



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Neurogénesis adulta en el *pallium* del pez cebra (*Danio rerio*)

Tesis presentada para optar por el título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas.

Fernanda Ruth Román

Director: Lucas A. Mongiat

Director adjunto: Francisco J. Urbano Suarez

Consejera de estudios: Lidia Szczupak

Lugar de trabajo:
Laboratorio de Neurogénesis Adulta, Dpto. de Física Médica.
Centro Atómico de Bariloche, CNEA. San Carlos de Bariloche.

San Carlos de Bariloche, 2024.

Neurogénesis adulta en el *pallium* del pez cebra (*Danio rerio*)

El sistema nervioso central posee múltiples mecanismos de plasticidad que favorecen rearrreglos circuitales para que los individuos se adapten a cambios en el entorno. Un ejemplo de plasticidad es la neurogénesis adulta, que implica la incorporación de neuronas nuevas en el sistema nervioso central de individuos adultos. El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo ampliamente utilizado para estudiar este proceso debido a que posee múltiples regiones neurogénicas en el cerebro que son capaces de producir e integrar nuevas neuronas a los circuitos preexistentes. Algunas de estas regiones se encuentran en el *pallium*, una estructura telencefálica asociada a múltiples funciones cognitivas. Durante las primeras etapas del desarrollo las células madre neurales (CMNs) del *pallium* son capaces de generar neuronas glutamatérgicas mientras que las neuronas GABAérgicas provienen de progenitores que se originan en el *subpallium* y migran. Sin embargo, aún no se ha determinado si durante la vida adulta las CMNs del telencéfalo siguen este mismo proceso de diferenciación o adoptan un nuevo patrón.

En este trabajo, se buscó caracterizar el proceso de neurogénesis adulta en dos regiones específicas del *pallium*. Por un lado se estudió la región dorso-medial (Dm) que se encuentra involucrada en aprendizajes de contexto emocional y se propone como homóloga a la amígdala basolateral de mamíferos y, por otro lado, la región dorso-lateral (Dl) que está asociada a aprendizajes de tipo espacial y se propone como homóloga al hipocampo de mamíferos. Bajo la hipótesis de que las CMNs localizadas en la zona periventricular de Dm y Dl son capaces de generar todo el repertorio neuronal en individuos adultos, se decidió estudiar la dinámica espacio-temporal del proceso de neurogénesis adulta y la identidad de las nuevas neuronas generadas.

Con ese fin, se marcó una cohorte de CMNs mitóticas mediante administración de EdU, un análogo de timidina que se incorpora a células en división. Se realizó un seguimiento temporal de las células marcadas y se evaluó la distribución espacial y la sobrevivencia de la cohorte, así como también la capacidad proliferativa y su destino neuronal excitatorio (neurona glutamatérgica) o inhibitorio (neurona GABAérgica). Por un lado se observó que las CMNs marcadas no presentaron una distribución uniforme a lo largo del eje rostro-caudal ni tampoco un patrón equivalente para ambas regiones. Es decir, la región Dm presentó mayor densidad de CMNs marcadas en la región rostral mientras que la región Dl tenía mayor número de CMNs en la región caudal. Este resultado evidenció una cinética de diferenciación variable según la región neurogénica. Por otro lado, se registró una sobrevivencia de la mitad de las células marcadas en un periodo de dos meses, un indicio de muerte de las células que no lograron incorporarse. También se vio, mediante el análisis de la expresión de PCNA (o antígeno nuclear de proliferación celular), que una proporción de las células marcadas continuó proliferando hasta las cuatro semanas, evidenciando la presencia de divisiones conservativas y asimétricas durante ese periodo. Estos resultados en conjunto sugieren un tiempo limitado de vida de la cohorte y la posible existencia de una ventana temporal donde se concreta la integración sináptica de las neuronas nuevas o se desencadenan programas de muerte celular.

Posteriormente, se estudió el destino neuronal glutamatérgico o GABAérgico de la cohorte. Se evaluó la expresión de NeuroD1 para neuronas glutamatérgicas inmaduras y de gad1b para neuronas GABAérgicas, esta última mediante el uso de una línea de peces transgénicos. Se observó una colocalización temprana y constante en el tiempo de EdU con NeuroD1, aproximadamente del 80 % en ambas regiones del *pallium*, mientras que la colocalización de EdU con gad1b fue inicialmente de entre 15-40 % y disminuyó con el paso del tiempo. Estos resultados sugieren que el proceso de neurogénesis adulta da lugar a neuronas mayoritariamente glutamatérgicas y también propone nuevos interrogantes respecto a la presencia de neurogénesis adulta GABAérgica. Una alternativa posible es que la disminución se deba a la muerte de células con destino GABAérgico en condiciones basales y otra alternativa es que se produzca la pérdida del marcador gad1b por inhibición de la vía de diferenciación ND1, recapitulando lo que sucede en la corteza de roedores.

Luego de la caracterización de las zonas proliferativas del *pallium* adulto en condiciones basales se evaluó como la misma puede verse modulada por distintos estímulos conductuales. Bajo la hipótesis de que el ambiente enriquecido modula la actividad de la zona proliferativa en la región Dl y que la restricción social lo hace en la región Dm, diferentes grupos de peces fueron mantenidos durante un mes en ambas condiciones. Se observó que la exposición al ambiente enriquecido produjo un incremento de la proliferación en la región Dl medial del *pallium* mientras la restricción social generó una disminución de la sobrevivencia de la cohorte en Dm rostro-medial y un aumento de la proliferación en Dl medial.

Estos resultados contribuyen a sentar las bases del proceso de neurogénesis en dos regiones específicas del *pallium* del pez cebra adulto, mostrándolo como una fuente de plasticidad

dinámica y susceptible a ser modificada por diferentes condiciones o estímulos ambientales.

Palabras clave: célula madre neural, telencéfalo, plasticidad, circuito neuronal, ambiente enriquecido, restricción social.

Abstract

Adult neurogenesis in the *pallium* of zebrafish (*Danio rerio*)

The central nervous system has multiple plasticity mechanisms that promote circuit rearrangements so that individuals adapt to changes in the environment. An example of plasticity is the adult neurogenesis, which involves the generation of new neurons that are incorporated into the central nervous system of adult individuals. The zebrafish (*Danio rerio*) is a widely used model to study this process because it has multiple neurogenic regions in the brain that are capable of producing and integrating new neurons into pre-existing circuits. Some of these regions are located in the *pallium*, a telencephalic structure associated with multiple cognitive functions. During the early stages of development, pallial neural stem cells (NSCs) are capable of generating glutamatergic neurons, while GABAergic neurons originate from progenitors in the *subpallium* and migrate. However, it has not yet been determined whether telencephalic progenitors follow this same differentiation process during adulthood or adopt a new pattern.

In this Thesis, the aim was to characterize the process of adult neurogenesis in two specific regions of the *pallium*. On the one hand, the dorsomedial (Dm) region, which is involved in emotional context learning and is proposed as homologous to the basolateral amygdala of mammals, and on the other hand, the dorsolateral (Dl) region, which is associated with spatial learning and is proposed as homologous to the hippocampus of mammals. Under the hypothesis that NSCs located in the periventricular zone of Dm and Dl are capable of generating the entire neuronal repertoire in adult individuals, the spatiotemporal dynamics of the adult neurogenesis process and the identity of the new generated neurons were studied.

To this end, a cohort of mitotic NSCs was labeled by EdU administration, a thymidine analog that incorporates into dividing cells. The temporal distribution of the labeled cells

was tracked and the spatial distribution and survival of the cohort, as well as the proliferative capacity and its excitatory (glutamatergic neuron) or inhibitory (GABAergic neuron) neuronal fate, were evaluated. On the one hand, it was observed that labeled NSCs did not present an uniform distribution along the rostro-caudal axis, nor did they have an equivalent pattern for both regions. In fact, the Dm region had a highest density of labeled NSCs in the rostral region while the Dl region had the higher number of NSCs in the caudal region. This result indicates a variable kinetic differentiation depending on the telencephalic position of the neurogenic region. On the other hand, a survival rate of half of the labeled cells was recorded within a period of two months, an indicator of cell death of those that did not incorporate. It was also seen, through the analysis of PCNA expression (or proliferating cell nuclear antigen), that a portion of the labeled cells continued to proliferate up to four weeks, evidencing the presence of conservative and asymmetrical divisions during that period. These results together suggest a limited survival of the cohort and the possible existence of a temporal window where the synaptic integration of new neurons takes place or cell death programs are triggered.

Then, the glutamatergic or GABAergic neuronal fate of the labeled cohort was studied. The expression of NeuroD1 was evaluated as a marker of immature glutamatergic neurons and *gad1b* for GABAergic neurons, last one using a transgenic fish line. An early and constant colocalization was observed over time between EdU and NeuroD1, approximately 80 % in both pallial regions, while the colocalization of EdU with *gad1b* was initially between 15-40 % and decreased over time. These results suggest that the adult neurogenesis process gives rise mostly to glutamatergic neurons. It also proposes new questions regarding the presence of GABAergic adult neurogenesis. One possible alternative is that the decrease is due to the death of GABAergic cell populations under basal conditions, and another alternative is that the loss of the *gad1b* marker occurs through inhibition of the ND1 differentiation pathway, recapitulating the process seen in the cortex of rodents.

After the characterization of the proliferative zones of the adult *pallium* under basal conditions, it was evaluated how it could be modulated by different behavioral stimuli. Under the hypothesis that the enriched environment modulates the activity of the proliferative zone in the Dl region, and that social restriction does so in the Dm region, different groups of fish were kept for a month in both conditions. It was observed that exposure to the enriched environment produced an increase in proliferation in the medial Dl region of the pallium, while social restriction resulted in a decrease in cohort survival in the rostro-medial Dm and an increase in proliferation in the medial Dl.

These results contribute to laying the foundation of the neurogenesis process in two specific regions of the adult zebrafish pallium, showing it as a source of dynamic plasticity susceptible to being modified by different environmental conditions or stimuli.

Key words: Neural Stem Cell, telencephalon, plasticity, neural circuit, enriched environment, social restriction.

Agradecimientos

“¿Por qué la Tierra es mi casa?
¿Por qué la noche es oscura?
¿Por qué la luna es blanca que engorda como adelgaza?
¿Por qué una estrella se enlaza con otra, como un dibujo?
¿Y por qué el escaramujo es de la rosa y del mar?
Yo vivo de preguntar, saber no puede ser lujo.”

Silvio Rodríguez - Escaramujo

Quiero expresar desde lo más profundo de mi corazón mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido tanto a la realización de esta tesis como a mi crecimiento profesional y personal. Cada individuo que ha sido parte de mi vida en estos últimos 7 años ha dejado una huella indeleble, proporcionando un apoyo fundamental y necesario que me ha permitido estar aquí hoy, redactando estas palabras.

En primer lugar, deseo extender mi más sincero agradecimiento al Dr. Lucas Mongiat y al Dr. Francisco Urbano. Su constante acompañamiento a lo largo de estos años ha sido invaluable, contribuyendo enormemente al desarrollo de mis habilidades profesionales y personales. Agradezco infinitamente sus valiosos aportes, así como sus críticas constructivas, las cuales me han impulsado en cada decisión y en cada paso del trabajo que hoy cierro.

Asimismo, quiero dedicar un especial agradecimiento a mi familia, a mi mamá Alejandra y a mi papá Pedro, por su inquebrantable apoyo, por estar siempre presentes para abrazarme en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada logro alcanzado. Son pilares fundamentales en mi vida. A mis hermanos Esteban y Cristina, quienes nunca soltaron mi mano, brindándome su apoyo incondicional a lo largo del tiempo y la distancia. Con su

compañía, siento que puedo alcanzar cualquier meta que me proponga. Y a todos los demás miembros de mi familia, quienes han sido un sólido soporte desde el cual he podido empoderarme y perseguir mis sueños. ¡Gracias por estar siempre a mi lado!

A Marta, mi vecina y amiga, quiero expresar mi más profundo agradecimiento. Sus conversaciones interminables y los cafecitos compartidos a media tarde fueron mi ancla emocional durante todos estos años y durante un periodo tan complejo como el de aislamiento social en la pandemia. Agradezco enormemente su generosidad, al permitirme formar parte de su vida, y su amistad sincera.

A mis amigos de Bariloche, Vattu, Luqui, Romi, Pauli y Sabri, así como a mis amigos bonaerenses, Car, Pira, Romi y Marie, les estaré eterna y profundamente agradecida. Su constante apoyo, tanto en los momentos difíciles como en los de celebración, es invaluable. Han estado a mi lado en cada paso del camino, brindándome fuerza, inspiración y motivación tanto a nivel personal como profesional.

Quiero hacer mención especial a cada persona que formó parte del departamento de Física Médica. Los momentos compartidos, ya sean mates, almuerzos, discusiones o fiestas, serán atesorados en mis recuerdos más preciados. En este punto hago especial mención a Lau y Emi, gracias chicas!

Y, aunque la lista de agradecimientos podría extenderse indefinidamente, quiero dejar en claro que el desarrollo de una tesis doctoral involucra a cada persona, desde aquel que preparó el primer mate al inicio del día hasta el último miembro del jurado que firmó el acta aprobando la defensa. Todos y cada uno de ustedes me han llevado hasta este momento, y por ello, nunca lo olvidaré.

¡GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS!

Índice general

1. Introducción	3
1.1. Neurogénesis adulta y evolución	4
1.2. Anatomía telencefálica comparada	11
1.3. Células madre neurales	15
1.4. Modulación de la neurogénesis adulta	20
2. Técnicas experimentales	25
2.1. Animales	25
2.2. Eutanasia y disección	26
2.3. Marcado de células en proliferación: EdU	27
2.4. Marcaciones histológicas	27
2.5. Adquisición de imágenes	29
2.6. Análisis de imágenes	30
2.7. Electrofisiología	31
2.8. Análisis estadístico	33

3. Neurogénesis en el <i>pallium</i> del pez cebra adulto	35
3.1. Resultados	36
3.1.1. Dinámica espacio-temporal de CMNs marcadas	37
3.1.2. Potencial de amplificación limitado de CMNs adultas	45
3.1.3. Multipotencialidad de las CMNs	49
3.2. Discusión y conclusiones	58
4. Electrofisiología de células el <i>pallium</i> del pez cebra	65
4.1. Resultados	67
4.2. Discusión y conclusiones	73
5. Modulación de las zonas proliferativas de <i>pallium</i>	77
5.1. Resultados	82
5.1.1. Ambiente enriquecido	82
5.1.2. Restricción social	83
5.2. Discusión y conclusiones	89
6. Conclusión general	95
7. Lista de publicaciones	99
A. Apéndices	101
A.1. Apéndice 1: Reacción de click	101
A.2. Apéndice 2: Distribución de CMNs marcadas a 4dpi	102
A.3. Apéndice 3: Protocolo de medición de distancias	103
A.4. Apéndice 4: Ajustes a curvas exponenciales	104
A.5. Apéndice 5: Ejemplos de trazos neuronales.	106

A.6. Apéndice 6: Propiedades electrofisiológicas, células GABAérgicas	109
A.7. Apéndice 7: Propiedades electrofisiológicas, células glutamatérgicas	111

Glosario

wtAB *wild type* AB.

ACSF líquido cefalorraquídeo artificial.

AE ambiente enriquecido.

AHP *after hyperpolarization*.

APD duración del potencial de acción.

BMP proteína morfogénica ósea.

BO bulbo olfatorio.

BrdU 5-bromo-2'-deoxiuridina.

CDK kinasa dependiente de ciclinas.

CGD célula granular dentada.

Cm capacitancia de membrana.

CMN célula madre neural.

Da región dorsal anterior del *pallium*.

Dc región dorsal central del *pallium*.

DI región dorso lateral del *pallium*.

Dm región dorso medial del *pallium*.

Dp región dorso posterior del *pallium*.

dpf días post-fertilización.

dpi días post-inyección.

EdU 5-ethynyl-2'-deoxyuridine.

GABA ácido gamma aminobutírico.

gad1b glutamato decarboxilasa 1b.

GCL capa celular granular.

GD giro dentado.

GFAP *glial fibrillary acidic protein*.

GFP proteína fluorescente verde o *green fluorescent protein*.

GS glutamina sintetasa.

H *hilus*.

I_K corriente de K voltaje dependiente.

I_{Na} corriente de Na voltaje dependiente.

mcm complejo proteico de mantenimiento de minimicrosomas.

ML capa molecular o *molecular layer*.

MWM *morris water maze*.

ND1 *neurogenic differentiation 1*.

NGN2 neurogenina2.

PAamp amplitud del potencial de acción.

PAinm potencial de acción inmaduro.

PAumb umbral del potencial de acción.

PCNA antígeno nuclear de proliferación celular.

PV parvalbúmina.

Rm resistencia de membrana en reposo.

RS restricción social.	nápticas exitatorias espontáneas.
s/PA sin disparo de potencial de acción.	SN sistema nervioso.
sEPSC corrientes post sinápticas exitatorias espontáneas.	Vm potencial de reposo de la membrana.
sEPSCamp amplitud de corrientes post sinápticas exitatorias espontáneas.	ZPV zona periventricular.
sEPSCfreq frecuencia de corrientes post si-	ZSG zona sub-granular.
	ZSV zona sub-ventricular.

