As seen before, half of the trained subjects exhibited a GL performance, whereas the other half performed as BL, see Fig. 2B (Learning curve: Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(2, 12)} = 4.24$, $p = .040$, $n = 4$ for each group); LTM test: Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(1, 6)} = 45.31$, with $p = .0005$, $N = 4$ for each group), and Supplementary Fig. 3A. Ninety minutes after the LTM test, subjects were euthanised and c-Fos expression was analysed in different telencephalic regions (Fig. 2C–E). We observed an increase of c-Fos immunoreactivity on Dm and Dd regions in GL when compared to BL subjects, whereas Dl does not show significant differences (Two way ANOVA for repeated measures, region effect $F_{(2, 12)} = 36.82$, with $p < 0.0001$; group effect $F_{(1, 6)} = 35.53$, with $p = .0010$; $N = 4$). Interestingly, in Dd and Dm, but not in Dl, c-Fos expression correlates with the memory ability assessed by the LTM test, see Fig. 2E (Pearson's correlation: for Dd $r^2 = 0.758$ with $p = .0049$; for Dm $r^2 = 0.514$ with $p = .0454$; for Dl $r^2 = 0.187$ with $p = 0.2850$; $N = 8$), and Supplementary Fig. 3B.

In mammals, neuronal proliferation in the adult brain has been related to the circuital activity of the progenitor's environment. Here we assessed if enhanced Dm neuronal activity, as a result of AA learning, induces an increase in the proliferation of neuronal progenitors. To that end, we evaluated the expression levels of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). We found that PCNA was increased in Dm of GL fishes, compared to the C group (Two-way ANOVA for Repeated Measures, group effect $F_{(2, 12)} = 6.013$, with $p = .0155$, $n = 5$ for each group), see Supplementary Fig. 4. These results highlight the participation of Dm telencephalic neuronal circuit during the AA cognitive test.

As we determined this circuit-to-function relationship, we evaluated how social isolation impinges on both Dm levels of adult neurogenesis and the Dm-related AA behaviour. We assessed the proliferative activity in Dm by evaluating PCNA expression after 3 days of rearing in control (C) or isolated (I) conditions, and we did not find any differences (Mann Whitney test, $p = .70$, with $n = 3$ for each group), see Fig. 3A. Then, we labelled neuronal progenitors with the thymidine analogue



(caption on next page)

BrdU and studied if trouts after four weeks of isolation showed alterations in the survival of neuronal progenitors when compared to controls. After four weeks of isolation both C and I subjects exhibited similar numbers of BrdU+ cells (Mann Whitney test, $p = .743$, with

$n = 4$ for each group), see Fig. 3B and C. As proliferation and survival of neuronal progenitors were not affected by the experimental conditions, we assessed the neuronal identity of the BrdU labelled cells by analysing the co-expression with the neuronal marker NeuN. Interestingly,

Fig. 2. Active avoidance learning enhances c-Fos expression in Dm telencephalon.

A) Time schedule for AA training. Each fish was trained for three daily sessions. Each session consisted of a maximum of 60 trials, separated by a 30-s ITI. The tests to analyse retrieval of trained avoidance behaviour were performed 30 min and 24 h after the last training, short-term memory (STM) and long-term memory (LTM), respectively.

B) Left panel: Percentage of avoidance responses throughout learning sessions. GL, good learners; BL, bad learners. Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(2, 12) = 4.24$, $p = .040$, $n = 4$ for each group. Sidak's multiple comparisons test, * denotes $p < .05$ for GL vs BL in S3. Right panel: Percentage of avoidance responses during STM and LTM for GL and BL subjects. Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(1, 6) = 45.31$, with $p = .0005$, $N = 4$ for each group. Sidak's multiple comparisons test, ** denotes $p < .005$ for GL vs BL.

C) Top panel: Optical sections of GL (left panel) and BL's telencephalon (right panel). For each section is shown the left hemisphere depicting c-Fos expression 90 min after the LTM session and the right hemisphere labelled with fluorescent Nissl stain (NeuroTrace®). White dashed lines delimit anatomical regions. Boxed areas (yellow) indicates the regions magnified at the bottom of each section. Scale bar: 500 μm . Bottom panel: Magnified view of the square regions in top panel, showing c-Fos expression in Dm, Dd and Dl regions. Scale bar: 100 μm .

D) Number of cells expressing c-Fos in Dd, Dm and Dl of GL and BL trouts. Two-way ANOVA for repeated measures, region effect $F(2, 12) = 36.82$, with $p < .0001$; group effect $F(1, 6) = 35.53$, with $p = .0010$; $N = 4$. Sidak's multiple comparisons test, * denotes $p < .05$, whereas ** denotes $p < .001$, both for GL vs BL.

E) Correlation between number of cells expressing c-fos and the percentage of avoidance responses in Dd, Dm and Dl. Dotted lines indicate 95% confidence intervals. Pearson's correlation index and p-value are informed for each analysis.

C subjects evidenced that 70.25% of BrdU positive cells also expressed the neuronal marker NeuN, whereas for I group there was only a 42% of co-localization. Thus, 4 weeks of isolation diminish in approximately a 40% the Dm adult neurogenesis levels (Mann Whitney test, $p = .029$, with $n = 4$ for each group), see Fig. 3B and D.