CAPÍTULO 1

Introducción

La capacidad de adaptación al entorno es un aspecto esencial para la continuidad de una especie. A lo largo de la evolución se han observado desde cambios anatómicos hasta modificaciones fisiológicas que condujeron a la persistencia o extinción de numerosas especies. Un ejemplo de ello es el proceso de encefalización del sistema nervioso (SN). Su evolución implicó el pasaje de un sistema simple a uno muy complejo, es decir, se observaron desde cordones nerviosos de muy pocas neuronas (en especies primitivas) hasta sistemas formados por cordones nerviosos periféricos que a su vez eran controlados funcional y estructuralmente por otros centros nerviosos de procesamiento (como la médula espinal y el encéfalo en vertebrados). Para que eso suceda, el SN fue modificándose de manera tal que se observó la aparición de patrones bilaterales, anteroposteriores y dorso ventrales, además de una complejización funcional y morfológica interna (Martín-Durán and Hejnol, 2021).

El estudio de la filogenia del SN puede ser abordado desde distintos ejes, siendo el proceso de plasticidad neuronal postnatal el más frecuentemente utilizado. Este consiste en la “habilidad que posee el SN de un individuo adulto de responder a estímulos intrínsecos o extrínsecos mediante la reorganización de su estructura, conexiones y función” (Cramer et al., 2011; La Rosa et al., 2019). Este aspecto se ha estudiado tanto a escala molecular (que incluye modificaciones en la expresión génica o proteica, entre otras) como anatómica (por ejemplo, alteraciones en el número y complejidad de las conexiones de las células nerviosas).

La plasticidad neuronal entonces se puede clasificar según si se producen alteraciones a escala sináptica o a escala celular. La plasticidad que implica alteraciones de la conectividad de una neurona preexistente puede implicar modificaciones en la liberación de neurotransmisores pre-sinápticos, en el tráfico de receptores post-sinápticos, así como también en la

expresión génica y la síntesis proteica. En última instancia, este tipo de plasticidad modifica la fuerza de la comunicación sináptica (Bliss and Collingridge, 1993).

En cambio, también pueden producirse cambios en el número de células nerviosas, mediante incorporación de nuevas neuronas o a cambios en la morfología e identidad celular, lo que implica formación o eliminación de contactos sinápticos (Holtmaat and Svoboda, 2009). Los procesos de gliogénesis y neurogénesis forman parte de esta categoría. La gliogénesis implica la incorporación de células gliales no-neuronales que constituyen la matriz extra-celular que facilita la función neuronal (Bonfanti, 2013). En cambio, la neurogénesis, consiste en la formación de nuevas neuronas que se incorporan o reemplazan a neuronas de circuitos preexistentes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

La comprensión de este proceso a distintos niveles filogenéticos ha adquirido mucha importancia en los últimos años ya que posee un alto potencial de aplicación clínica. Sentar las bases sobre cómo se modifica el SN a través de los distintos mecanismos de neuroplasticidad puede beneficiar tanto la comprensión de patologías neurodegenerativas o procesos naturales de deterioro cognitivo como la mejora de estrategias de tratamiento y técnicas de diagnóstico (Cosacak et al., 2020; Cramer et al., 2011; Moradi et al., 2021; Sung et al., 2020).

1.1 Neurogénesis adulta y evolución

La neurogénesis adulta, es decir, la incorporación de nuevas neuronas a circuitos neuronales preexistentes, es un mecanismo de plasticidad muy estudiado. Se hipotetiza que puede contribuir tanto al recambio de neuronas como al aprendizaje o la mejora en el desempeño de nuevas habilidades cognitivas.

Estudios previos han demostrado la existencia de neurogénesis adulta en muchas especies de vertebrados. Sin embargo, su magnitud disminuye conforme se avanza en la filogenia, y se va limitando a ciertas regiones particulares del cerebro (La Rosa et al., 2019). Es un fenómeno significativamente marcado en peces, moderado en aves y reptiles, y que en mamíferos se restringe a dos regiones telencefálicas específicas, como se puede ver en la Figura 1.1 (Ferretti, 2011; Kaslin et al., 2008).

Se estima que esas diferencias podrían deberse a una amplia variedad de factores. La abundante neurogénesis de peces, anfibios y reptiles coincide con una estructura telencefálica post-embrionaria en constante crecimiento, a diferencia de lo que sucede en aves y mamíferos. La relación estructura-función es otro importante aspecto a considerar. En mamíferos la neurogénesis es muy abundante en el bulbo olfatorio y coincide con un predominante uso del sistema olfativo en contraste, por ejemplo, con las aves, cuya neurogénesis en la retina se condice con un mayor uso del sistema visual (Kaslin et al., 2008).

A continuación, se llevará a cabo una breve revisión sobre las características generales

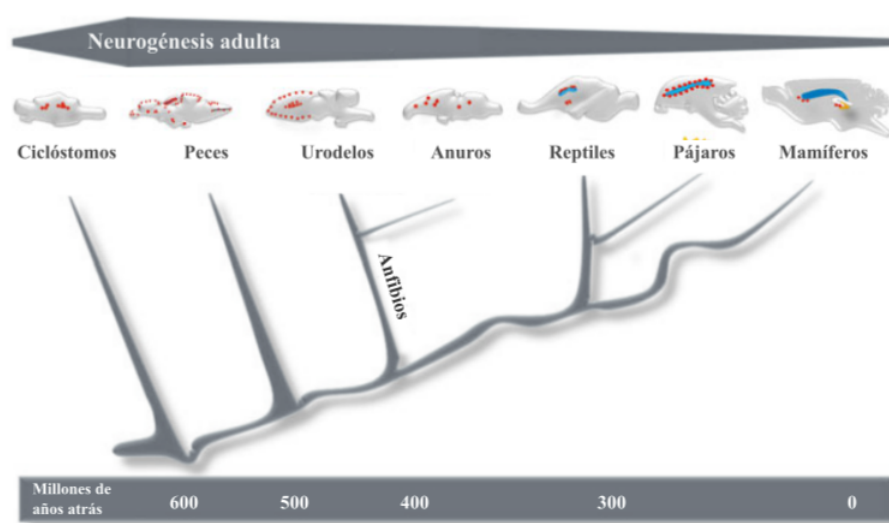


Figura 1.1: **Filogenia del proceso de neurogénesis adulta en vertebrados.** Representación esquemática del árbol filogenético de vertebrados y las diferencias encontradas respecto al número de regiones neurogénicas. Puntos rojos: regiones con proliferación/neurogénesis adulta reportada. Figura modificada de Kuhn and Eisch (2014).

de la neurogénesis adulta en las especies más utilizadas en el ámbito científico. Se prestará especial atención a las regiones neurogénicas, las características de las nuevas neuronas generadas y su rol en la función cerebral.

Humanos

Durante muchísimos años la neurogénesis adulta en la especie humana fue muy cuestionada. Durante el siglo XIX y parte del siglo XX se vio al SN humano como una estructura estática e inmutable. Esta idea se mantuvo vigente hasta los años '60, momento en que aparecieron técnicas de marcación del ADN de células en división como la timidina H^3 (una timidina unida a un isótopo radiactivo) y fue por entonces que la ciencia se enfocó en el estudio del proceso de neurogénesis adulta (Miller and Nowakowski, 1988; Sidman et al., 1959).

Sin embargo, fue recién en 1998 que surgió la primera evidencia concreta de neurogénesis adulta en humanos. Un grupo de pacientes terminales fue tratado con BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridina), un análogo sintético de timidina, para evaluar la actividad proliferativa de células tumorales. Se les extrajo tejido cerebral post-mortem y se observó la presencia de células BrdU⁺ en el hipocampo humano que mostraban colocalización con el biomarcador neuronal NeuN. Es decir, había células proliferantes en el momento de la marcación con BrdU que siguieron un proceso de diferenciación neuronal (Eriksson et al., 1998). Estudios posteriores continuaron reportando subpoblaciones de neuronas nuevas en el hipocampo humano, ya sea mediante implementación de otros métodos de marcación (como los análogos de timidina halogenados -IdU- o mediante incorporación de ^{14}C) o a partir de cultivos de

células madre de tejido de hipocampo humano adulto (Boldrini et al., 2018; Ernst et al., 2014; Palmer et al., 2001; Spalding et al., 2013). Fue allí que se definió que la neurogénesis adulta en humanos se restringía exclusivamente al giro dentado (GD) del hipocampo, y con una tasa neurogénica muy baja. De acuerdo al trabajo de Spalding et al. (2013) se estimó que la región generaba aproximadamente 700 neuronas nuevas por día.

En simultáneo con la baja capacidad neurogénica limitada a una única región cerebral, el aumento de la expectativa de vida dio lugar al surgimiento de enfermedades neurodegenerativas y a la pérdida de habilidades cognitivas en edades avanzadas. Esto reforzó la importancia del estudio de la neurogénesis adulta como mecanismo compensatorio y la búsqueda de estrategias neuroprotectoras pasó a ser la motivación de numerosas investigaciones. Se espera que los avances en este área puedan llevar al descubrimiento de tratamientos para enfermedades como el Alzheimer o para el beneficio de comportamientos de tipo depresivo o ansioso, entre otros (Anacker and Hen, 2017; Anacker et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019).

Roedores

Los roedores, por su parte, son el principal modelo utilizado para el estudio de la neurogénesis adulta. Si bien son especies cercanas filogenéticamente a la especie humana, poseen una producción continua de cohortes neuronales en dos regiones cerebrales específicas: la zona sub-ventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona sub-granular (ZSG) del GD del hipocampo (región neurogénica compartida con humanos) (Zhao et al., 2008).

La ZSV de los ventrículos laterales es uno de los reservorios de células madre neurales (CMN) más grandes del cerebro adulto de mamíferos. Está compuesta por al menos cuatro tipos celulares que participan en el proceso de diferenciación y migración de nuevas neuronas y en el mantenimiento de las CMNs. Una vez comenzado el proceso de diferenciación celular en la ZSV las células migran al bulbo olfatorio (BO) por la vía migratoria rostral. Allí maduran como interneuronas inhibitorias glomerulares y periglomerulares, y se integran a los circuitos preexistentes. Este proceso es relativamente rápido ya que en pocas semanas se generan neuronas morfológicamente maduras. A nivel molecular las células inmaduras expresan, durante las primeras semanas de diferenciación, los marcadores DCX y PSA-NCAM, que señalizan procesos de migración y adhesión celular neural, respectivamente. Posteriormente, expresan tuji1 y TUC4, marcadores involucrados en migración y crecimiento axonal. Y por último, expresan NeuN, un marcador neuronal.

La principal diferencia entre neuronas glomerulares y periglomerulares está en el desarrollo de los contactos sinápticos. Las primeras desarrollan los contactos y luego incorporan la capacidad de disparar potenciales de acción en un periodo de dos semanas, mientras las segundas lo hacen en el orden inverso y en un proceso que dura cuatro semanas (Lledo et al., 2006). De esta manera, diariamente la ZSV incorpora aproximadamente 30000 neuronas nuevas al BO. Se estima que existe un reemplazo continuo de neuronas en el BO

cuya función es el procesamiento de información sensorial, es decir, la adaptación de los circuitos del sistema olfativo a los distintos entornos ambientales u olores, facilitando la discriminación olfativa (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).

La ZSG del GD del hipocampo, en cambio, posee una capacidad neurogénica íntegra. Es decir, allí las CMNs dan lugar a progenitores neurales que se diferencian e integran localmente. De esta manera, los axones de las nuevas neuronas maduras integradas se comunican con CA3 (capa principal de células piramidales del hipocampo) mientras su árbol dendrítico se establece en la capa molecular del GD. Allí las distintas etapas de la neurogénesis adulta pueden reconocerse a escala molecular, anatómica y electrofisiológica. Inicialmente, y a escala molecular, sigue el mismo patrón de expresión que las células de la ZSV: los progenitores expresan inicialmente DCX y PSA-NCAM, para luego comenzar a incorporarse a la capa molecular del GD y expresar calretinina (una proteína de unión a Ca^{2+} , moduladora de la actividad neuronal) y NeuN. Luego, a las cuatro semanas de edad, dejan de expresar calretinina y comienzan a expresar calbindina, manteniendo la expresión de NeuN (Lledo et al., 2006). A nivel morfológico, en cambio, las nuevas células granulares alcanzan su máximo desarrollo dendrítico en longitud y número de dendritas en tres semanas y es recién a las cuatro semanas que alcanzan el máximo número de espinas dendríticas (Trincherro et al., 2017).

La integración sináptica en el GD comienza con la formación de *inputs* GABAérgicos, seguido del proceso de sinaptogénesis glutamatérgica, que es acompañada por la formación de espinas dendríticas hacia la tercer semana de desarrollo (Espósito et al., 2005; Trincherro et al., 2017). Se sabe que en el GD de ratas adultas se producen aproximadamente 9000 neuronas nuevas/día (Cameron and McKay, 2001).

En resumen, los roedores poseen dos regiones neurogénicas en la adultez donde las nuevas neuronas se integran eficientemente, reciben *inputs* funcionales y se vuelven indistinguibles de las neuronas generadas durante el desarrollo. Puede decirse que su estudio e implementación como modelo de neurogénesis adulta se basa en la cercanía filogenética con los humanos y en que son los modelos más implementados para la caracterización del SN.

Teleósteos

En las últimas décadas los peces teleósteos han sido uno de los principales modelos utilizados para el estudio de la neurogénesis embrionaria debido a su transparencia óptica, su facilidad de manipulación genética y a que poseen una extensa capacidad de regeneración neuronal. Sin embargo, también han comenzado a utilizarse para el estudio de la neurogénesis adulta debido a que sus nichos neurogénicos están ampliamente distribuidos en todo el eje rostro-caudal del SN y se conservan durante toda la vida del pez. Se vio que la neurogénesis adulta de estas especies se distribuye a lo largo del telencéfalo, del diencefalo, mesencéfalo y rombencéfalo y está ampliamente conservada en las distintas especies sugiriendo un plan común en su evolución (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Se postula que el rol de

dicho potencial neurogénico podría explicarse como un mecanismo simple de reemplazo de neuronas preexistentes o por adición de nuevas neuronas conforme crece el pez, ya que su crecimiento es continuo y debería ir acompañado de una expansión de las distintas regiones sensoriales (Ganz and Brand, 2016).

En la actualidad el pez cebra (*Danio rerio*) es un ejemplo de pez teleósteo ampliamente utilizado como modelo de estudio de desarrollo (Parker et al., 2013). Su transparencia durante las etapas del desarrollo temprano y el hecho de que las regiones neurogénicas del telencéfalo se encuentren expuestas hacia el ventrículo exterior son una gran ventaja a la hora de realizar estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han podido caracterizar múltiples regiones de su SN en cuanto a la generación de nuevas neuronas y, a continuación, se detallan las estructuras neurogénicas más importantes.

Hipotálamo

La estructura hipotalámica, responsable de la secreción de múltiples hormonas implicadas en la reproducción y la homeostasis general del pez, puede ser subdividida en regiones dorsal, ventral y caudal. Las células proliferativas se ubican en las regiones que están en contacto con el ventrículo y forman una zona proliferativa continua. Poco se sabe de la neurogénesis en esta región pero experimentos de marcado de progenitores con BrdU muestran que las nuevas células generadas se ubican a pocos micrones de la zona de origen. Dichas células expresan distintos marcadores según la región donde se encuentren pero todas coinciden en marcadores gliales como S100 β , *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), y aromatasaB excepto por la región ventral donde no se observa S100 β (Ganz and Brand, 2016; Grandel et al., 2006; Wullimann et al., 1996).

Tectum óptico

El tectum óptico por su parte, es una de las estructuras más predominante del SN en términos de volumen y se ubica en la región dorsal del mesencéfalo. Es una región que recibe *inputs* visuales y los integra junto a la información espacial. Posee una organización laminar de siete capas, de las cuales la correspondiente a la zona periventricular posee las células progenitoras que se encuentran en estadio de proliferación. Los progenitores expresan marcadores gliales como S100 β , GFAP y fabp7a⁺ y se distribuyen mayoritariamente en la región caudal del tectum, mostrando diferencias en la cinética de división celular según la región donde se encuentran. Las células en proliferación, en cambio, no muestran los marcadores típicos gliales (Ganz and Brand, 2016; Grandel et al., 2006). Se sabe que en esta región neurogénica los progenitores del individuo adulto dan lugar a un amplio repertorio neuronal: producen neuronas inhibitorias GABAérgicas, excitatorias glutamatérgicas y oligodendrocitos (Ito et al., 2010).

Cerebelo

El cerebelo también es una estructura neurogénica cuya función principal consiste en el equilibrio, la coordinación y la correcta ejecución de movimientos. En esa región se encuentran progenitores indiferenciados que poseen marcadores como *nestina* y *sox2* (no presentan marcadores típicos gliales) y muestran una baja tasa de amplificación (Kaslin et al., 2009). Dan lugar a células granulares que se ubican en la capa de células granulares pero se sabe poco sobre su regulación.

Telencéfalo

El cerebro del pez cebra posee dieciséis zonas proliferativas distribuidas en toda su extensión (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Zupanc et al., 2005). En el telencéfalo, los nichos proliferativos pueden caracterizarse según la región en la que se encuentran: región ventral (también llamada *subpallium*) o dorsal (llamada *pallium*) del telencéfalo. Se cree que cada una de ellas da lugar a subtipos celulares específicos y que poseen patrones de diferenciación y migración característicos.

En la región ventral se observan zonas proliferativas abundantes que disminuyen hacia la región dorsal. A su vez, las células proliferativas se ubican en varias capas cercanas al ventrículo y contribuyen a la neurogénesis local y a la neurogénesis del BO. Estudios de *imaging in vivo* muestran precursores neuronales que migran desde zonas proliferativas rostro-ventrales del telencéfalo hacia el BO del pez cebra, replicando lo que sucede por la vía migratoria rostral en mamíferos (Ganz and Brand, 2016). En la región dorsal, en cambio, se observa una capa de células gliales en la zona proliferativa adyacente al ventrículo que da lugar a nuevas neuronas. Se ha observado que las mismas no migran grandes distancias al madurar sino que se quedan unos pocos micrones hacia dentro del parénquima (su descripción se ampliará en la sección *Células madre neurales - Zonas proliferativas y nichos neurogénicos*).

El telencéfalo del pez cebra posee una tasa neurogénica muy elevada, de 6000 células nuevas cada 30 minutos y, si bien se ha avanzado mucho en el estudio del fenómeno de neurogénesis adulta, aún quedan muchas preguntas por responder (Hinsch and Zupanc, 2007). Su región proliferativa está formada por células de la glia radial, un subtipo celular bi-potente que cumple el rol de dar lugar a nuevas neuronas en el pez adulto y también de auto-renovarse para mantener constante el reservorio de CMNs durante toda la vida del pez (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Labusch et al., 2020; Than-Trong et al., 2020).

Conclusión

El proceso de neurogénesis adulta se encuentra extendido en todo el árbol filogenético pero se puede observar que ha disminuido en magnitud y número de nichos neurogénicos

conforme se avanza en la filogenia. Según múltiples trabajos las razones que conllevan a esta variabilidad filogenética podrían ser muy variadas:

- **En relación al crecimiento de individuos adultos.** Se observa que la extensión del proceso de neurogénesis adulta sigue una tendencia similar al crecimiento de los individuos adultos de cada especie. Es decir, en el pez cebra por ejemplo se observa abundante neurogénesis a la vez que son individuos que siguen creciendo en la adultez. En mamíferos, en cambio, se observa un proceso neurogénico limitado a pocas regiones cerebrales, que disminuye con la edad, y eso se condice con que alcanzan la adultez y se detiene su crecimiento (Lindsey and Tropepe, 2006).
- **En respuesta al riesgo tumorigénico.** Se observó que, en paralelo al avance filogenético, existe un incremento del riesgo tumorigénico. En ese contexto, la presencia de una alta tasa neurogénica requerirá de mecanismos de control de mutaciones muy activos. Por ello, es posible que la presión evolutiva haya disminuido la neurogénesis como mecanismo protector. De esa manera, los organismos con menos neurogénesis presentan un entorno desfavorable para el desarrollo de tumores y facilitan la efectividad de los mecanismos de control (Pearson and Alvarado, 2008).
- **Mecanismos regulatorios.** Mecanismos de plasticidad como la neurogénesis adulta tienen lugar en respuesta a estímulos intrínsecos y extrínsecos que son específicos de cada región neurogénica. Experimentos previos han demostrado que al extraer progenitores de un nicho y depositarlos en otro da lugar a que los progenitores (independientemente de su programa genético inicial) se adapten a las nuevas condiciones del entorno, y den neuronas nuevas acordes al nicho que las adoptó. En ese contexto, puede que la presión de selección haya actuado sobre estos mecanismos regulatorios y que la neurogénesis sea una mera consecuencia de ello.
- **Estabilidad circuital y memoria.** Diversos estudios en roedores han evidenciado que los rearrreglos circuitales alteran la formación de memorias. Se sabe que la incorporación de nuevas neuronas al GD del hipocampo participa en la mejora de la estabilidad de las memorias espaciales como la separación de patrones. En contraste, se ha observado que un aumento excesivo en la neurogénesis puede llevar a la pérdida de memorias previamente adquiridas. Por lo tanto, la neurogénesis adulta puede influenciar la estabilidad de las memorias contribuyendo a la capacidad de adaptación de los individuos, siempre y cuando se mantenga un equilibrio homeostático adecuado en este proceso (Mongiat and Schinder, 2014; Mugnaini, 2023; Tuncdemir et al., 2022).

Si bien es prácticamente imposible llegar a un consenso sobre cual es la opción correcta, se puede comparar el funcionamiento de la neuroplasticidad en vertebrados inferiores y superiores y eso podría dar lugar a nuevos paradigmas relevantes para la especie humana (Kizil et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, de los distintos modelos analizados el pez cebra posee neurogénesis adulta en todo su cerebro y, por ello, su implementación facilita el estudio de las

bases del funcionamiento de la neurogénesis adulta. Además, su comparación con mamíferos podría enriquecer y facilitar la implementación de terapias neurogénicas en enfermedades neurodegenerativas.

1.2 Anatomía telencefálica comparada

Para estudiar y comprender las bases de la neurogénesis adulta es importante conocer algunas características distintivas del modelo utilizado. El estudio del desarrollo neuronal puede ser abordado en una amplia diversidad de especies ya que el plan estructural básico del desarrollo del cerebro está muy conservado en vertebrados. Sin embargo, en estadios más avanzados del desarrollo surgen las características específicas del SN de cada especie y aparecen las principales diferencias. Un claro ejemplo de ello es la estructura telencefálica, ya que en etapas tempranas se produce una distribución de sub-regiones telencefálicas completamente distintas entre las especies.

El SN del pez cebra comienza a desarrollarse pocas horas después de la fertilización, al fin del proceso de gastrulación y comienzo de la segmentación. Justo antes de la generación del telencéfalo tiene lugar un evento clave: el proceso de desarrollo del tubo neural (o neurulación), momento en el que se bifurcan los caminos de diferenciación. En peces teleósteos sucede un proceso de *eversión* que consiste en el crecimiento del tubo neural, que se curva lateralmente y se pliega hacia la región ventral, produciendo dos enormes hemisferios que flanquean una sola cavidad ventricular (Diotel et al., 2020; Mueller and Wullmann, 2015). En mamíferos, en cambio, se produce una evaginación del tubo neural que da lugar a dos vesículas que producen los hemisferios telencefálicos con dos ventrículos internos (los ventrículos laterales). En la figura 1.2 puede observarse un diagrama explicativo de ambos procesos (Mueller et al., 2011).

Esta temprana variación neuroanatómica da lugar a múltiples enfoques comparativos, entre ellos la organización intra-telencefálica y la funcionalidad de las distintas sub-regiones.

Regionalización u organización intra-telencefálica

El proceso de desarrollo telencefálico da como resultado una distribución espacial variable para las distintas especies de vertebrados. En roedores, la regionalización está ampliamente caracterizada y las zonas neurogénicas bien definidas, como puede observarse en la Figura 1.2 E,G. Una de las zonas neurogénicas es el GD del hipocampo, una estructura en forma de “V” laminada que se ubica cerca de la fisura del hipocampo. La ZSV en cambio se encuentra en las paredes de los ventrículos laterales, dos cavidades en forma de “C” que se encuentran en los distintos hemisferios y contienen líquido cefalorraquídeo. Para el pez cebra, en cambio, no es tan sencilla la delimitación de regiones del *pallium* y en la actualidad se están realizando estudios para establecer homologías con las subdivisiones de mamíferos.

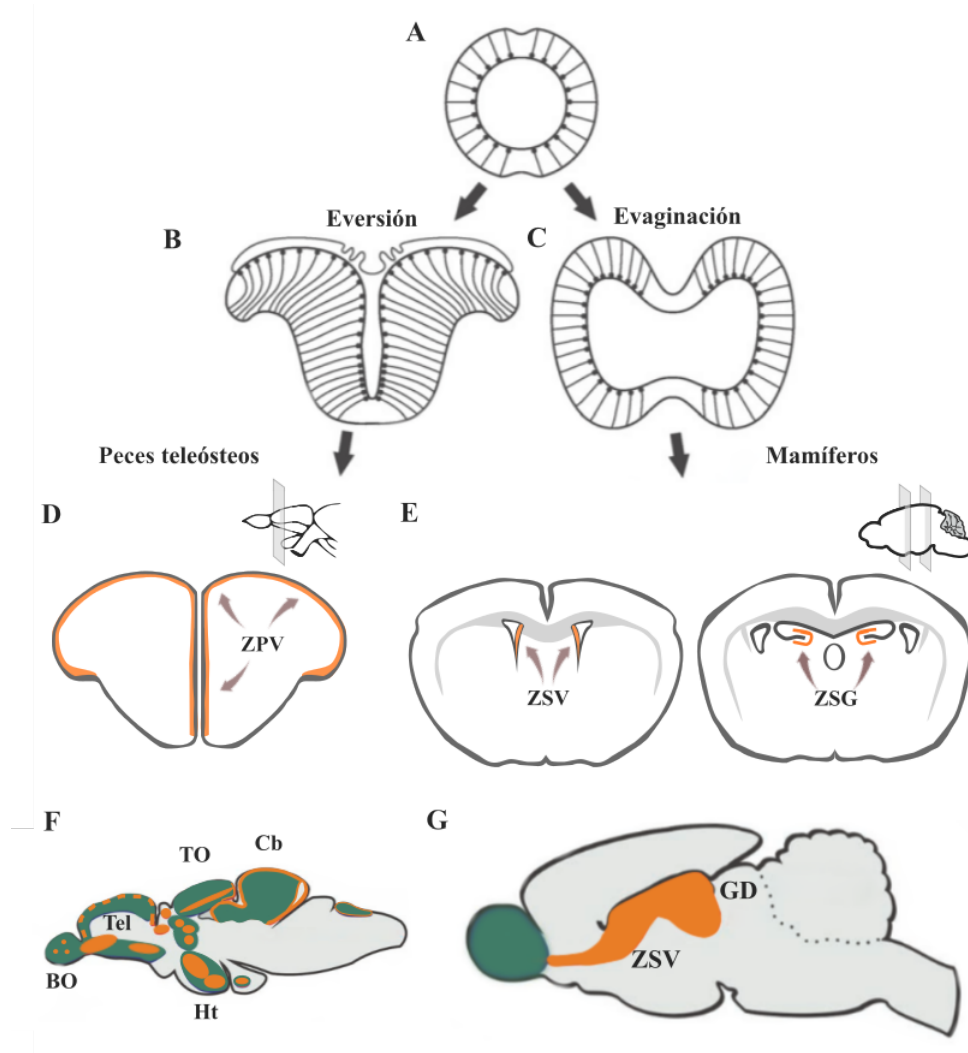


Figura 1.2: Representación esquemática del proceso de eversión y evaginación del tubo neural en vertebrados. (A) Vista coronal de la región telencefálica del tubo neural compartida por todos los vertebrados. (B,D) Proceso de diferenciación del telencéfalo de peces teleósteos que luego del sufrir una eversión (B) da lugar a dos hemisferios rodeados por una cavidad ventricular (D). (C,E) Proceso de diferenciación telencefálica de mamíferos mediante evaginación (C) del tubo neural que da lugar a dos ventrículos internos (E). (F-G) Corte transversal del telencéfalo que muestra la distribución de regiones proliferativas -naranja- y neurogénicas -verde- en peces teleósteos (F) o mamíferos (G). ZPV: zona periventricular, ZSV: zona sub-ventricular, ZSG: zona sub-granular, BO: bulbo olfatorio, Tel: telencéfalo, TO: tectum óptico, Cb: cerebelo, Ht: hipotálamo, GD: giro dentado. Figura modificada de Kizil et al. (2012); Mueller et al. (2011).

Se sabe que el telencéfalo se subdivide en dos grandes estructuras: el lóbulo dorsal o *pallium* y el lóbulo ventral o *subpallium*. La división entre ambos se establece en función de la expresión de genes ortólogos específicos de ambas regiones. Durante el desarrollo temprano del pez cebra las CMNs del *pallium* expresan los factores de transcripción *tbr* y *NeuroD* dando lugar a la generación de neuronas glutamatérgicas. En el *subpallium*, en cambio, se expresan *dlx2a/b* y *dlx5a* señalando procesos de migración y neurogénesis GABAérgica (Ganz et al., 2012, 2015; Mueller et al., 2011).

Al intentar dilucidar los sub-dominios del *pallium* en el pez cebra en función de la expresión génica se llegó al siguiente consenso: el *pallium* se divide en la región dorsal medial (Dm), dorsal lateral (Dl), dorsal central (Dc) y dorsal posterior (Dp) y todas pueden ser reconocidas fácilmente en cortes coronales, como puede observarse en la Figura 1.3A (Ganz et al., 2015; Perathoner et al., 2016; Wulliman et al., 2012).

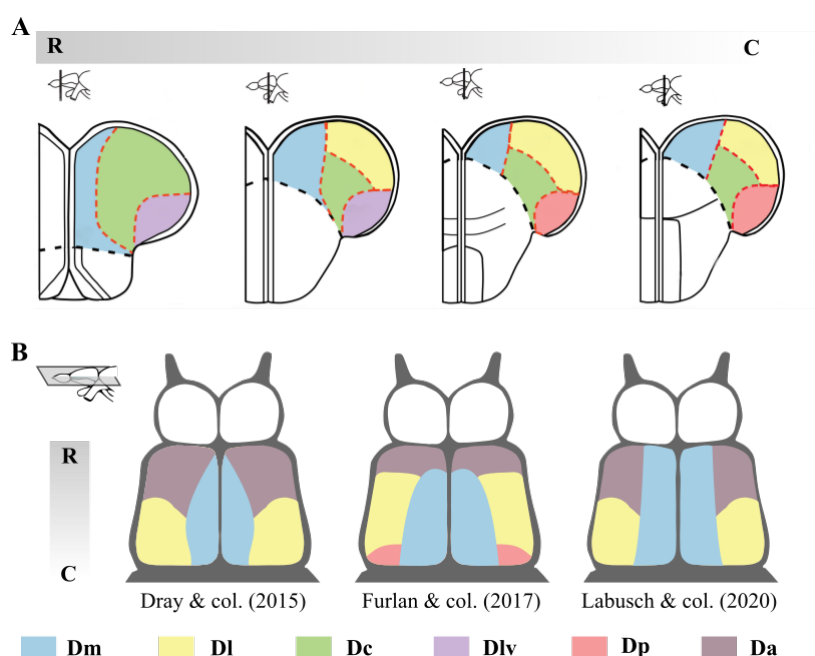


Figura 1.3: **Representación esquemática de la regionalización rostro-caudal del telencéfalo del pez cebra.** (A) Distribución rostro-caudal de las subregiones telencefálicas en cortes coronales. (B) Representación de las alternativas actuales de regionalización del telencéfalo con vista dorsal. Dm: dorso-medial, Dl: dorso-lateral, Dc: dorso central, Dlv: dorso-lateral ventral, Dp: dorso posterior, Da: dorsal anterior. R: rostral, C: caudal. Línea negra punteada: subdivisión entre *pallium* y *sub-pallium*. Figura A modificada de Ganz et al. (2014).

En los últimos años, debido a la aparición de nuevas técnicas (como el aclarado de tejido, revelado neuronal *in vivo*, *imaging* de Ca^{2+} y avances en los equipos de microscopía) se han reportado estudios que trabajan con el cerebro entero del pez cebra. Esto trajo aparejada la necesidad de re-interpretación de las subdivisiones del *pallium* desde una visión transversal ya que todavía no se había establecido un consenso respecto a ello. En la Figura 1.3 B se pueden observar las alternativas consideradas en distintos trabajos. Todos parecen coincidir en la presencia de regiones Dm, Dl y Da (*pallium* dorsal anterior). Sin embargo, la proporción

considerada para Dm y Da es variable, así como también Dl y la presencia de Dp (Bartoszek et al., 2021; Dray et al., 2015; Furlan et al., 2017; Huang et al., 2020; Labusch et al., 2020).

Homología funcional

Para abordar el estudio funcional de las subregiones paliales se han realizado distintos tipos de aproximaciones experimentales. En roedores, múltiples trabajos demostraron la asociación entre el hipocampo y la memoria mediante el entrenamiento en distintos paradigmas comportamentales (como reconocimiento de objetos, separación de patrones o secuencias de olores, entre otros) y la implementación de lesiones mecánicas o silenciamiento temporal del hipocampo. De esa manera, se evidenció su participación tanto en memorias espaciales como no espaciales o episódicas (Cohen et al., 2013; Fortin et al., 2002; Gilbert et al., 1998). Por otra parte, el estudio funcional de la ZSV arrojó que su rol es netamente la generación de células granulares que permiten al BO la discriminación de olores, es decir, al disminuir el número de nuevas células granulares generadas por la ZSV se afectó directamente la función del BO (Gheusi et al., 2000). Otras estrategias ampliamente utilizadas son el estudio de la expresión de marcadores de actividad celular o la medición directa de actividad neuronal *in vivo* en simultáneo con la realización de tareas espaciales.

En relación a lo mencionado anteriormente, el estudio funcional de las subdivisiones paliales de peces también fue abordado con dichas estrategias. Por ejemplo, la región subpial evidenció homología con los ganglios basales de mamíferos mediante el estudio de la expresión temprana de marcadores genéticos (Mueller et al., 2008). El *pallium*, en cambio, se asoció con procesamiento sensorial y cognitivo, como es el caso del desarrollo de memorias, aprendizaje y respuesta emocional (Gómez et al., 2006; Perathoner et al., 2016).