Since 4 weeks of rearing in isolation decrease the adult neurogenesis contribution to Dm, we wanted to test whether this treatment has any effect on the AA performance (Fig. 4A). For this purpose, adult subjects were reared for 4 weeks under C or I condition. In order to discard any possible anxiety- or stress-related bias to the cognitive outcome, both experimental groups were housed for an extra week in a common control-like social condition. The novel tank (NT) test has been used in zebrafish and trout to assess anxiety-related behaviours [41–44]. One day before the AA training, trouts were evaluated in the NT test (Fig. 4A). We found no significant differences in the NT test among both groups, suggesting that, at this moment, both groups have similar exploratory and motor activity performances (Supplementary Fig. 5). The next day, we started the AA training. As seen previously, in both groups 50% of individuals reached a good learning criterion, whereas the other half exhibited a poor learning performance (Supplementary Fig. 6). We only compared the good learner groups for both C and I treatments. We found that both groups exhibited a proper learning curve, with a session effect analysed by two-way ANOVA ($F_{(2,14)} = 7.63$, $p = .006$, $n = 5$ for I and $n = 4$ for C). However it must be noticed that only C subjects showed significant differences in avoidance responses throughout learning sessions (Tukey's multiple comparisons test S1 vs S2: $p = .010$ and S1 vs S3: $p = .002$, $n = 5$ for I and $n = 4$ for C), see Fig. 4B. A similar profile response was observed for number of trials and for latency of response as quantifiable variables, see Supplementary Fig. 7. Interestingly, when we evaluated AA memory retention, we found that I trouts failed on both short-term (30 min) and long-term (24 h) memory tests, and only C subjects evidenced a strong memory (Two-way ANOVA for Repeated measures, treatment effect $F_{(1, 7)} = 61.6$, with $p = .0001$, $n = 5$ for I and $n = 4$ for C), see Fig. 4C.

Our results indicate that rearing rainbow trout in isolation induced a severe deficit in the cognitive performance related to an AA task. We propose that adult neurogenesis in the Dm telencephalic circuit plays a relevant role in the processing of learning related signals during this task.

4. Discussion and conclusions

In this work we demonstrated that rainbow trout can achieve an associative learning task in the AA paradigm, which is widely used among vertebrates to evaluate emotional learning. It must be noticed that our training schedule evidenced that only a 50% of individuals achieved the learning program. Akin individual variability in the cognitive performance was also observed on different teleost species [45], for a recent review see Lucon-Xiccato and Bisazza, 2017 [46]. In fact, in

a similar AA training program, only a 37% of trained zebrafish accomplished the learning criterion [31]. Moreover, differences in learning ability were observed between conspecifics of Buenos Aires tetra fish (*Hemigrammus caudovittatus*), with outstanding learners ranging from ~16% to ~46.15% according to the strain [47]. Interestingly, this inter-individual differences in the performance of an AA learning were also described for mammals, where subjects with different levels of fearfulness and coping strategies exhibited dissimilar performance in this task [48–51]. Altogether, these studies suggest that individual differences in AA performance are as common in fish as in other vertebrates. Remarkably, it has been shown that cognitive abilities in fish may vary with brain size, where fish selected for larger brains achieved a greater cognitive performance [52,53]. It would be of interest for further studies to address the contribution of adult neurogenesis to the brain size and therefore to the cognitive ability of different individuals.

In this work we assessed the rainbow trout performance in a behavioural paradigm of emotional learning, the AA task. In mammals, it is reported that the AA task involves different regions of the amygdalar complex [54–57]. In teleosts is proposed that the amygdalar complex is composed by different pallial and subpallial regions. Based on gene expression analysis, it has been proposed that the supracommissural nucleus of the area ventralis telencephali (Vs) is homologous to the dorsal and ventral part of the central amygdala and that the post-commissural nucleus of the area ventralis telencephali (Vp) is homologous to the dorsal part of the central amygdala [58]. Furthermore, in rodents, the cannabinoid receptor (Cb1) is expressed in the basolateral amygdala neurons [59]. Whereas, in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus* and zebrafish, Cb1 is strongly expressed in Dm [60,61], thus supporting the model that Dm is homologous to the pallial amygdala. Thus, it is plausible that Vs, Vp (subpallial amygdala) and Dm (pallial amygdala) constitute the amygdaloid complex in teleosts [17]. Furthermore, it has been shown that the rainbow trout Dm region receives afferents from the ventral nucleus of the ventral area (Vv) and from Vs, whereas it projects to the hypothalamic lobe and to Vs [32,33]. An efferent connection from a Dm subregion to the hypothalamus has also been described by Giassi and coworkers [62]. Based on this information it is plausible that the Dm pallial region could share homology with the basolateral amygdala of mammals. It has been proven that Dm is involved in emotional learning and motivated behaviour in different teleost species [18,19]. Experiments in goldfish (*Carassius auratus*), revealed that an experimental ablation of Dm, and not Dl, abolishes the cognitive abilities acquired during a delay conditioning AA protocol [25]. In fact, a recent publication identifies a glutamatergic neuronal population in zebrafish Dm that is essential for AA and fear conditioning learning [26]. Here we tested whether Dm neuronal activity is enhanced by the AA test. After a short memory test (30 min after the last learning session) we evidenced a correlation between the AA cognitive ability and the expression of the neuronal