La región Dm, tanto en el pez cebra como en pez dorado (*Carassius auratus*), mostró homología con la amígdala basolateral de mamíferos cuya función se relaciona con aprendizajes de contexto emocional de valencias opuestas, es decir, tanto para respuestas de miedo como de recompensa (Mueller, 2022). Evidencia de dicha asociación son las marcaciones inmunohistoquímicas o registros de actividad neuronal (Lal et al., 2018; Torigoe et al., 2021). También se generan interferencias en aprendizajes asociativos aversivos como el paradigma de evitación activa mediante lesiones en la región dorsal telencefálica (Portavella et al., 2003, 2004a,b). Por otra parte, estudios con drogas psicoactivas y recompensas también relacionan su efecto a la actividad de la región Dm (von Trotha et al., 2014).

La región Dl, en cambio, fue asociada directamente con el hipocampo de mamíferos, una región implicada en la representación espacial y las memorias episódicas. Técnicas experimentales como la lesión de dicha región muestran la pérdida de la capacidad de desarrollar estrategias aloécnicas espaciales en búsqueda de alimento (Durán et al., 2010) y perjudica su capacidad de realizar aprendizajes de tipo espacial (Broglia et al., 2010; Portavella et al., 2003, 2004b).

Por otra parte, algunos trabajos han evidenciado la participación de ambas regiones simultáneas en tareas espaciales, perturbaciones visuales y motoras o cálculo del error de predicción en la toma de decisiones (Huang et al., 2020; Mazzitelli-Fuentes et al., 2022; Torigoe et al., 2021).

1.3 Células madre neurales

Las células madre pluripotentes son células que poseen la capacidad de dar lugar a los distintos tipos celulares de un organismo. Se mantienen en condición indiferenciada hasta que señales químicas del microambiente inician la activación de múltiples cascadas de señalización que dan lugar a la división mitótica y la subsecuente especificación celular. Durante las primeras etapas del desarrollo son las células madre embrionarias las responsables de generar un organismo completo. Sin embargo, en la adultez, sólo ciertos tejidos las conservan.

El rol principal de las células madre en la adultez es mantener la homeostasis de los tejidos y protegerlos frente a distintos tipos de lesiones o desórdenes degenerativos (Finkel et al., 2021). Una de las líneas de células madre que se mantienen en la adultez son las CMNs O *Neural Stem Cells* que poseen la capacidad de dar lugar a los distintos linajes celulares del sistema nervioso y ocupan las zonas proliferativas del mismo.

Las poblaciones de CMNs son muy heterogéneas y pueden ocupar distintos reservorios y ser reguladas por una gran variedad de factores (Dulken et al., 2017). A continuación se detallarán los distintos aspectos que hacen a la heterogeneidad de la población de CMNs y se evaluará la información actual sobre la variabilidad intra e inter poblacional de las CMNs junto con los mecanismos que subyacen a su diferenciación e integración funcional.

Aspectos generales de las CMNs

Las células madre se suelen definir en función de dos aspectos: su capacidad de autorrenovación y su capacidad de generar descendencia especializada. Para que estos procesos tengan lugar la CMN debe estar activa y salir del estado de quiescencia. Esto quiere decir que podemos identificar al menos tres tipos de células en una región proliferativa: (a) latentes o en estado de reposo (inactivo), (b) activas en proceso de autorrenovación u (c) operacionales o en proceso de diferenciación. Cada una de ellas en distintos estadios del proceso de desarrollo neuronal, como puede observarse en la Figura 1.4.

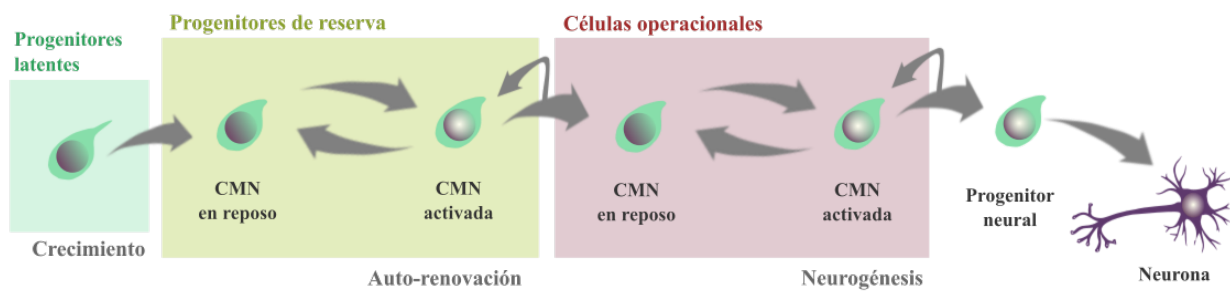


Figura 1.4: Esquema de la composición celular de la zona proliferativa y las etapas de diferenciación neuronal en el pez cebra. En el *pallium* del pez cebra adulto se pueden encontrar CMNs en distintos estadios. Por un lado se encuentra el reservorio de células madre latentes que permanecen inactivas hasta que cambian su patrón de expresión génica o reciben señales extracelulares. Al activarse pueden pasar a ser progenitores activos de reserva y entran en un *loop* de activación que les permite autorrenovarse. Por otro lado, las CMNs activas pueden comenzar una vía de diferenciación pasando a ser células operacionales que dan lugar a nuevas neuronas. Imagen modificada de Liu et al. (2021).

Quiescencia y proliferación

La quiescencia es un estadio celular de reposo o inactividad constitutiva reversible en el cual la célula se encuentra detenida en la fase G_0 del ciclo celular, como se puede ver en la Figura 1.5. Experimentalmente se reconoce por la ausencia o expresión indetectable de marcadores proliferativos, como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), el antígeno Ki67 o el complejo proteico de mantenimiento de minimicrosomas (mcm) con función de ADN helicasa (Forsburg, 2008; Jurikova et al., 2016). A su vez, la célula quiescente no muestra actividad de transcripción, traducción, replicación ni reparación del ADN, procesos esenciales en la división celular.

Durante la fase de quiescencia la CMN incrementa la expresión de genes involucrados en la comunicación célula-célula, de adhesión celular y señalización celular. También mantiene la expresión de inhibidores de kinasas dependiente de ciclinas (CDK) como p21, p27, p57 y p130 (Miller et al., 2007). Este aspecto hace énfasis en que la quiescencia es un estado que se mantiene activamente sin dejar de ser dinámico.

Se han estudiado múltiples factores que participan en la regulación de la activación de las CMNs y se encontró que varios de ellos se conservan tanto para especies de roedores como en peces cebra. Por un lado están las vías de señalización que mantienen la quiescencia: vía Notch y vía proteína morfogénica ósea (BMP). La inducción de la vía de Notch mantiene el estado de quiescencia y su disminución conduce al proceso de división celular. Esta vía es inducida por células vecinas que se activaron, con lo cual se considera un proceso de inhibición lateral (Chapouton et al., 2010). La inducción vía BMP implica la expresión de distintos componentes de BMP que activan la expresión de inhibidores de la unión al DNA y de la diferenciación manteniendo el estado de quiescencia (Zhang et al., 2020). Por otro lado, *Ascl1* es un activador de la vía de división. Es un promotor que al ser activado aumenta la expresión de genes del ciclo celular induciendo el proceso de activación de la CMN (Than-Trong et al., 2018). Se ha demostrado que la inhibición de alguna de estas vías conduce al

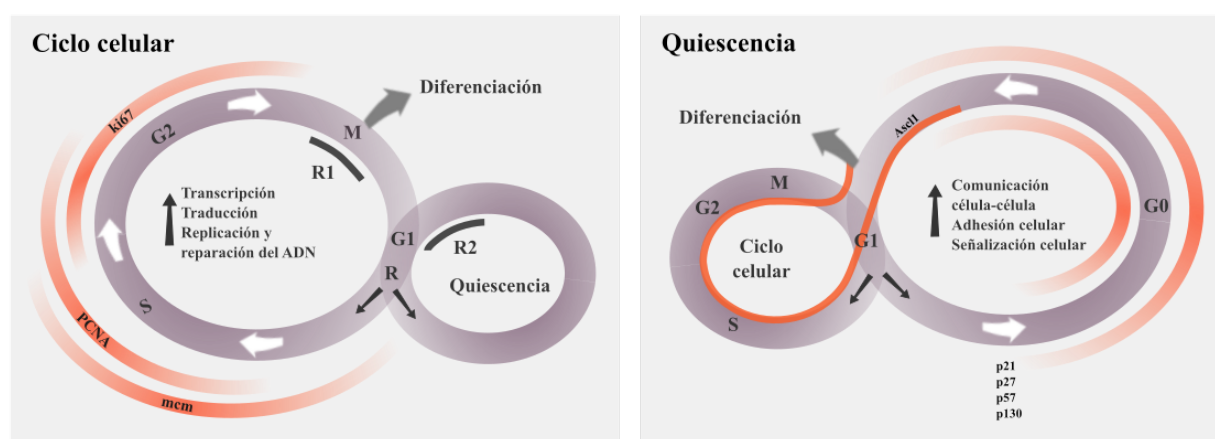


Figura 1.5: **Esquema del ciclo celular y de quiescencia.** Panel izquierdo: Ciclo celular general con fases G1, S, G2 y M. Durante el ciclo celular, las proteínas involucradas en la transcripción, traducción, replicación y reparación del ADN (mcm, PCNA y Ki67) están sobreexpresadas pero en distintos momentos (fases de expresión en rojo). Las células pueden entrar en estado de reposo o quiescencia en G1 y la decisión de entrada se toma en el punto R. Panel derecho: Ciclo de quiescencia específico de CMN. Los genes involucrados en la comunicación célula-célula, la adhesión celular y la señalización celular se sobreexpresan. En estado de quiescencia expresan p21, p27, p57 y p130. Luego las células pueden experimentar un estado de “pre-activada” que precede a la activación propiamente dicha y donde expresan ascl1, que se mantendrá durante la activación y el proceso de diferenciación. Imagen modificada de Labusch et al. (2020).

agotamiento (en roedores) o disminución (en pez cebra) de la reserva de CMNs (Imayoshi et al. (2010); Kawaguchi et al. (2013)).

Es decir que las CMNs se mantienen en condición de reposo hasta que se activan mecanismos celulares de replicación y procede a autorrenovarse o diferenciarse. Estudios de linaje genético dan evidencia de que el proceso de autorrenovación genera CMNs activas que pueden volver al reposo nuevamente de manera que mantienen estable la población de progenitores indiferenciados (Bonaguidi et al., 2011; Than-Trong et al., 2020; Urbán et al., 2016). Un estudio de transcriptómica *single cell* logró diferenciar seis sub-poblaciones de progenitores paliales en el pez cebra, con distintos estadios de quiescencia o reposo y con una expresión de genes específica según la posición donde se encontraban. Dos de esas sub-poblaciones son específicas en Dm (progenitores her4.1-PCNA⁺ y precursores de neuroblastos no proliferativos PCNA⁻), una sub-población es específica de Dl, otra de Dd y una se ubica tanto en Dm como Dd. La sexta sub-población corresponde a células proliferando activamente o a neuroblastos (PCNA⁺) que se encuentran distribuidas en todo el *pallium*. En síntesis y según las palabras del autor, “el cerebro del pez cebra adulto contiene progenitores neurales comprometidos y regionalmente especificados que generan diversidad neurogénica a través de una etapa de neuroblastos bastante homogénea” (Cosacak et al., 2019).

Diferenciación

La producción de nuevas neuronas se restringe a las zonas proliferativas del SN adoptando distinta identidad en función del nicho neurogénico en el cual se generaron. En mamíferos, la ZSG del GD posee CMNs que dan lugar a células granulares dentadas (CGD) de tipo excitatorias glutamatérgicas. Durante el proceso de diferenciación las CMNs de la ZSG siguen un programa celular específico. En estadio de quiescencia expresan factores de transcripción como Hes5 y FoxO que disminuyen al mismo tiempo que se empieza a expresar Sox2, un marcador de célula en estadio de proliferación. Luego, a medida que va madurando, expresa marcadores glutamatérgicos como tbr2 (en la etapa de especificación) o NeuroD1 (marcador de célula glutamatérgica) además de prox1 (Arredondo et al., 2020; Gonçalves et al., 2016; Ming and Song, 2011).

En la ZSV de mamíferos, en cambio, las CMNs dan lugar a células con identidad granular o periglomerular, pudiendo diferenciarse tanto a interneuronas inhibitorias GABAérgicas como excitatorias glutamatérgicas. Las CMNs expresan Hes5 y FoxO además de GFAP, vimentina o nestina, marcadores que disminuyen cuando la célula comienza a diferenciarse y se puede reconocer la marca de DCX (marcador de migración) durante el periodo de migración al BO. Por último, la expresión de GAD65 confirma su fenotipo GABAérgico (Ming and Song, 2011) o, si se activa la vía de nestina2, se expresa tbr y se producen neuronas glutamatérgicas (Brill et al., 2009; Hodge et al., 2012).

En peces teleósteos el destino neurogénico sigue en proceso de caracterización. En las últimas décadas se ha logrado caracterizar el reservorio de CMNs de los nichos neurogénicos y cómo esas células se autorrenuevan y/o diferencian en el *pallium*. Por otro lado, se encontraron en el *pallium* del telencéfalo medial tanto neuronas maduras glutamatérgicas como interneuronas GABAérgicas pero aún queda por definir si las CMNs del individuo adulto producen uno o ambos tipos neuronales en las distintas zonas neurogénicas (von Trotha et al., 2014).

Zonas proliferativas y nichos neurogénicos

Los nichos neurogénicos son las regiones neuronales con microambientes favorables para el mantenimiento de células progenitoras. Estudios en mamíferos revelaron que cada nicho posee un microambiente propio que da a las CMNs un destino neurogénico específico. Por ejemplo, se observó que al aislar CMNs de la *substantia nigra* e implantarlas en zonas neurogénicas, como la ZSV del ventrículo o la ZSG del GD, siguieron el camino de diferenciación específico de esas regiones (Moizeszowicz, 2007). Es decir, la variabilidad no sólo se encuentra entre especies sino también entre regiones de una misma especie (Bonfanti and Peretto, 2011).

En roedores, el GD posee una estructura laminar dividida en tres láminas: la capa molecular (ML), la capa de células granulares (GCL) y el *hilus* (H). En la GCL se encuentran

las neuronas granulares que son las células principales del GD, las cuales se conectan con las células piramidales de CA3 y reciben innervación de la corteza entorrinal. En GCL también se encuentran otros tipos celulares como los astrocitos (radiales y horizontales), interneuronas parvalbúmina, células gliales radiales (tipo 1, de división lenta), progenitores neurales (tipo 2, de rápida amplificación) y neuronas inmaduras (tipo 3). Por otro lado, el H y las paredes laterales de la GCL están compuestos por proyecciones neuronales y microglía, es decir, células responsables de la modulación, interacción y mantenimiento de las células granulares (Aimone et al., 2014; Seri et al., 2004).

En relación a la morfología celular y a la expresión de marcadores se sabe que las células de tipo 1 no tienen procesos radiales y expresan nestina, GFAP, y el factor de transcripción *sox2* (aunque expresan GFAP son morfológica y funcionalmente distintas de astrocitos). Las de tipo 2 en cambio tienen procesos cortos y no expresan GFAP pero si *sox2*, un factor de transcripción involucrado en la autorrenovación. Cuando las CMNs comienzan su proceso de diferenciación, migran una corta distancia hacia la capa granular del GD. Allí dan lugar a células granulares dentadas, neuronas de fenotipo principalmente glutamatérgico (Zhao et al., 2008).

Por otro lado, la composición de la ZSV es muy distinta dado el comportamiento migratorio de los neuroblastos hacia el BO. Está compuesta por una capa de células endimarias sobre la cual se adhieren astrocitos, CMNs (tipo B1, son quiescentes, similares a astrocitos y son GFAP⁺), precursores amplificadores en tránsito (también llamados tipo C) y neuroblastos (tipo A, en migración). Los astrocitos forman una red densa que recubre la cadena de neuroblastos durante su proceso de migración al BO (Aimone et al., 2014; Bonfanti and Peretto, 2011; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Las células tipo A y C son las que migran largas distancias por la vía migratoria rostral hasta llegar al BO donde cierran el proceso de maduración a neuronas granulares o periglomerulares (Lledo et al., 2006; Zhao et al., 2008). Es decir que en mamíferos ambas regiones muestran una adaptación a las características anatómicas que las rodean y al comportamiento y destino de las nuevas neuronas que generan.

En el pez cebra la proliferación y la neurogénesis adulta ocurren en la mayor parte de la zona periventricular (ZPV) del SN por lo que se vuelve complejo hablar de la estructura de nichos proliferativos diferencialmente. Estos se distribuyen en todo el eje rostro-caudal del telencéfalo adulto del animal, en el BO, el telencéfalo dorsal y ventral, el hipotálamo, el tectum óptico y el cerebelo, como puede observarse en la Figura 1.2 F (Zupanc and Sîrbulescu, 2011).

Sin embargo, focalizando en las células proliferativas del telencéfalo, se observa que no están homogéneamente distribuidas y poseen distintas velocidades de ciclado. La ZPV del *pallium* posee progenitores de ciclado lento mientras que en el *subpallium* son de ciclado rápido (Adolf et al., 2006). Las primeras, de ciclado lento, muestran diferencias en relación a su distribución rostro-caudal. Mientras en la región rostral del *pallium* la distribución es homogénea, en la región caudal están más bien confinadas a ciertos subdominios. Más específicamente pueden establecerse dos subpoblaciones mitóticas distintas: uniformemente

distribuidas en Dm rostral y caudal, y con mayor densidad en la zona caudal en Dl. (Lindsey et al., 2012).