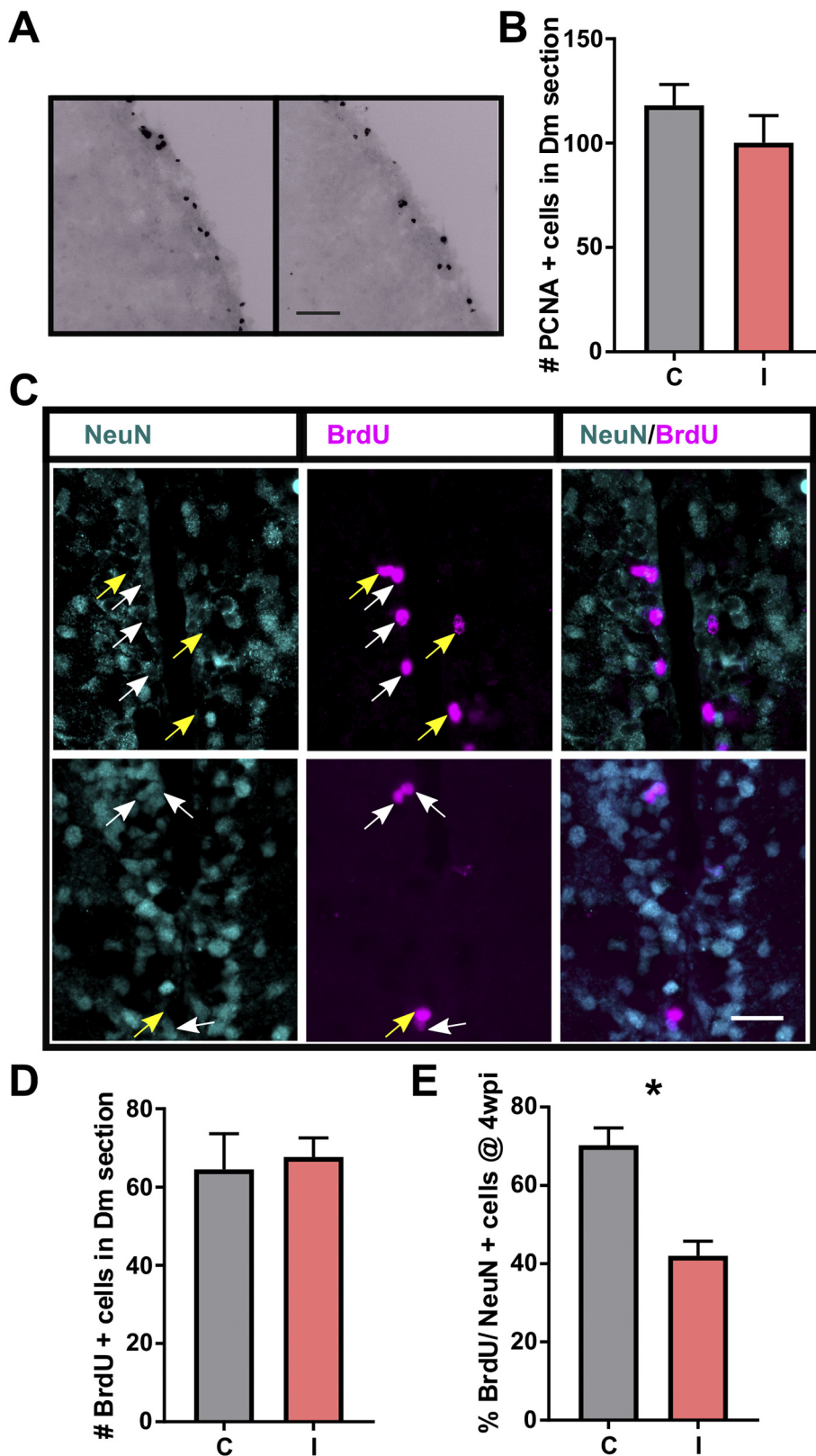


Fig. 3. Social isolation downregulates adult neurogenesis in Dm telencephalon.

A) Optical sections of rainbow trout's Dm telencephalon (left hemisphere) depicting PCNA expression after 3 days of rearing in control (C) conditions (left) or in social isolation (I) (right). Scale bar: 50 μ m.

B) Number of PCNA cells in Dm section of trout subjected to 3 days in I or C conditions. Mann Whitney test $p = .70$, $n = 3$.

C) Optical sections of Dm telencephalon from rainbow trouts reared for 4 weeks under C (up) or I conditions (bottom), depicting BrdU incorporation (magenta) and NeuN expression (cyan). White arrows denote BrdU+ and NeuN+ cells, whereas yellow arrows denote cells that are only BrdU+. Scale bar: 35 μ m.

D) Total number of BrdU+ cells in Dm telencephalon of rainbow trouts under 4 weeks of I or C conditions. Mann Whitney test $p = .68$, $n = 4$.

E) Percentage of BrdU+ cells that express NeuN in the Dm telencephalic region of trouts under 4 weeks of I or C conditions. Mann Whitney test, * denotes $p = .0286$, with $n = 4$.

activity marker c-Fos, only in the Dm region. To our knowledge this is the first report linking Dm neuronal activity to teleosts AA performance. This result is consistent with the lesion experiments in goldfish [16,19,63] and with the finding of a neuronal population in Dm necessary for AA in zebrafish [26].

We further explored the participation of the dorsodorsal (Dd) region

encoding a long-term memory task evaluated 24 hs after the last learning session. Our results indicate that c-Fos is overexpressed on Dd and Dm of GL subjects, and the expression of this activity-related protein correlates with the cognitive performance (Fig. 2). Interestingly, Elliott and coworkers described Dd as a global recurrent network with complex reciprocal connections with different pallial and subpallial

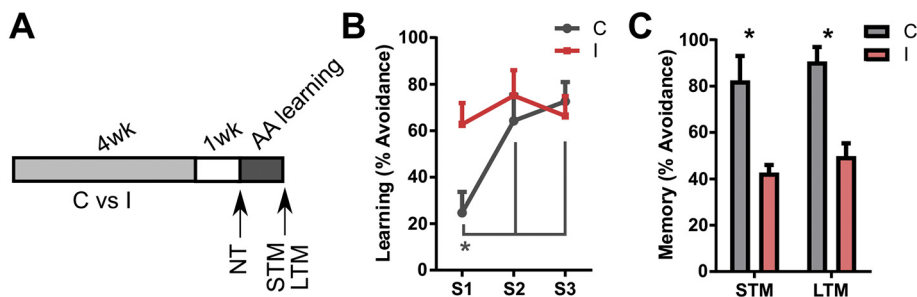


Fig. 4. Social isolation impairs cognitive performance in active avoidance task.

A) Schematic representation of the experimental design. Trout were subjected to control (C) or isolated (I) conditions for 4 weeks. Then both groups were maintained under C conditions for an extra week in order to avoid social isolation acute effects. At the end of this week, C and I trout were tested for motor performance and anxiety-like behaviour in the novel tank (NT) test. Finally, individuals were subjected to AA learning and short- and long-term memory (STM, LTM) were evaluated.

B) Percentage of avoidance responses throughout learning sessions for C and I trouts. Two-way ANOVA for repeated measures, session effect $F(2,14) = 7.53$ with $p = .006$. Tukey's multiple comparisons test: $* p < .05$ for S1 vs S2, and for S1 vs S3. For C: $n = 4$ and for I: $n = 5$.

C) Percentage of avoidance responses in the short- and long-term memory tests (STM, LTM). Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(1,7) = 61.6$ with $p = .0001$. Bonferroni's multiple comparisons test: $* p < .05$. For C: $n = 4$ and for I: $n = 5$.

regions in the electric gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus* [40]. In the rainbow trout, neuronal tracing studies were performed to describe the connectivity of several telencephalic structures [32,33]. In these works, Fogueira and coworkers show that trout Vs, Vv and Vp subpallial regions are strongly interconnected between each other, and all these regions project terminals to Dm, to Dc and to Dd pallial structures, whereas Dd connects to Dm and Dc. It is very likely, that this recurrent loop involving the proposed teleost amygdaloid complex (Vs, Vv, Vd and Dm), could be involved on emotional memory processing. Moreover, Aoki and coworkers identified a dorsal region in the zebra-fish telencephalon in which neurons are activated by the conditioning stimulus 24 h after the last learning session on an AA paradigm, similar to the one employed in this manuscript [37]. In that work the authors identified the memory-involved pallial region as Dc, however the localisation of the responsive region throughout their manuscript points to denote this region as Dd. Finally, Vargas and coworkers showed that Dd lesions also disrupt trace but not delay conditioned AA memory retrieval [38]. However, it must be noticed that in that work the authors did not test the memory retention in an effective manner, since they repeat exactly the same procedure as performed during the acquisition task, instead of testing memory retention by omitting the aversive stimulus. Thus, in this case subjects with lesion in Dd are allowed to re-learn the AA rules. Taken together, this findings propose Dd as a memory engaged circuit in the teleost pallium.

For rodents, it was demonstrated that housing in isolation decreases adult neurogenesis levels [3,64]. Since adult trout are able to learn an AA task, c-Fos expression is enhanced in Dm in relation to the cognitive performance, and the periventricular region of Dm possesses neuronal progenitors that generate new-born neurons, we decided to evaluate if social isolation impacts on Dm adult neurogenesis. After 4 weeks under isolation, the subjects exhibited a ~40% decrease in the Dm adult neurogenesis level. However, both proliferation and survival of neuronal progenitors (which were labelled at the beginning of the treatment) were unaltered when compared to controls. These findings suggest that isolation impinges on the pathway that leads progenitors to neuronal commitment. It would be of relevance to study in which way social isolation acts on different neurotrophins and trophic signals involved on neuronal differentiation.

In this work, we found that rearing in isolation diminishes Dm adult neurogenesis and that Dm activity is essential for AA learning, then we tested whether isolated trout were able to accomplish the AA cognitive task. Here we show that isolated trout can learn an AA task in an intrasession manner, but evidence severe memory deficits to recall the learned task. This was highlighted by the failure in the short- and long-term memory tests (Fig. 4) and by the poor retention exhibited during each session (Supplementary Fig. 6). Interestingly, a similar cognitive deficit was described for cichlid fish that were maintained for ten days under isolation before being trained in a spatial task [6], suggesting that isolation leads to neuronal plasticity defects and in turn to cognitive deficits.

Social interactions plays a significant role in shaping animal physiology and behaviour [65,66]. It has been shown that rainbow trout can adapt to cope with changes in their social environment [67]. A study by Øverli et al. (2002) found that only six days of social isolation were sufficient to induce chronic stress in rainbow trout [68]. It has also been shown that social isolation for only 24 h in the cichlid fish *Archocentrus nigrofasciatus*, results in an increase of cortisol levels [69]. Moreover, social stressors have been found to directly reduce cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout [8]. However, in this work we found diminished adult neurogenesis in the Dm without alterations in the proliferation of neuronal progenitors, suggesting an altered niche signalling for neuronal differentiation.

Social isolation has been found to alter stress-related signalling and locomotor activity in different fish [7,8,70,71]. To discard stress-related effects in the cognitive evaluation we decided to keep the isolated group under control conditions (in a social environment) for one week before beginning the AA training. We evaluated anxiety and swimming behaviour in the isolated and control groups by recording the fish performance on the NT test. This test revealed no differences in the swimming distance, the time that fish remained still in the same place, the time that fish spent in the upper portion of the tank, the number of transitions to the upper region, and the latency to cross to the upper region (Supplementary Fig. 5). Together, these results suggest that there were no overall differences in the motivation or exploratory activity of the isolated trout. Thus, we conclude that memory deficits evidenced by the isolated fish would be related to alterations in neuronal plastic mechanisms that are responsible for memory storage and recall. We propose that the incorporation of adult born neurons to the Dm circuitry could be one of such plastic mechanisms. However, further studies should be directed to confirm this hypothesis.

Our results demonstrate a structure-to-function relationship between the Dm neuronal activity and the learning ability in an AA task in a teleost fish. Furthermore, we show that four weeks of social isolation reduces the incorporation of adult-born neurons into Dm, and also impairs a Dm-related cognitive function.