Si se analiza la estructura específica del nicho telencefálico en la región Dm se observa su extensión lateral a lo largo de la ZPV y consta de sólo una o dos capas de células. En el caso de la región Dl del *pallium* la ZPV se sitúa a lo largo de la región lateral dorsal del telencéfalo, debajo de una capa de células epiteliales. El límite dorsal de Dl es la comisura o surco ipsiloniforme, mientras que su límite lateral sigue el contorno del hemisferio hasta alcanzar la zona de Dp. Por lo general, su ZPV tiene sólo una o dos capas de células de profundidad, similar a Dm. Al estudiar la composición interna de ambas zonas proliferativas se encontraron distintos tipos celulares presentes: tres correspondientes a células proliferativas constitutivas (una de las cuales es considerada glía radial ya que expresa S100 β y glutamina sintetasa -GS-) y el cuarto tipo celular es neuronal y determina el límite del nicho (Lindsey et al., 2012).

Sin embargo, las células de la glia radial también se pueden caracterizar en dos tipos según la expresión de marcadores de proliferación o detectando la incorporación del análogo de timidina, BrdU. El primero está involucrado en el proceso de autorrenovación y se encuentra en estadio de reposo (tipo I, BrdU⁻, PCNA⁻, GFAP⁺, S100 β ⁺, BLBP⁺) y el segundo posee función neurogénica y es el correspondiente a las células de ciclado lento (tipo II, BrdU⁺, PCNA⁺, GFAP⁺, S100⁺, BLBP⁺) (Schmidt et al., 2013; Than-Trong et al., 2020).

En resumen, las dos regiones neurogénicas de roedores y la ZPV del telencéfalo del pez cebra constituyen microambientes neurogénicos propicios para la neurogénesis adulta. De esa manera, el microambiente controla los distintos tipos de progenitores paliales y contribuye a una arquitectura telencefálica muy variada.

1.4 Modulación de la neurogénesis adulta

La incorporación de nuevas neuronas en el individuo adulto genera un cambio sustancial en el número de neuronas preexistentes. En ese contexto es previsible que haya una amplia diversidad de factores moduladores del proceso. ¿Qué sucede entonces con las tasas de neurogénesis adulta cuando animales sociales se exponen a ambientes más complejos o se aíslan de su grupo social? ¿Pueden esos cambios ambientales activar la neuroplasticidad en el telencéfalo?

La actividad neuronal de los circuitos altera la tasa de neurogénesis del telencéfalo adulto, es decir, tiene una alta incidencia en el equilibrio de incorporación y muerte de nuevas neuronas y su velocidad de maduración. En roedores, se observó que el ejercicio voluntario aumenta la actividad de la red solo en la región temporal y acelera el desarrollo neuronal (Piatti et al., 2011). Otros estudios evidencian que factores intrínsecos como el envejecimiento o ciertas enfermedades modulan negativamente la neurogénesis mientras que factores extrínsecos como el enriquecimiento ambiental, aprendizajes o comportamientos

la modulan positivamente (Clelland et al., 2009; Dupret et al., 2008; Van Praag et al., 2000). También se ha observado el proceso inverso, como el bloqueo o la disminución de la neurogénesis (mediante silenciamiento o ablación de neuronas nuevas, entre otros) perjudica las funciones asociadas a la región neurogénica, por ejemplo, disminuyendo la capacidad de respuesta a un protocolo de condicionamiento al miedo o la memoria espacial (Duman et al., 2001; Niibori et al., 2012; Saxe et al., 2006; Seo et al., 2015).

Edad - modulador intrínseco

A medida que el organismo envejece, múltiples características fisiológicas telencefálicas lo hacen (como la transmisión sináptica y la plasticidad, entre otras) y esto contribuye a una disminución o pérdida de habilidades cognitivas.

En roedores, la ZSG del GD (región implicada en la adquisición de memorias y la formación de mapas espaciales) muestra una disminución de la tasa neurogénica con la edad. Esto es consecuencia de la disminución de la proliferación de CMNs, de una menor diferenciación neuronal y una disminución de la supervivencia de las nuevas neuronas (Heine et al., 2004; Kempermann et al., 1998). Estudios electrofisiológicos también muestran una disminución del número de sinápsis excitatorias y la pérdida de la capacidad de generar potenciación a largo término o *long term potentiation* (Burke and Barnes, 2010). Ratones adultos envejecidos de 8 meses de edad, comparados con grupos de 2 y 5 meses, mostraron una disminución del número de células granulares y un desarrollo morfológico más lento en las restantes, con dendritas más cortas y menos ramificadas. En conjunto, esos cambios dan lugar a un decaimiento de las capacidades cognitivas, de la velocidad con la que se procesa la información y de la capacidad de formar nuevas memorias (Lee et al., 2012; Trincherio et al., 2017). Sin embargo, en algunos casos esa pérdida cognitiva natural puede ser modulada mediante el ejercicio físico, que acelera la maduración de las células granulares del GD y, mediante una mejora farmacológica, de la función mitocondrial (Beckervordersandforth et al., 2017; Trincherio et al., 2019b).

El pez cebra, por su parte, también evidencia mecanismos de senescencia. A nivel comportamental se observa una disminución de la actividad motora con la edad así como un deterioro de la capacidad de realizar aprendizajes condicionados (Yu et al., 2006). Fisiológicamente se ha observado que en peces de 20 meses de edad hay una menor producción de neuroblastos en el telencéfalo debido a menor activación de glía radial. Por su parte, la glía de estos peces mostró características morfológicas normales y una densidad equiparable a la de peces jóvenes pero con menor tasa mitótica (Edelmann et al., 2013). Es decir, en peces teleósteos se observa también el deterioro de la neurogénesis adulta con la edad pero es un proceso que continúa siendo explorado.

Enfermedades - modulador intrínseco

El deterioro cognitivo puede venir acompañado con procesos de senescencia pero también existe una multiplicidad de patologías que lo provocan. La epilepsia, los accidentes cerebrovasculares, trastornos neurológicos degenerativos y trastornos neuropsiquiátricos muestran como parte de su sintomatología la alteración de la neurogénesis en el GD del hipocampo. Múltiples estudios han dado evidencia del rol central de este síntoma como agente causal de las enfermedades pero aún queda por dilucidar si el problema es la disminución de la neurogénesis o un exceso de la misma que genera conectividad aberrante (Scharfman and Gray, 2007; Tang et al., 2023; Yun et al., 2016).

Otro tipo de condiciones como el estrés o la depresión también se han relacionado con alteraciones en la neurogénesis adulta. Ambas patologías producen una disminución del número de CMNs mitóticamente activas y de la sobrevivencia de neuronas nuevas, procesos que se revierten mediante el uso de antidepresivos y con la consecuente mejora de los pacientes (Christian et al., 2014; Palumbo et al., 2012). Una posible explicación se encuentra en las propiedades funcionales del hipocampo ya que posee conectividad con distintas regiones del cerebro. Mientras la región dorsal se proyecta a áreas de la corteza (principalmente las implicadas en procesos de aprendizaje, memoria, navegación espacial y exploración) el hipocampo ventral se proyecta al sistema límbico (que incluye a la amígdala, el núcleo accumbens y el hipotálamo) que procesa información emocional (Fanselow and Dong, 2010).

En ratones BALB/c (una cepa albina cosanguínea de ratón) expuestos a estrés crónico leve mostraron una disminución del rendimiento en tareas de campo abierto u *open field* y de laberinto en Y. A su vez, esos resultados fueron acompañados de una reducción en la neurogénesis en el GD que fue posible revertir con tratamiento con acetato de glatiramer (un fármaco que promueve una respuesta neuroprotectora mediada por el sistema inmune y que restablece los niveles de neurogénesis y revierte el deterioro cognitivo producido por el estrés) (Palumbo et al., 2012).

Memoria y aprendizaje - modulador extrínseco

Uno de los principales moduladores neurogénicos es la actividad circuital generada durante procesos de aprendizaje y memoria (Deng et al., 2010). En roedores se ha observado que las memorias dependientes de hipocampo participan en el proceso de incorporación de nuevas neuronas al GD. El aprendizaje por navegación espacial es ejemplo de ello (*Morris water maze*, MWM) ya que altera la incorporación de nuevas neuronas en ventanas temporales específicas del desarrollo, incrementando la sobrevivencia de nuevas neuronas de siete días de edad al momento del aprendizaje. Al mismo tiempo, induce apoptosis de las neuronas que nacieron en etapas más cercanas al aprendizaje (de tres días de edad) (Aasebø et al., 2018; Dupret et al., 2007).

El bulbo olfatorio (BO) no queda exento de este tipo de modulación. La exposición a

un aprendizaje de contexto olfativo incrementa la neurogénesis de la esa región mientras que manipulaciones genéticas que reducen el número de nuevas neuronas del BO producen un decremento de la discriminación olfativa (Lledo et al., 2006).

En peces teleósteos, el rol de los procesos de memoria y aprendizaje en la remodelación del *pallium* aún no se ha explorado completamente. Un trabajo reciente muestra que el aprendizaje espacial promueve la neurogénesis en regiones específicas del telencéfalo del pez cebra. Tanto Dm rostral como Dl caudal participan en el aprendizaje de señales visuales en un laberinto romboidal, y ambas regiones aumentan la proliferación de CMNs y la neurogénesis en respuesta al aprendizaje (Mazzitelli-Fuentes et al., 2022).

Todos estos datos en conjunto dan una idea general de los distintos factores que pueden intervenir en el proceso de neurogénesis adulta sugiriéndola como una respuesta adaptativa a distintos entornos fisiológicos y ambientales y que se conserva evolutivamente.

CAPÍTULO 2

Técnicas experimentales

2.1 Animales

Mantenimiento de *Zebrafish*

En el presente trabajo se utilizaron peces cebra (*Danio rerio*) reproducidos y criados en el Laboratorio de Neurogénesis Adulta del Centro Atómico de Bariloche en un sistema de recirculación (ZS560, Aquaneering, San Diego, CA). Los peces se mantuvieron en peceras de 1.4, 2.8 y 6 lts a una densidad máxima de ocho peces por litro. El agua se mantuvo a temperatura y pH constantes (26 ± 1 °C y $\text{pH} \approx 7.5$). El fotoperiodo del cuarto se fijó en LO 14:10 y se los alimentó tres veces al día, dos con alimento balanceado (*pellets* y escamas, TetraMin) y una con alimento vivo (*Artemia salina*). En todos los experimentos se utilizaron peces de ambos sexos, de entre 8 y 12 meses de edad, con un peso promedio de 400 mg.

Cepas

Se utilizó la línea *wild type* AB (*wtAB*) obtenida en el Acuario IBR (Universidad Nacional del Litoral) y las transgénicas *tg(gad1b:GFP)* y *tg(NeuroD1:GCaMP6f)*, donadas gentilmente por el laboratorio de Claire Wyart. En ambos casos se mantuvo el *background*

genético de las líneas transgénicas con la línea wtAB.

Genotipificación

Se examinó a los peces de las distintas líneas transgénicas para determinar la expresión del transgen. El procedimiento consistió en anestesiarse las larvas por inmersión en una solución de tricaina metasulfonato 0.1 % (MS-222, Sigma-Aldrich) y genotiparlas mediante observación directa, analizando la fluorescencia verde emitida de manera transcraneal por la expresión del transgen en todo el telencéfalo del pez. Se evaluó a diez o siete días post-fertilización en las líneas tg(gad1b:GFP) y tg(NeuroD1:GCaMP6f), respectivamente.

2.2 Eutanasia y disección

Los peces se anestesiaron individualmente por inmersión en una solución de tricaina al 0.2 % durante aproximadamente dos minutos. El cese de la respiración branquial, evidenciado por el movimiento opercular, fue implementado como indicador de la muerte de los peces. Al dejar de opercular se los introdujo en PBS 1x a 0°C y se realizó el corte de la cabeza, justo detrás de las branquias. Luego de tres minutos se procedió a la disección y se colocó el cerebro en solución fría de PFA 4 % (Biopack) durante una noche a 4°C, para la fijación del tejido. Luego de un enjuague de tres minutos en PBS 1x a 4 °C, se deshidrataron durante 72 hs en sacarosa 30 % (con recambio de solución a las 48 hs).

Estudio en telencéfalo completo. Para estudios de telencéfalo completo se omitió el paso de deshidratación en sacarosa y se prosiguió como se describe a continuación. Se realizó un proceso de aclarado rápido del tejido (Hama et al., 2011). Se colocaron los cerebros individualizados en solución A2 (4M urea, 10 % v/v glicerol y 0.1 % tritón) durante 48 hs. Luego se los pasó a solución B4 (8 M urea, 0.1 % v/v tritón) durante 48 hs para luego volver a colocarlos en solución A2 por otras 48 hs. Todo el procedimiento se realizó a 4 °C y una vez finalizado el mismo se procedió con la tinción inmunohistoquímica correspondiente.

Estudio en cortes coronales. Para cortes coronales se prosiguió extrayendo toda la sacarosa que rodea el telencéfalo con papel absorbente. Se sumergió el tejido en medio de montaje (Scigen Tissue-Plus™ O.C.T. Compound) y se lo congeló en nitrógeno líquido. El tejido se almacenó a -20 °C hasta el momento de corte. Se realizaron cortes coronales de telencéfalo de 20 μ m de espesor en crióstato (Microm, HM 550) a -20 °C y los mismos se colocaron sobre portaobjetos cargados (Fisher Scientific). Los vidrios se mantuvieron a 20 °C hasta el momento de la tinción inmunohistoquímica.

2.3 Marcado de células en proliferación: EdU

Los progenitores en proliferación, tanto de la línea wtAB como de las líneas transgénicas, fueron marcados mediante administración de una única dosis de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), un análogo de timidina. Con este propósito, los peces fueron anestesiados con 0.2 % MS-222 e inmediatamente inyectados intraperitonealmente (aguja 25G) con 40 μ l de solución 10 mM de EdU (Abcam, ab146186) en PBS 1X. Se los mantuvo en peceras de recuperación y se les realizó al menos dos recambios de agua en las siguientes 48 hs, previo a reingresar al sistema de recirculación. Los peces, una vez marcados, fueron separados de su camada y mantenidos en las condiciones experimentales correspondientes a cada experimento.

2.4 Marcaciones histológicas

Luego del proceso de aclarado en cerebros enteros o montaje en vidrios cargados de cortes coronales se procedió con la tinción inmunohistoquímica.

Inmunofluorescencia

Después de tres pasos de hidratación o lavados de 5 min en TBS 1X se incubó el tejido en cloruro de amonio 100 mM durante 20 min. Se realizaron tres pasos de enjuague de 5 min en TBS 1X Tritón 0.3 % x-100 y se dejó los cerebros durante 1 hora en solución de bloqueo (6 % NGS, 6 % BSA, 0.3 % Tritón x-100). Todos los pasos previos fueron realizados a temperatura ambiente y con agitación constante. Por último, se incubó toda la noche (para el caso de cortes coronales) o durante 72 hs (en el caso de cerebro entero) con el anticuerpo primario a 4 °C (en caso de realizar varias marcaciones simultáneas se colocaron en la misma solución los distintos anticuerpos). En la Tabla 2.1 puede observarse el detalle de anticuerpos primarios utilizados.

PCNA. Para revelar el antígeno nuclear de células en proliferación fue necesario un paso extra de recuperación de antígeno. El paso intermedio se realizó previo a la inmersión en solución de bloqueo. Consistió en incubar el tejido durante 30 min en HCl 2N a 37 °C y luego durante 10 min en buffer borato a temperatura ambiente y con agitación constante. Por último se realizaron tres pasos de lavado de 5 min en TBS 1X Tritón 0.3 % x-100 y se prosiguió con el bloqueo y la incubación en anticuerpo primario.

Terminada la primera incubación con anticuerpo se realizaron tres lavados de 5 min en TBS 1X Tritón 0.3 % x-100 y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (ver tabla 2.2) durante 2 hs (para cortes coronales) o toda la noche (para cerebro entero) a temperatura ambiente o 4 °C, respectivamente. En caso de haber realizado varias marcaciones simultáneas de anticuerpo primario se colocaron en la misma solución los distintos anti-

cuerpos secundarios. En la Tabla 2.2 puede observarse el detalle de anticuerpos secundarios utilizados.

Revelado por colocalización con EdU. En el caso de revelado por colocalización con EdU se agregan, previo al montaje y posterior a la marcación con anticuerpos secundarios los pasos correspondientes a su tinción (ver a continuación la reacción de Click, Sección 2.4). Por último se realizaron tres pasos de lavado en TBS 1X y se realiza el montaje.

Antígeno	Especie	Isotipo	Dilución	Fuente	Referencia
gad65/67	rabbit	IgG	1:100	Abcam	ab11070
GFP	rabbit	IgG	1:2500	Molecular Probes	A-11122
GFP	chicken	IgY	1:500	Aveslabs	AB_2307313
HuC/D	rabbit	IgG	1:500	Abcam	ab210554
NeuroD1	mouse	IgG2a	1:1000	Abcam	ab60704
PCNA	mouse	IgG2a	1:300	Santa Cruz	PC10

Cuadro 2.1: Anticuerpos primarios implementados.