Authors' contributions

Active avoidance experiments were carried out by MSA. Adult neurogenesis experiments were carried out by LSM-F. Novel tank experiments were performed by LSM-F, FRR and SAC. BrdU administration and histological measurements were performed by MSA and LSM-F. Data analysis and discussion were performed by all the authors. APDV and FRR performed the western blot validation of c-Fos antibody. LAM conceived, designed and coordinated the study, and wrote the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Funding

This work was supported by ANPCyT-MinCyT PICT 2013-2056 and

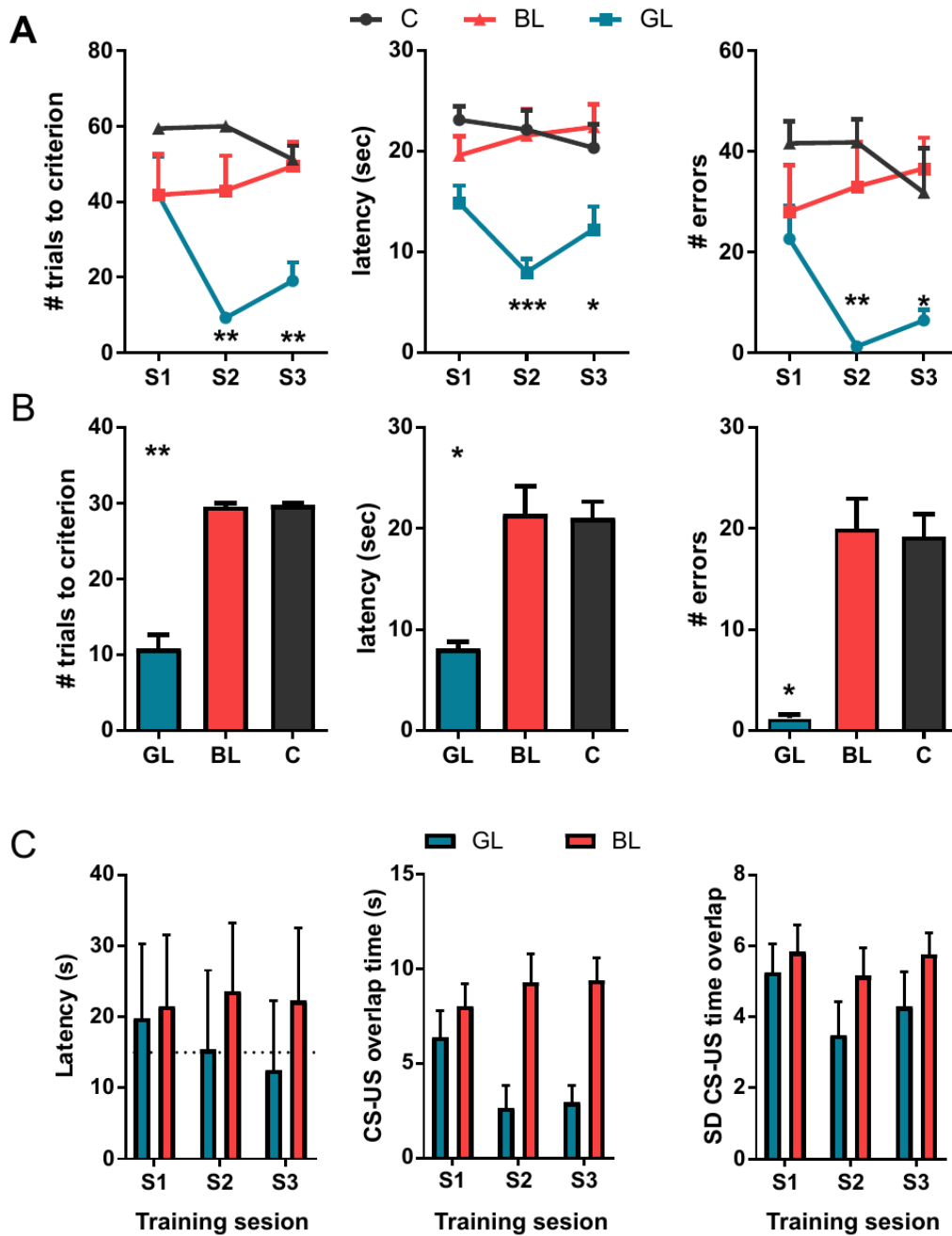
- 3338–3368.
- [63] M. Portavella, et al., The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish, *Brain Res. Bull.* 57 (2002) 397–399.
- [64] C. Lieberwirth, et al., Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles, *Horm. Behav.* 62 (2012) 357–366.
- [65] R.J. Blanchard, et al., Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems, *Physiol. Behav.* 73 (2001) 261–271.
- [66] B.W. Lindsey, V. Tropepe, Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels, *Dev. Neurobiol.* 74 (2014) 1053–1077.
- [67] M. de L. Ruiz-Gomez, et al., Behavioral plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with divergent coping styles: when doves become hawks, *Horm. Behav.* 54 (2008) 534–538.
- [68] Ø. Øverli, et al., Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness, *J. Exp. Biol.* 205 (2002) 391–395.
- [69] R.L. Earley, et al., Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*), *Physiol. Behav.* 88 (2006) 353–363.
- [70] L.M. Gomez-Laplaza, E. Morgan, Effects of short-term isolation on the locomotor activity of the Angelfish (*Pterophyllum scalare*), *J. Comp. Psychol.* 105 (1991) 366–375.
- [71] R.-P. Hannes, D. Franck, The effect of social isolation on androgen and corticosteroid levels in a cichlid fish (*Haplochromis burtoni*) and in swordtails (*Xiphophorus helleri*), *Horm. Behav.* 17 (1983) 292–301.

Supplementary Results.

Social isolation impairs active avoidance performance and decreases neurogenesis in the dorsomedial telencephalon of rainbow trout.

Maria Soledad Ausas*, Laura Mazzitelli-Fuentes*, Fernanda Ruth Roman, Sonia Alejandra Crichigno , Ana Paula De Vincenti , Lucas Alberto Mongiat

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Active avoidance learning parameters.

A) The figure shows different learning parameters for good learner trout (GL), bad learner trout (BL) and for controls (C). Upper panels show learning progress across sessions. Number of trials to criterion: analysis was performed by Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(2, 12) = 9.479$ $p = 0.0034$. Tukey's multiple comparisons test, ** denote $p < 0.01$ for GL vs C and for GL vs BL. Mean latency across the session: analysis performed by Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(2, 12) = 12.12$ $p = 0.0013$. Tukey's multiple comparisons test, * denote $p < 0.05$ for GL vs C, *** denote $p < 0.0001$ for GL vs C and for GL vs BL. Number of errors: analysis performed by Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(2, 12) = 8$, with $p = 0.0062$. Tukey's multiple comparisons test, * denote $p < 0.05$ for GL vs C and for GL vs BL, ** denote $p < 0.001$ for GL vs C and for GL vs BL.

B) Short-term memory test assessed 30 minutes after S3. Number of trials to criterion: data analysis by Kruskal-Wallis test indicating differences among groups with $p = 0.0010$. Dunn's multiple comparisons test, ** $p < 0.01$ for GL vs C and for GL vs BL. Mean latency across the session: data analysis by Kruskal-Wallis test indicating differences among groups with $p = 0.0029$. Dunn's multiple comparisons test, * $p < 0.05$ for GL vs C. Number of errors: data analysis by Kruskal-Wallis test indicating differences among groups with $p = 0.0019$. Dunn's multiple comparisons test, * $p < 0.05$ for GL vs C and for GL vs BL.

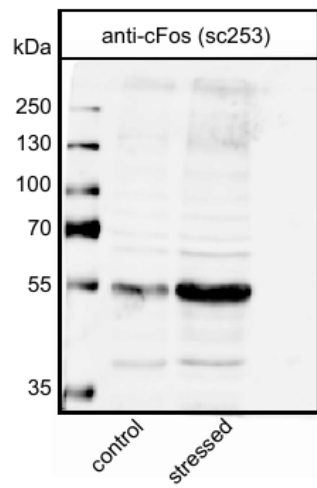
C) Left: mean Latency (in seconds) \pm SD across learning sessions for all GL and BL fish tested in this manuscript. Note the dotted line at 15 s, below this line no US was applied.

Middle: Conditioned Stimulus-Unconditioned Stimulus overlap for GL and BL fish during acquisition. The values indicate the mean \pm SE. Note that for GL group the stimulus overlap diminishes during learning whereas it does not in the BL group.

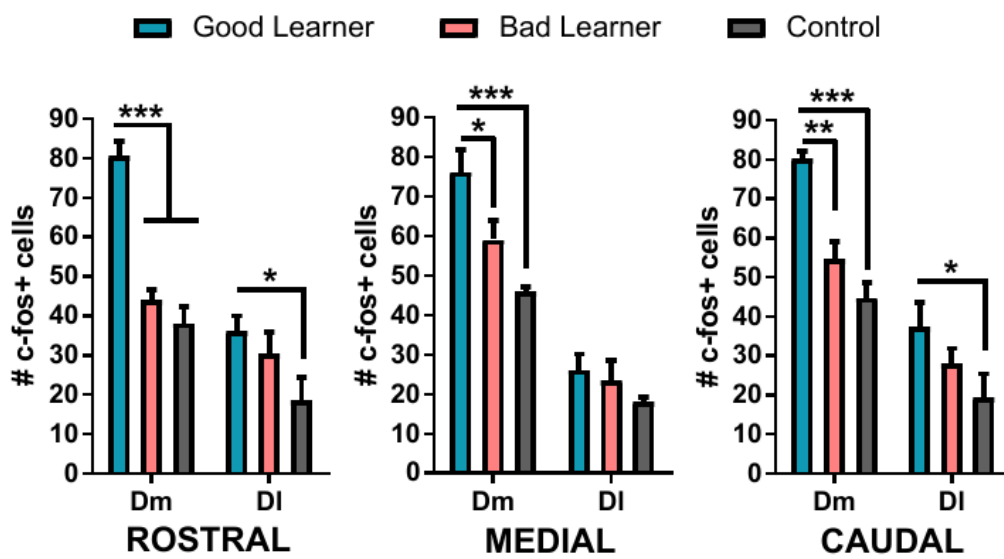
Right: SD \pm SE for the Conditioned stimulus-Unconditioned stimulus overlap is shown. The data shown in this panels correspond to all the learner subjects used in this manuscript.