Antígeno	Especie	Isotipo	Conjugado	Dilución	Fuente	Referencia
Mouse	Goat	IgG	Alexa 488	1:500	Abcam	ab150117
Chicken	Donkey	IgG	Alexa 488	1:500	Jackson	703-545-155
Mouse	Goat	IgG	Alexa 594	1:500	Abcam	ab150120
Rabbit	Goat	IgG	Alexa 594	1:500	Abcam	ab150084
Rabbit	Goat	IgG	Alexa 647	1:500	Abcam	ab150083

Cuadro 2.2: Anticuerpos secundarios implementados.

Revelado de EdU por reacción de click

Se utilizó hidroxycumarina o Sulfo-Cy3 (en el Apéndice A.1 se detalla el mecanismo de reacción) para el revelado de células que incorporaron EdU. El procedimiento se realizó luego del lavado de anticuerpos secundarios y previo al montaje. En la Tabla 2.3 puede observarse el detalle de los productos utilizados.

Producto	Concentración	Fuente	Referencia
Sulfo-Cy3	2-5 μ M	Abcam	ab146483
Hidroxycoumarina	50 μ M	Carbosynth	FA31762

Cuadro 2.3: Soluciones de revelado de EdU por reacción de click.

Revelado con Sulfo-Cy3

Se incubó durante 45 min (cortes coronales) o 3 hs (cerebro entero) en solución con sulfo-Cy3 (100 mM TBS pH 7.6, 100 mM L-ascorbic acid, 4 mM CuSO₄). Luego se realizaron 3 pasos de enjuague de 5 min en TBS 1X y se procedió con el montaje.

Revelado con hidroxycumarina

Se incubó durante 60 min (cortes coronales) o 3 hs (cerebro entero) en solución con hidroxycumarina (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM L-ascorbic acid, 2 mM CuSO₄). Luego se procedió con el montaje, sin enjuagar (Li et al., 2010).

Marcado de núcleos con DAPI

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente (UV) que se une a secuencias ricas en adenina y timina del ADN permitiendo el marcado de núcleos. Esta tinción se realizó al final de todas las marcaciones histológicas, es decir, después de las marcaciones inmunohistoquímicas o del revelado y previamente al montaje. Se colocó una solución de DAPI (1:10.000) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante y luego se realizaron 3 pasos de enjuague de 5 min en TBS 1X antes de proceder con el montaje.

Montaje

El montaje se realizó según el objetivo de estudio. Para montaje de cortes coronales, se realizó un lavado por arrastre con TBS 1X, se eliminó el excedente de líquido (sin dejar que el tejido se seque) y luego se montó con medio de montaje de fluorescencia (Abcam, ab104135). Para montaje de cerebro entero, se fijó el cerebro sobre un cubreobjeto de manera que la región dorsal del telencéfalo quede sobre la superficie del mismo. El tejido se inmovilizó mediante inmersión en agarosa 1X de bajo punto de fusión (Sigma-ALdrich, A4018) y se cubrió con otro cubreobjeto. En ambos casos se conservó el tejido inmunomarcado a 4 °C hasta el momento de su análisis en microscopio.

2.5 Adquisición de imágenes

La adquisición de imágenes se realizó en diversos equipos según el objetivo de análisis cuanti o cualitativo.

- *Microscopio de epifluorescencia*. Para la selección de secciones rostro caudales y la genotipificación de larvas se implementó el microscopio de epifluorescencia Nikon (Eclipse e800) equipado con cámara CCD (Leica DC350).
- *Microscopio de 2 fotones*. Para detectar señal de colocalización de dos marcadores en cortes coronales de telencéfalo se implementó el microscopio de dos fotones *Sistema Láser Spectra Physics Spitfire + MaiTai* (construido ad-hoc), perteneciente al Laboratorio de Fotónica y Optoelectrónica del Centro Atómico de Bariloche, CNEA. El mismo utiliza un láser Ti-Safiro a 780 nm con un pulso de 100 fs, y una intensidad de 10 mW sobre la muestra. La emisión de los fluoróforos se detectó en forma simultánea por dos tubos fotomultiplicadores, cada uno con los filtros de emisión respectivos (GFP, dsRed). Se utilizó un objetivo 40x - 1.0 NA Olympus de inmersión en agua. Las cuantificaciones se realizaron a partir de reconstrucciones 3D obtenidas del procesamiento de imágenes de distintos planos en el eje z obtenidos para cada región de interés.
- *Microscopio confocal*. Para el estudio de colocalización de más de dos marcadores o para cerebro entero se utilizó el microscopio confocal *Zeiss LSM 880 con Airyscan*, perteneciente al Departamento de Física Médica del Centro Atómico de Bariloche, CNEA. Se utilizaron objetivos de 10x - NA: 0.45 (de aire) y de 63x - NA: 1.4 (de inmersión en aceite). Las cuantificaciones se realizaron a partir de reconstrucciones 3D obtenidas del procesamiento *Airyscan* de imágenes de distintos planos en el eje z obtenidos para cada región de interés.

2.6 Análisis de imágenes

Todas las figuras fueron reconstruidas utilizando el software GIMP (*GNU Image Manipulation Program*, v2.10.12), y el análisis cuantitativo fue realizado con el software FIJI (*ImageJ*, v1.53). A continuación se detalla como se realizó la demarcación de núcleos neuroanatómicos del *pallium*.

Selección de regiones y subregiones en cortes coronales

Para realizar las cuantificaciones rostro-caudales en cortes coronales se prosiguió de la siguiente manera. Se seleccionaron tres regiones del telencéfalo: rostral, medial y caudal. La selección se realizó utilizando el atlas topológico “*Neuroanatomy of the Zebrafish Brain*” (Wullimann et al., 1996) como referencia, y seleccionando las secciones que allí figuran como 71 (rostral), 92 (medial) y 114 (caudal). Para delimitar las subdivisiones del *pallium* se utilizó como referencia el estudio “*Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis*” (Ganz et al., 2014). Se consideraron para el análisis únicamente las subregiones dorso-medial, llamada Dm a lo largo del trabajo, y dorso-lateral, referida

como Dl, debido a sus homologías con amígdala basolateral e hipocampo de mamíferos. Para cada una de las subregiones Dm y Dl se fotografiaron 10 planos en profundidad con objetivo de 40x a una distancia en el eje z de 1 μm entre planos.

Selección de subregiones en cerebro entero

Para delimitar las subdivisiones a partir de la vista superior de la región dorsal del *pallium* del telencéfalo entero se utilizó como referencia el estudio “*Conserved and Divergent Features of Adult Neurogenesis in Zebrafish*” (Labusch et al., 2020). Se consideró la región Dm exactamente como se cita en el trabajo y Dl como la combinación de Da y Dl, considerando el surco como límite divisorio entre ambas. Para cada telencéfalo se tomaron aproximadamente 60 planos de profundidad a una distancia en el eje z de 3 μm entre planos.

En ambos tipos de análisis (cortes coronales o cerebro entero) la delimitación de las subregiones Dm y Dl y la cuantificación de sus respectivas áreas se hicieron sobre una proyección ortogonal de todos los planos en z . Las cuantificaciones, en cambio, se realizaron en un *stack* de fotos para uno o dos canales, según objetivo experimental.

2.7 Electrofisiología

Obtención de tejido *ex vivo* para electrofisiología

Los peces fueron anestesiados en tricáína 0.2 % tras lo cual se sacrificaron y se realizó rápidamente la disección del telencéfalo en solución de disección fría (en mM): 2.5 KCl, 2.0 NaH_2PO_4 , 25.0 NaHCO_3 , 0.5 CaCl_2 , 7.0 MgCl_2 , 20.0 glucosa, 1.3 ascorbato de Na^+ , 3.1 piruvato de Na^+ , 110.0 cloruro de colina. Se introdujo el tejido en agarosa 4 % y se lo mantuvo en inmersión con solución ACSF fría (líquido cefalorraquídeo artificial, composición en mM: 125.0 NaCl, 2.5 KCl; 1.3 MgCl_2 ; 25.0 NaHCO_3 ; 2.3 NaH_2PO_4 ; 2.0 CaCl_2 ; 10.0 glucosa; 1.3 Ascorbato Na^+ , 1.3 piruvato de Na^+ ; ≈ 315 mOsm; pH = 7.3-7.4). Se realizaron cortes coronales de rodajas de ≈ 300 μm de espesor utilizando un vibrátomo (Leica VT 1200). Las rodajas fueron removidas y transferidas a una cámara con solución ACSF fría carbogenada (95 % O_2 / 5 % CO_2) donde se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos una hora previo al comienzo de las mediciones.

Registros electrofisiológicos

Los registros se realizaron con un sistema de adquisición electrofisiológica de dos canales *double-IPA* (Sutter Instruments) bajo un microscopio motorizado (SOM, Sutter Instruments,

Co.) que se encuentra montado sobre una mesa antivibratoria (TMC). Se encuentra equipado con diversos objetivos, cámara sCMOS (Scientific CMOS, Quantalux, Thor Labs Inc.), una fuente de luz LED de alta intensidad (Lambda HPX-L5, Sutter Instruments, Inc.) y un set de filtros para GFP (MDF-GFP, ThorLabs, Inc.). La adquisición de imágenes y la administración del estímulo fueron sincronizados con el software SutterPatch 2.1.1 (Sutter Instruments, Co.) y adquiridos con el software ThorCam 3.2.0 (ThorLabs, Inc.).

Se preparó la rodaja telencefálica de interés sobre la cámara de registro (región medial) y se ubicó la zona de interés con un objetivo 2.5x - NA: 0.075 (Plan NeoFLUAR, Zeiss). Para registros en *whole cell* se utilizaron pipetas de 4-5 Mohm conteniendo solución interna, cuya composición en mM es: gluconato de K 120.0, KCl 20.0, NaCl 5.0, MgCl₂ 4.0, EGTA 0.1, Hepes 10.0, Tris-ATP 4.0, Tris-GTP 0.3, fosfocreatina 10.0 (pH 7.3, 290 mOsm).

Se realizó un muestreo poblacional de neuronas en Dm y se compararon los perfiles neuronales glutamatérgicos y GABAérgicos mediante la utilización de los peces transgénicos tg(gad1b:GFP) y tg(NeuroD1:GCaMP6f), respectivamente. Se registraron las siguientes propiedades intrínsecas de las neuronas en configuración *whole-cell*: Resistencia de membrana (*Voltage clamp*), capacitancia (*Voltage clamp*), umbral de disparo, forma y frecuencia de disparo de potenciales de acción (*Current clamp*), y corrientes voltaje-dependientes (*Voltage clamp*). Las mediciones se realizaron según lo publicado en trabajos previos (Krzisch et al., 2015; Marín-Burgin et al., 2012; Mongiat et al., 2009; Piatti et al., 2011; Temprana et al., 2015).

Análisis de datos

Para el análisis de los datos electrofisiológicos se utilizaron los programas pClamp 11.2.2 y Sutter patch (IgorPro 8.04).

Propiedades pasivas y espontáneas de la membrana

La capacitancia y la resistencia de acceso a la membrana (C_m , R_m) se obtuvieron a partir de trazos de corrientes evocadas por un pulso hiperpolarizante de -10mV. El potencial de membrana (V_m) se midió instantáneamente al abrir el sello. Luego, para los registros de *current clamp* se mantuvo el potencial de membrana en reposo cercano a los -70 mV.

Las corrientes dependientes de voltaje de Na⁺ (I_{Na}) y K⁺ (I_K) se midieron aplicando pulsos despolarizantes cada 10 mV y se detectó automáticamente el pico rápido hacia adentro y la meseta hacia afuera tardía. Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) se registraron en el potencial de reversión establecido para las corrientes GABAérgicas (-70mV, en función de las concentraciones de Cl⁻ intra y extracelulares). La amplitud y las frecuencias de eventos se analizaron directamente con el programa Sutter patch v2.1

Propiedades del PA

El disparo de potenciales de acción se evaluó en la configuración de *current-clamp* tras la inyección de pulsos cuadrados de corriente despolarizante de 5 o 10 pA cada 500 ms para

llevar el potencial de membrana desde el reposo hasta 0 mV. El umbral del potencial de acción (PA_{umb}) se definió como el punto en el que la derivada del potencial de membrana dV/dt se desvió del valor medio de referencia en más de 2 desviaciones estándar, y se calculó utilizando rutinas desarrolladas en nuestro laboratorio. De la derivada del potencial también se sustrajo el dato de *after hyperpolarization* (AHP), calculado como el potencial al cual la dV/dt retorna a valor 0 mV, y la duración del PA (APD) se definió como el 50 % de la duración total.

2.8 Análisis estadístico

Todos los datos de la presente tesis fueron graficados y analizados estadísticamente utilizando los programas *GraphPad Prism8*, *OriginPro8* y *Rstudio*. La normalidad de las muestras fue analizada con el test de Shapiro-Wilk, y la igualdad de las varianzas con el test de Levene. Todos los tests estadísticos tuvieron un intervalo de confianza del 95 % en los dos extremos la distribución de los datos. Las diferencias significativas fueron evaluadas, según se indica en cada caso, con las siguientes pruebas paramétricas y no paramétricas: ANOVA de un factor, con comparaciones múltiples de Dunn's (un factor, datos pareados); ANOVA de 2 factores, con comparaciones múltiples de Dunn's (dos factores, datos pareados); test de Friedman, con comparaciones múltiples de Dunn's (un factor, datos pareados); test de Kolmogorov-Smirnov con corrección por comparaciones múltiples de Bonferroni (bondad de ajuste de dos distribuciones); test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn's (un factor, más de dos niveles); prueba Z de dos muestras con comparaciones múltiples de Bonferroni (diferencias de porcentajes); test Mann Whitney (un factor, dos niveles, datos no pareados); prueba Z de Kolmogorov-smirnov (comparación de dos distribuciones).

Coeficientes de variación - Ajuste de curvas

Para determinar la magnitud de variación del número de células con el tiempo se realizó el ajuste de los datos a una curva exponencial de tipo $Y = a + b * e^{(c*x)}$ y una regresión no lineal, ambos con el programa *Mathematica*. El análisis solo se realizó para los datos que dieron una disminución significativa en la caracterización de la neurogénesis.

CAPÍTULO 3

Neurogénesis en el *pallium* del pez cebra adulto

Hipótesis y objetivo general

Durante el desarrollo temprano en el *pallium* se albergan CMNs que dan lugar a las neuronas glutamatérgicas y en el *subpallium* se generan las interneuronas GABAérgicas. Sin embargo, aun no se ha determinado si durante la neurogénesis adulta la adición de nuevas neuronas en núcleos del *pallium* está restringida a un determinado tipo neuronal o si, por el contrario, se generan diferentes tipos neuronales, como por ejemplo neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas. Por lo expuesto anteriormente, se propone la primer hipótesis de esta Tesis:

En el *pallium* del pez cebra adulto se incorporan tanto neuronas glutamatérgicas como GABAérgicas mediante el proceso de neurogénesis adulta.

El objetivo general es estudiar la progresión temporal del desarrollo de neuronas nuevas a partir de una cohorte de CMNs marcadas. Para ello se evaluará la tasa de supervivencia e integración de los progenitores y, mediante un seguimiento temporal, se determinará la proporción de neuronas GABAérgicas (inhibitorias) y glutamatérgicas (excitatorias) que se incorporan en el *pallium* de peces adultos.

Estrategia experimental

Para estudiar el destino de las CMNs en el *pallium* del telencéfalo del pez cebra se utilizaron peces adultos de 9 meses de edad de las líneas *wtAB* y *tg(gad1b:GFP)*. Con los peces *wtAB* se evaluó características intrínsecas del proceso de diferenciación neuronal (como el gradiente de distribución, el posicionamiento laminar, el decaimiento temporal, la autorrenovación) así como también la neurogénesis glutamatérgica. Los peces *tg(gad1b:GFP)*, en cambio, se utilizaron únicamente para el estudio de la neurogénesis GABAérgica.

Mediante una inyección de EdU (análogo de timidina) se marcaron CMNs proliferantes a tiempo cero, luego de lo cual los peces se mantuvieron en condiciones de cría hasta el momento de su sacrificio (ver Capítulo 2 - Sección 2.3) (Chehrehasa et al., 2009). Se tomaron muestras a 4, 8, 16, 32 y 64 días post-inyección (dpi) y para cada punto temporal se identificó la progenie de la cohorte marcada mediante reacción de *click* (ver Apéndice A.1). El proceso de diferenciación se estudió mediante detección de marcadores de desarrollo con el uso de técnicas de inmunofluorescencia. Puede observarse un diagrama del experimento en la Figura 3.1.

Se estudió el proceso de neurogénesis sólo en las subdivisiones Dm y Dl del *pallium* debido a su homología con la amígdala basolateral y el hipocampo de mamíferos, respectivamente. Dado que ambas regiones telencefálicas cambian en dimensión y funcionalidad a lo largo del eje rostro-caudal se estudiaron tres cortes coronales del telencéfalo: rostral (R), medial (M) y caudal (C), correspondientes a los cortes 71, 92 y 114 del atlas topológico del cerebro del pez cebra (Wulliman et al., 2012). En la Figura 3.1 B pueden observarse los diagramas correspondientes a las regiones estudiadas.

3.1 Resultados

En base a lo expuesto en el Capítulo 1 o Introducción, el trabajo se centró en dos regiones específicas del *pallium* del pez cebra, la región Dm y la Dl. Ambas poseen contacto dorsal directo con el ventrículo y se corresponden con nichos neurogénicos cuya actividad perdura durante toda la vida de los individuos. Es por ello que a continuación, y a lo largo de todo el trabajo, se mostrarán los resultados diferenciando entre ambas regiones paliales.