Supplementary Figure 2

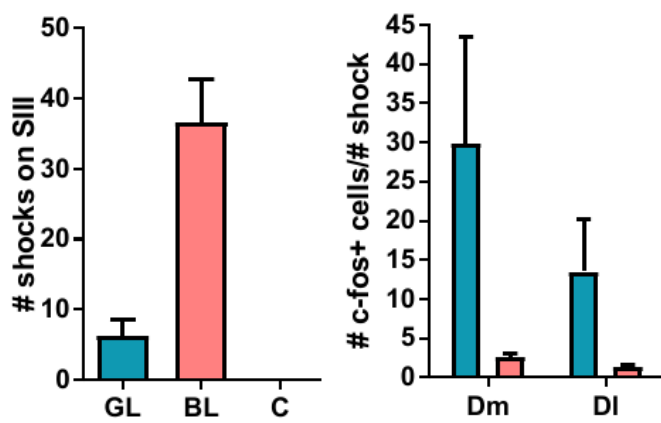
A



B



C



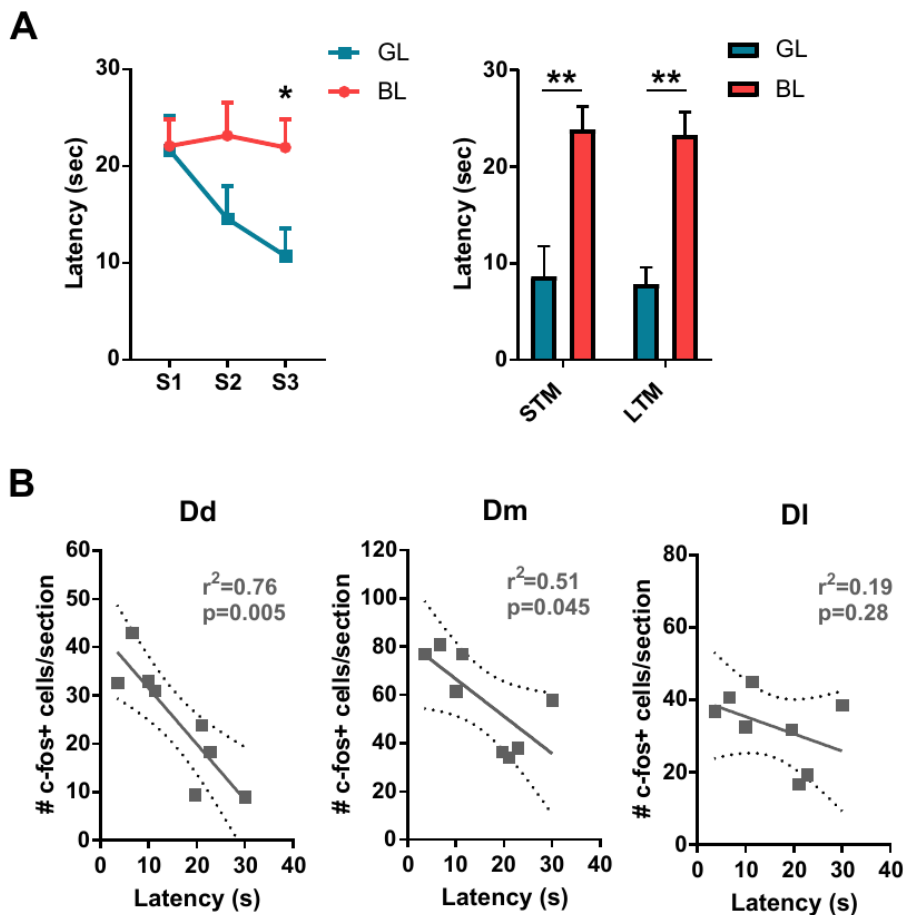
Supplementary Figure 2. Expression of c-fos and number of aversive stimuli.

2A) Western blot analysis of rainbow trout telencephalon homogenate shows a single band at ~55 kDa using the primary anti c-fos antibody (sc-253), both under control and stressed conditions. C-fos expression increases after acute stress protocol.

2B) C-fos expression along rostro-caudal axis. Number of cells expressing c-fos in Dm and Dl of good learners (GL), bad learners (BL) and control (C) trouts in rostral, medial and caudal regions. Rostral: Two-way RM ANOVA indicates group effect $F(2, 12) = 20.18$ with $p=0.0005$, and region effect $F(1, 12) = 56.58$ with $p<0.0001$. Medial: Two-way RM ANOVA indicates group effect $F(2, 12) = 17.27$ with $p=0.0003$, and region effect $F(1, 12) = 99.81$ with $p<0.0001$. Caudal: Two-way RM ANOVA indicates group effect $F(2, 11) = 23.63$ with $p=0.0001$, and region effect $F(1, 12) = 55.05$ with $p<0.0001$. Post hoc analysis was performed by a Tukey's multiple comparisons test, the * denotes $p<0.05$, ** denotes $p<0.001$ and *** denotes $p<0.0001$.

2C) Expression of c-fos and number of aversive stimuli. Left: The bar plot depicts the number of mild electric shocks received on S3, for GL, BL and C. Right: The bar plot shows the relationship between the number of c-fos positive cells on Dm and Dl telencephalic regions. This plot shows that c-fos expression is not related to the mild electric shocks delivered on S3 as aversive stimuli.

Supplementary Figure 3

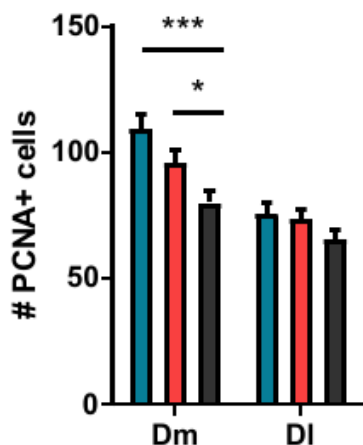


Supplementary Figure 3. LTM AA retrieval enhances c-fos expression in Dm and Dd.

A) Left: Latency to change compartment throughout learning sessions (in seconds). GL, good learners; BL, bad learners. Two-way ANOVA for repeated measures, group effect was non significant $F(1, 6) = 2.896$, $n=4$ for each group. Sidak's multiple comparisons test, * denotes $p<0.05$ for GL vs BL in S3. Right panel: Latency to change compartment (in seconds) during STM and LTM for GL and BL subjects. Two-way ANOVA for repeated measures, group effect $F(1, 6) = 29.49$, with $p=0.0016$, $N=4$ for each group. Sidak's multiple comparisons test, ** denotes $p<0.005$ for GL vs BL.

B) Correlation between number of cells expressing c-fos and the latency (sec) to change compartment in Dd, Dm and Dl. Dotted lines indicate 95% confidence intervals. Pearson's correlation index and p-value are informed for each analysis.

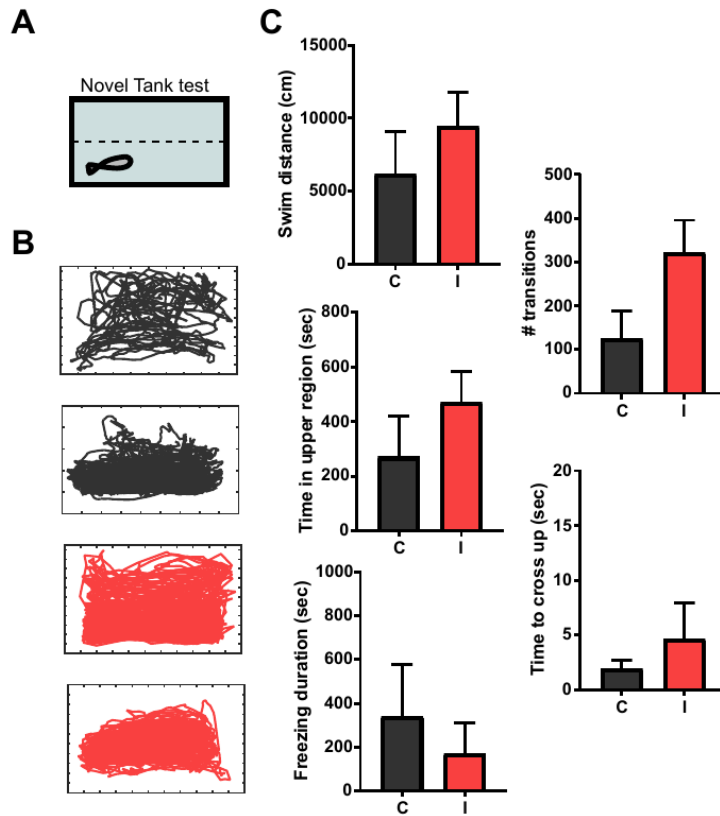
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. Expression of PCNA during active avoidance learning.