Al hablar de la cohorte marcada de CMNs se hará referencia a distintos subgrupos de células. La marca de EdU contiene células en distintos estadios de diferenciación: una parte puede corresponderse a células en proliferación pero también puede contener neuroblastos o neuronas ya diferenciadas cuya proporción puede variar con el tiempo. Al observar la colocalización de EdU con otros marcadores se estará haciendo referencia a algunas de esas subpoblaciones pero en todos los casos se especificará a que subtipo celular se hace referencia.

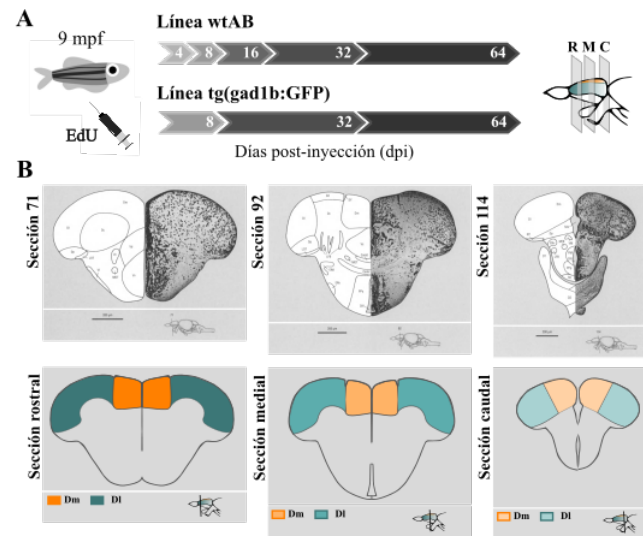


Figura 3.1: **Diagrama general del experimento de caracterización de la neurogénesis** (A) Panel izquierdo: Diseño experimental. Se marcó células progenitoras de individuos de 9 meses de edad mediante inyección de EdU. Los peces fueron sacrificados a distintos tiempos: 4, 8, 16, 32 y 64 dpi en la línea *wtAB* y 8, 32 y 64 dpi en la línea *tg(gad1b:GFP)*. Panel derecho: vista esquemática sagital del cerebro del pez cebra indicando la posición de los cortes coronales estudiados. (B) Esquema de las regiones rostro-caudales del telencéfalo del pez cebra según el Atlas (panel superior, modificado de Wulliman et al. (2012)) y según el presente trabajo (panel inferior). mpf: meses post fertilización, Dm: dorso-medial, Dl: dorso-lateral, R: rostral, M: medial, C:caudal.

3.1.1 Dinámica espacio-temporal de CMNs marcadas

Gradiente de distribución rostro-caudal

Estudios recientes han reportado una alta complejidad neuroanatómica de los nichos neurogénicos del *pallium* adulto. Estudios previos estudiaron las CMNs activas mediante el marcado de células en proliferación con BrdU y observaron que el *pallium* tenía nichos de mayor abundancia proliferativa en las regiones Dm y Dl. También reportaron diferencias rostro-caudales y de densidad de CMNs activadas (Lindsey et al., 2012; von Krogh et al., 2010). Otro estudio de secuenciación de célula única reportó diferencias rostro-caudales entre los distintos dominios neurogénicos del *pallium* (como Dm y Dl). Observaron que en Dm hay una alta densidad de CMNs en la región rostral, con una frecuencia de activación variable (baja en región rostral, alta en la caudal). En cambio, en el dominio Dl observaron una baja densidad de CMNs (en comparación a Dm) pero con una frecuencia intermedia de activación (Dray et al., 2015).

En ese contexto, se propone estudiar la distribución de las células marcadas con EdU bajo la siguiente hipótesis de trabajo:

Las células madre neuronales localizadas en la zona periventricular del *pallium* poseen una distribución rostro-caudal que difiere según la subregión palial en estudio.

Con el objetivo de detectar dicha distribución se estudió la posición en el eje antero-posterior de las células EdU⁺. Se comparó el número de células marcadas en las regiones R, M y C, tanto para la región Dm como Dl en cada punto temporal. En la Figura 3.2 B se puede observar imágenes representativas de la marca de EdU a 4 y 64 dpi de ambas regiones.

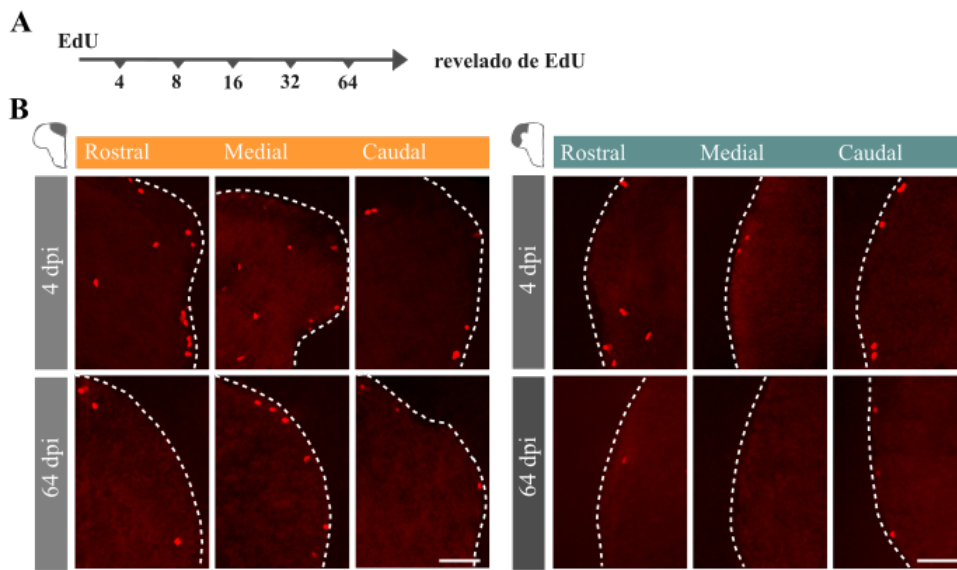


Figura 3.2: Cohorte de células marcadas con EdU. (A) Diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y tratamiento del tejido. (B) Imágenes representativas de cortes coronales rostro-caudales a 4 y 64 dpi de la región Dm (panel izquierdo, naranja) y Dl (panel derecho, azul). Los tejidos fueron tratados con reacción de *click* para revelado de EdU (ver Capítulo 2, Sección 2.4). Línea punteada: borde del tejido. Barra de escala, 40 μm .

A 4dpi se observó un gradiente en el número de células EdU⁺ tanto para Dm como para Dl, como se puede ver en la Figura 3.2 B, panel superior. La región Dm mostró un mayor número de células marcadas en la zona rostral, con una disminución del 60.5 % conforme se avanza hacia la zona caudal (EdU⁺/mm², media $\pm$ SEM: Rostral 248.33 ± 29.21 , Caudal 98.23 ± 14.06 ; $n_{4\text{dpi}} = 8$). Estos resultados se pueden observar en la Figura 3.3 A, panel naranja. En cambio, para la región Dl se vio la distribución opuesta, la zona rostral tiene menor cantidad de células y aumenta un 57 % al comparar con la región caudal (EdU⁺/mm², media $\pm$ SEM: Rostral: 92.62 ± 10.61 , Caudal: 145.7 ± 21.07 ; $n_{4\text{dpi}} = 8$), resultados que también pueden observarse en la Figura 3.3 A, panel azul.

En resumen, se pudo corroborar la existencia de una distribución heterogénea de CMNs en los nichos neurogénicos de interés al igual que lo observado previamente por Lindsey et al. (2012) y von Krogh et al. (2010). Se encontraron dos grandes subpoblaciones de células marcadas, una en Dm y otra en Dl, que presentaron diferencias de distribución espacial.

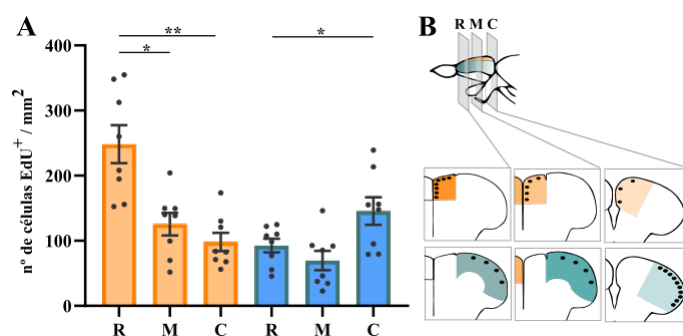


Figura 3.3: **Distribución espacial de células EdU⁺ a 4dpi.** (A) n° de células EdU⁺/mm² a lo largo del eje rostro-caudal en la región Dm (naranja) y Dl (azul) del *pallium*. Test de Friedman, comparaciones múltiples de Dun's, Dm: $F=12.25$, $p_{v-RvsM}=0.012$, $p_{v-RvsC}=0.002$. Dl: $F=9.75$, $p_{v-RvsC}=0.049$. $n_{4dpi}=8$ * $p<0.05$ ** $p<0.01$. (B) Modelo propuesto. Cortes coronales rostro-caudales con distinta distribución de células marcadas para las regiones Dm y Dl. R: rostral, M: medial, C: caudal.

Dm posee una alta densidad de CMNs activas en el área rostral y Dl en la zona caudal. Todos los puntos temporales presentaron la misma tendencia pero sólo se presentó 4dpi por ser el punto temporal más cercano al momento de marcación y, por ende, con mayor cantidad de marca. Los resultados de 8, 16, 32 y 64 dpi pueden observarse en el ApéndiceA.2.

Posicionamiento laminar

En etapas tempranas del desarrollo del *pallium* del telencéfalo las CMNs que lo originan provienen de dos nichos distintos. Por un lado, la región Dm se origina a partir de una gran población de progenitores *her4*⁺ ubicada en la pared ventricular posterior del telencéfalo mediante una baja amplificación local de los progenitores. Por otro lado, la región Dl se forma por adición gradual de células en la pared lateral, proceso que comienza en etapas post-embrionarias a 5 días post fertilización o (dpf) por una amplificación masiva en el eje anteroposterior y mediolateral de las CMNs. Ambos casos muestran incorporación radial de las células, desde la zona ventricular y con dirección al *subpallium* (Dirian et al., 2014).

En estadios posteriores de crecimiento una parte de esos progenitores conservan su condición indiferenciada y son responsables del fenómeno de neurogénesis adulta. Dado que ambos subtipos de progenitores están restringidos espacialmente, es probable que su comportamiento difiera también en la adultez y es otro de los motivos por los cuales se evalúan ambas regiones por separado en el presente trabajo.

En este contexto, se propone evaluar la posición de las células EdU⁺ en función del tiempo, bajo la siguiente hipótesis de trabajo:

En la adultez, la progenie de CMNs se va incorporando al *pallium* de manera laminada y centrípeta, quedando las neuronas nuevas o inmaduras cercanas a la ZPV y las maduras direccionadas hacia el centro del parénquima.

Con ese objetivo se midieron las distancias radiales de las células EdU⁺ hacia la ZPV (como se explica gráficamente en el Apéndice A.3). La dirección de la medición de distancia fue hacia la línea inferior lateral que subdivide el *pallium* del *subpallium* y se corresponde con la dirección que toman los progenitores de la glía radial del *pallium* en el desarrollo temprano, como se mencionó anteriormente.

Los resultados indican que para ambas regiones paliales, Dm y Dl, las células EdU⁺ se distribuyeron entre la ZPV y aproximadamente los 80 μm de profundidad en un periodo de dos meses luego de la marcación. En Dm rostral las células EdU⁺ de 64 dpi se ubicaron a una distancia de hasta 70 μm de la ZPV, con una media de 28 μm respecto de 6 μm a 4dpi (distancia (μm), media $\pm$ SEM: 4dpi 6.66 ± 0.73 , $n_{4\text{dpi}} = 81$; 32dpi 14.49 ± 1.52 , $n_{32\text{dpi}} = 36$; 64dpi 27.87 ± 2.82 , $n_{64\text{dpi}} = 42$). En Dm medial las células alcanzaron un máximo de 29 μm a 64dpi, con una media de 8 μm respecto a la media de 4 μm a 4 dpi (distancia (μm), media $\pm$ SEM: 4dpi 4.03 ± 0.33 , $n_{4\text{dpi}} = 63$; 32 dpi 11.06 ± 2.41 , $n_{32\text{dpi}} = 23$; 64dpi 8.34 ± 1.06 , $n_{64\text{dpi}} = 8$). Estos resultados pueden observarse en la Figura 3.4 A,B.

Para el caso de la región Dl, se observó un comportamiento similar pero en todo el eje rostro-caudal. En Dl rostral a 64 dpi las células alcanzaron una distancia máxima de 54 μm de la ZPV, con una media 15 μm respecto de 7 μm a 4dpi (distancia (μm), media $\pm$ SEM: 4dpi 7.39 ± 0.86 , $n_{4\text{dpi}} = 65$; 32dpi 17.71 ± 2.42 , $n_{32\text{dpi}} = 27$). En Dl medial las células se desplazaron un máximo de 59 μm a 64dpi, con una media de 15 μm respecto a los 10 μm a 4 dpi (distancia (μm), media $\pm$ SEM: 4dpi 10.42 ± 2.4 , $n_{4\text{dpi}} = 46$, 64dpi 15.28 ± 2.4 , $n_{64\text{dpi}} = 35$). En la región caudal de Dl el desplazamiento fue de 55 μm máximos a 64 dpi, con una media de 13 μm respecto de 6 μm a 4dpi (distancia (μm), media $\pm$ SEM: 4dpi 6.31 ± 0.64 , $n_{4\text{dpi}} = 116$, 64dpi 13.07 ± 1.24 , $n_{64\text{dpi}} = 61$). Estos resultados pueden observarse en la Figura 3.4 C,D.

Estos resultados van en línea con la hipótesis de adición laminar de nuevas neuronas en el contorno exterior del *pallium*, similar a lo que sucede también en otras regiones como la retina (Marcus et al., 1999). Es decir, se observa que a mayor tiempo respecto del momento de marcado aumenta la distancia media de la ZPV, tanto para Dm como para Dl. Por otra parte, en la Figura 3.4 se puede observar una distribución variable de las células en todas las regiones y puntos temporales, esto podría deberse a que la cohorte marcada no se diferencia de manera uniforme sino que esta compuesta por células en distintas fases de diferenciación.