PCNA was quantified 90 minutes after the short term memory test. The bars indicate the number of PCNA positive cells on Dm and Dl telencephalic sections. Light blue bars correspond to good learner (GL) fish, light red bars correspond to bad learner (BL) fish, whereas grey bars represent the control (C) group. Two way ANOVA for repeated measures, group effect $F(2, 12)=6.013$ with $p=0.0155$, Bonferroni's multiple comparisons test, * denote $p<0.05$ for BL vs C, and *** denote $p<0.01$ for GL vs C. For each group the $n=5$, and for each individual 5 sections were analysed.

Supplementary Figure 5



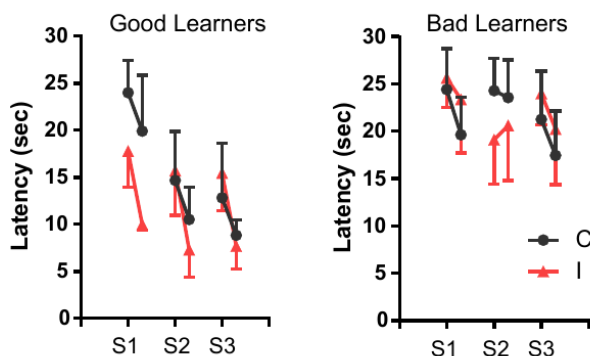
Supplementary Figure 5. Novel tank test.

A) The scheme depicts a front view of the novel tank device. Swimming behaviour is acquired by a digital camera. Individuals were maintained for 4 weeks under control (C) or isolated (I) conditions, followed by one extra week in C conditions (both groups). Then novel tank test was performed to evaluate swimming behaviour.

B) Examples of trajectories (front view) recorded from two C (grey traces) and two I (light red traces) fish.

C) The bar plots show: the total swimming distance, the total time spent in the upper portion of the tank, the time that the fish spent quiet (freezing duration), the number of transitions from the bottom to the upper portion of the tank, and the latency that fish showed to make the first transition to the upper portion of the tank. For all the data a Mann Whitney test was performed, the corresponding statistics were: $p=0.5556$, $p=0.5556$, $p=0.6825$, $p=0.0635$, and $p=0.8571$, respectively. The $n=4$ for C, and $n=5$ for I.

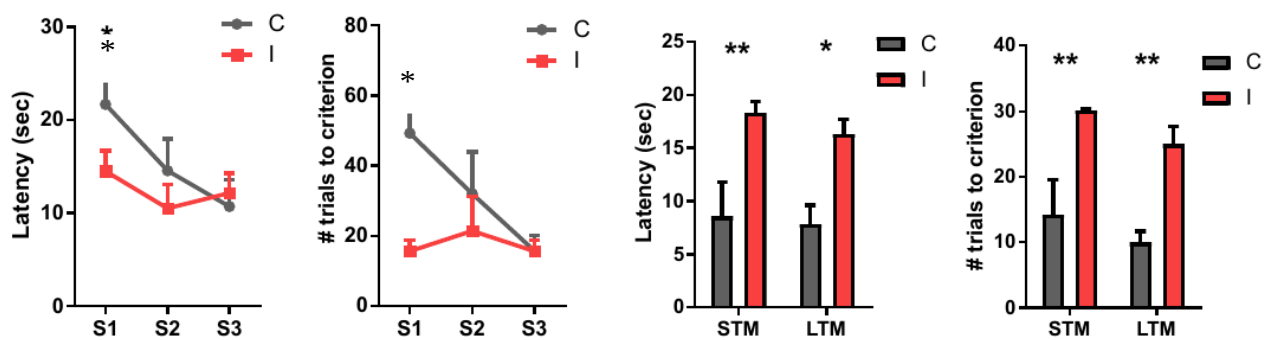
Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Intra session active avoidance performance.

The plots show the mean values of latency to swim to the safe side of the tank from the first and the last 5 trials of each session. Note that good learners show an intrasession improvement despite they were maintained under C or I conditions. Latencies lower than 15 seconds indicate avoidance responses. Bad learners did not show any improvement. For C n=4, and for I n=5.

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7. Active avoidance learning parameters for C and I fish.

Left panels show learning progress across sessions. Latency: Two way ANOVA for repeated measures, session effect $F_{(2, 14)}=4.908$ $p=0.0243$. Sidak's multiple comparisons test, * denote $p<0.05$ for S1 vs S3 on C. For C n=4, and for I n=5. Number of trials to criterion: Two way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(1, 7)}=11.479$ $p=0.0116$. Sidak's multiple comparisons test, * denote $p<0.05$ for C vs I on S1, and for S1 vs S3 for C. For C n=4, and for I n=5.

Right panels show memory tests. Latency: Two way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(1, 7)}= 22.27$ $p=0.0022$. Sidak's multiple comparisons test, * indicate $p<0.05$ and ** indicate $p<0.01$ both for C vs I. For C n=4, and for I n=5. Number of trials to criterion: Two way ANOVA for repeated measures, group effect $F_{(1, 7)}=31.73$ $p=0.0008$. Sidak's multiple comparisons test, ** indicate $p<0.01$ for C vs I. For C n=4, and for I n=5.