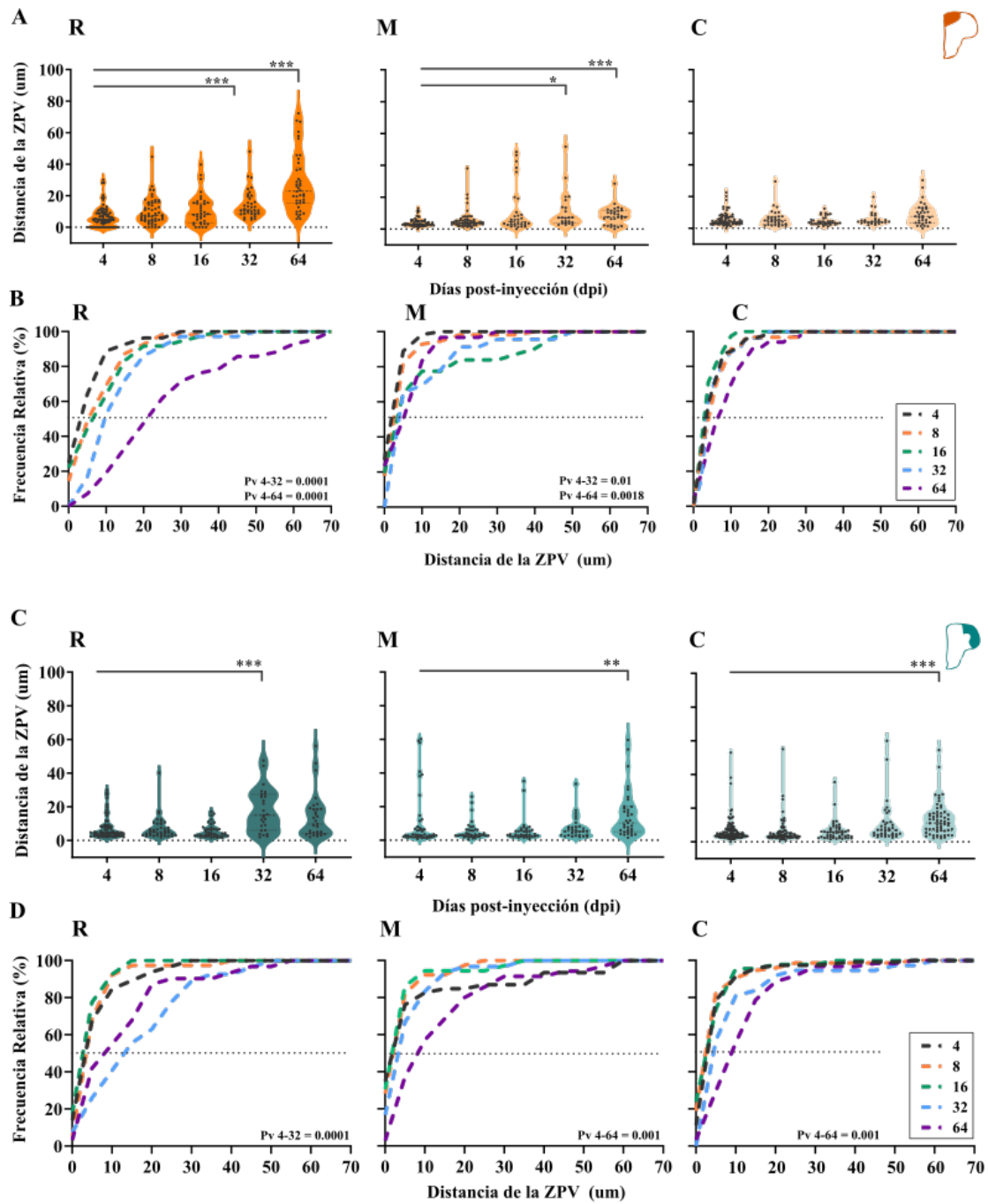


Figura 3.4: Posición de la cohorte de células EdU^+ en las subdivisiones paliales Dm y Dl en secciones coronales del *pallium*. (A,C) Distancia de la célula a la ZPV (μm) en función del tiempo. (B,D) Frecuencia relativa acumulada en función de la distancia a la ZPV. Test de Kolmogorov-Smirnov con corrección por comparaciones múltiples de Bonferroni, comparaciones: 4dpi vs 8/16/32/64 dpi. Dm-R: $\text{Test}_{4\text{vs}32}=0.50$; $\text{Test}_{4\text{vs}64}=0.70$; $n_{4\text{dpi}}=81$; $n_{8\text{dpi}}=55$; $n_{16\text{dpi}}=36$; $n_{32\text{dpi}}=36$; $n_{64\text{dpi}}=42$. Dm-M: $\text{Test}_{4\text{vs}32}=0.46$; $\text{Test}_{4\text{vs}64}=0.61$; $n_{4\text{dpi}}=63$; $n_{8\text{dpi}}=56$; $n_{16\text{dpi}}=31$; $n_{32\text{dpi}}=23$; $n_{64\text{dpi}}=30$. Dm-C: $n_{4\text{dpi}}=71$; $n_{8\text{dpi}}=30$; $n_{16\text{dpi}}=38$; $n_{32\text{dpi}}=27$; $n_{64\text{dpi}}=33$. Dl-R: $\text{Test}_{4\text{vs}32}=0.51$; $n_{4\text{dpi}}=64$; $n_{8\text{dpi}}=38$; $n_{16\text{dpi}}=40$; $n_{32\text{dpi}}=27$; $n_{64\text{dpi}}=31$. Dl-M: $\text{Test}_{4\text{vs}64}=0.49$; $n_{4\text{dpi}}=46$; $n_{8\text{dpi}}=39$; $n_{16\text{dpi}}=36$; $n_{32\text{dpi}}=30$; $n_{64\text{dpi}}=35$. Dl-C: $\text{Test}_{4\text{vs}64}=0.50$; $n_{4\text{dpi}}=116$; $n_{8\text{dpi}}=74$; $n_{16\text{dpi}}=46$; $n_{32\text{dpi}}=37$; $n_{64\text{dpi}}=61$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$. R: rostral, M: medial, C: caudal.

Decaimiento temporal de la cohorte

Es sabido que la adición de nuevas neuronas en el hipocampo de roedores es un proceso que continúa incluso en la adultez. Las nuevas neuronas adultas pasan por distintas etapas de desarrollo fisiológico y morfológico hasta llegar a una integración funcional completa (Espósito et al., 2005). Durante su desarrollo, muchas células mueren ya que su sobrevivencia está directamente relacionada con la regulación que ejercen los factores externos sobre el circuito.

La actividad neuronal asociada a un aprendizaje espacial o a ambientes enriquecidos son factores que modulan la integración neuronal. Las CGDs del hipocampo de roedores de dos semanas de edad se integran al circuito y maduran más rápidamente si el animal es expuesto a ambiente enriquecido, pero sólo en ese estadio del desarrollo, ni antes ni después (Trinchero et al., 2019a). Por otro lado, se observó que en ratones envejecidos la actividad física aumenta la neurogénesis. En ese caso, el proceso implicado es la dendritogénesis, la actividad física aumenta la longitud de las dendritas y el número de espinas equiparando la velocidad de desarrollo de la CMNs del ratón adulto a la de un ratón joven (Trinchero et al., 2017). Entonces es posible que exista un periodo temporal en el cual la neurona nueva es más susceptible a la integración por procesos cognitivos y, pasado ese momento crítico, se activan mecanismos que conducen a apoptosis celular (Aasebø et al., 2018; Biebl et al., 2000).

En ese contexto, y ante la ausencia de evidencia al respecto en el pez cebra adulto, se decidió estudiar la dinámica de sobrevivencia de las CMNs marcadas en condiciones control, bajo la siguiente hipótesis de trabajo:

En condiciones control o basales la sobrevivencia de las CMNs marcadas del *pallium* presentan un decaimiento temporal a tasa constante en las distintas regiones paliales y rostro-caudales.

Con ese objetivo se procedió a cuantificar el número de células EdU⁺ en los distintos tiempos, tanto para Dm como Dl y en las distintas regiones del eje rostro-caudal.

Los resultados revelaron un decaimiento temporal de la sobrevivencia de células EdU⁺ en ambas regiones paliales pero sólo en las secciones rostro-caudales que habían presentado mayor número de CMNs marcadas a 4dpi: Dm rostral y Dl caudal. A 64 dpi la región Dm-rostral mostró un porcentaje de sobrevivencia del 56 % respecto de 4 dpi (EdU⁺/mm², media $\pm$ SEM: 4 dpi 248.33 $\pm$ 29.21, n_{4dpi} = 8; 64 dpi 138.0 $\pm$ 14.39, n_{64dpi} = 6) y la región Dl-caudal mostró una sobrevivencia del 54 % (EdU⁺/mm², media $\pm$ SEM: 4 dpi 145.7 $\pm$ 21.07, n_{4dpi} = 8; 32 dpi 76.64 $\pm$ 22.22, n_{32dpi} = 5; 64 dpi 78.81 $\pm$ 5.79, n_{64dpi} = 6), mientras que para el resto de las regiones no se vieron diferencias. Estos resultados pueden observarse cualitativamente en la Figura 3.2 B y cuantitativamente en la Figura 3.5 B,C.

Por otro lado, el ajuste de los datos de sobrevivencia a una función exponencial reveló

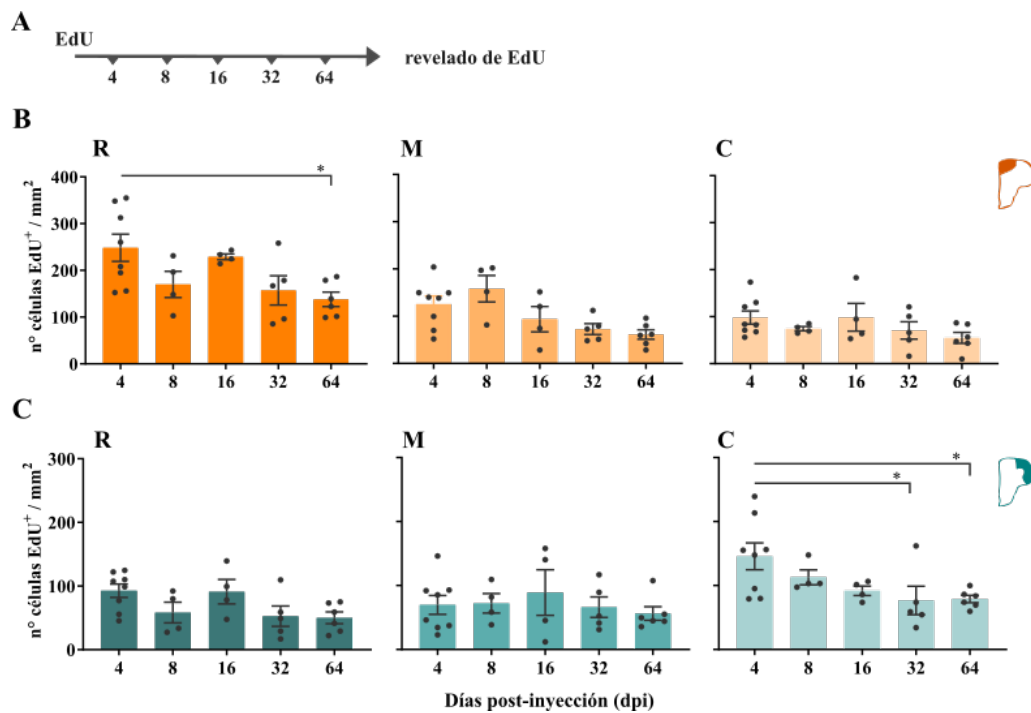


Figura 3.5: **Curso temporal de supervivencia de la cohorte de células EdU⁺.** (A) Diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y posterior tratamiento del tejido. (B,C) n° de células EdU⁺ a lo largo del eje rostro-caudal en la región Dm (B) y Dl (C) del *pallium*. Test de Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's. Dm-R: St=10.84, $p_v=0.028$; $p_{4vs64}=0.033$. Dl-C: St=9.94, $p_v=0.041$; $p_{4vs32}=0.011$, $p_{4vs64}=0.019$; $n_{4dpi}=8$; $n_{8dpi}=4$; $n_{16dpi}=4$; $n_{32dpi}=5$; $n_{64dpi}=6$. * $p<0.05$. R: rostral, M: medial, C: caudal.

tasas de decaimiento de $-0.03/\text{día}$ para Dm-rostral ($R^2=0.95$) y $-0.11/\text{día}$ para Dl-caudal ($R^2=0.99$) (como se puede observar en el Apéndice A.4, Tabla y Figura). Es decir, la región de Dl caudal muestra una caída más pronunciada. Podría interpretarse que Dl caudal posee una mayor tasa de recambio celular ya que presenta una mayor cantidad de CMNs marcadas a 4 dpi que decaen más rápidamente con el paso del tiempo (ver Tabla 3.1). Este resultado coincide con lo reportado en el trabajo de Dray et al. (2015) donde observan una mayor frecuencia de activación de CMNs en Dl respecto a Dm.

Región	n° células totales (4dpi)	Tasa de decaimiento
Dm-R	10.63 ± 1.22	$-0.03/\text{día}$
Dl-C	16.13 ± 1.75	$-0.11/\text{día}$

Cuadro 3.1: **Datos extraídos de la cuantificación de células EdU⁺ en Dm rostral y Dl caudal.** Valores promedio del número de células marcadas y cuantificadas en las regiones Dm-rostral y Dl-caudal del *pallium* a 4 días de la marcación, media $\pm$ SEM y su respectiva tasa de decaimiento en el tiempo. $n_{4dpi}=8$.

Un importante aspecto a considerar es la ausencia de estímulos externos que modulen la integración de las nuevas neuronas. Este entorno puede dar lugar a mecanismos apoptóticos que lleven a la muerte celular de neuronas que no se incorporaron a los circuitos

preexistentes, como sucede en roedores (Biebl et al., 2000). Si dicho proceso se replicase en el pez cebra podría explicar el decaimiento de la sobrevida. Si bien no fue posible evaluar cuantitativamente la apoptosis por dificultades en su medición, se observó cualitativamente la morfología nuclear marcada por EdU. Se observaron núcleos normales y núcleos segmentados similares a núcleos picnóticos. La picnosis es un fenómeno asociado a la muerte celular por apoptosis que se corresponde con la condensación irreversible de la cromatina. En la Figura 3.6 puede observarse este tipo de morfología nuclear a 4 dpi.

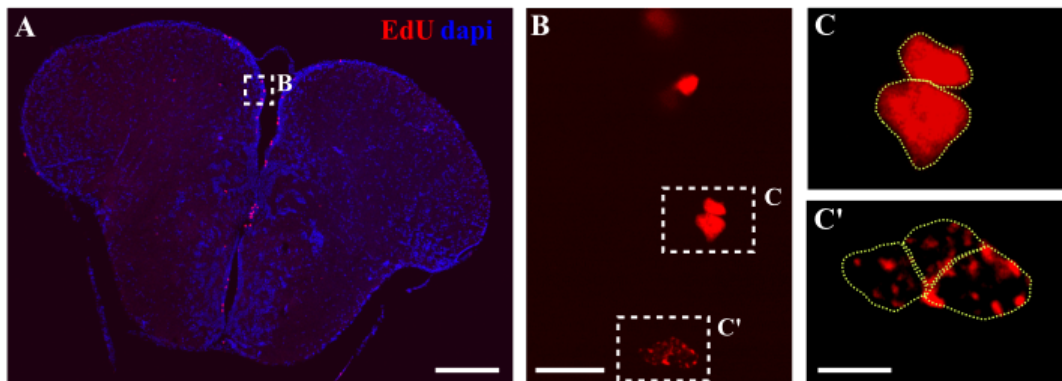


Figura 3.6: **Morfología nuclear de células EdU⁺ a 4dpi.** (A) Imágen de corte coronal medial del telencéfalo del pez cebra. Núcleos EdU⁺ teñidos por reacción de *click* (rojo) y núcleos teñidos con tinción de DAPI (azul). Barra de escala: 100 μ m. (B) Magnificación de la región Dm del *pallium* indicada en A con recuadro blanco punteado. Barra de escala: 20 μ m. (C,C') magnificación de núcleos normales (C) y aparentemente segmentados (C') señalados en B con recuadro blanco punteado. Barra de escala: 10 μ m. Línea punteada amarilla: delimitación del núcleo.

En resumen, en un periodo de dos meses se observó un decaimiento del 50 % en el número de células EdU⁺ en las regiones Dm-R y Dl-C del *pallium*. La tasa de decaimiento difirió en ambas regiones, siendo mayor en Dl caudal e indicando un mayor recambio celular en esa región. En otras palabras, se observó que la cohorte marcada no solo no se mantiene en su totalidad, sino que también disminuye con el tiempo, mostrando una variación dependiente de la región en estudio.

El análisis cualitativo de los núcleos de EdU sugiere que podrían estarse activando mecanismos apoptóticos por ausencia de integración a circuitos preexistentes. Sin embargo, debe considerarse que el envejecimiento del pez conlleva una disminución en la tasa de crecimiento, lo cual trae aparejada una menor tasa neurogénica. Si la neurogénesis no es aditiva podría suceder que la integración de las nuevas neuronas sea a demanda de la actividad de los circuitos neuronales. De esa manera, a edades avanzadas pueden evidenciarse fenómenos de decaimiento en la sobrevida de las cohortes marcadas que no han sido reportados en estadios mas tempranos.

3.1.2 Potencial de amplificación limitado de CMNs adultas

Para que el proceso de neurogénesis se mantenga constante a lo largo de toda la vida del pez cebra es necesario que las distintas zonas proliferativas del telencéfalo mantengan la homeostasis. Es decir, el reservorio de células madre debe conservarse en el tiempo para no sufrir agotamiento. Este equilibrio está dado por la forma de dividirse de las CMNs proliferantes y por su cinética de división.

Entonces, estas CMNs pueden clasificarse según su actividad de proliferación. Si se produce una división *conservativa*, la célula madre da lugar a dos células de las cuales al menos una es idéntica a la célula parental (manteniendo el reservorio). En cambio, si se produce una división *no conservativa* las células hijas seguirán el proceso de diferenciación y especificación contribuyendo a una reducción de la capacidad neurogénica. Sea uno u otro caso, los comportamientos a escala poblacional son muy distintos y, como se mencionó anteriormente, puede variar según la región telencefálica en estudio.

La ZPV del *pallium* del pez cebra coincide con las zonas proliferativas del telencéfalo. Allí las CMNs activas poseen una cinética de división celular asociada que influye directamente en la tasa neurogénica. Estudios previos mostraron la presencia de zonas de proliferación lenta y rápida en el telencéfalo del pez cebra, correspondientes al *pallium* y *subpallium* respectivamente (Adolf et al., 2006). A su vez, el *pallium* mostró tasas de ciclado rostro-caudales similares en ambas subdivisiones Dm y Dl (Lindsey et al., 2012).

En ese marco se decidió evaluar la proporción de CMNs marcadas que continúa proliferando con el paso del tiempo bajo la siguiente hipótesis de trabajo:

Las CMNs presentes en la ZPV del *pallium* sufren divisiones conservativas de manera tal que mantienen estable la población de células madre.

Para ello se evaluó la actividad mitótica de las células marcadas a lo largo del tiempo mediante la detección de la co-expresión de EdU y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). PCNA es una proteína nuclear necesaria para la síntesis de DNA y auxiliar de la DNAPolimerasa δ . Se sabe que posee bajos niveles de expresión en células quiescentes y aumenta durante la fase G1/S del ciclo celular (Kelman, 1997).

La primera observación, tanto para Dm como Dl, fue que las CMNs marcadas seguían proliferando incluso un mes después de la marcación. En la subdivisión Dm del *pallium* el n° de células proliferantes decayó a cero en un periodo de 64 dpi (n° de células EdU⁺PCNA⁺/mm², media $\pm$ SEM: Rostral: 87.04 ± 32.73 ; Caudal: 47.51 ± 14.04 , $n_{4dpi} = 8$). Dado que dicho resultado podría vincularse a la disminución ya mencionada del marcador EdU, se observó qué sucedía con el porcentaje de células relativizado al EdU total. Se observó la misma tendencia: la proporción de CMNs a 4 dpi fue de 34 y 46 % en las regiones rostral y caudal respectivamente, llegando a cero en 64 dpi. Es decir que, en Dm, las células proliferantes marcadas retuvieron su capacidad proliferativa por al menos un mes y a 64

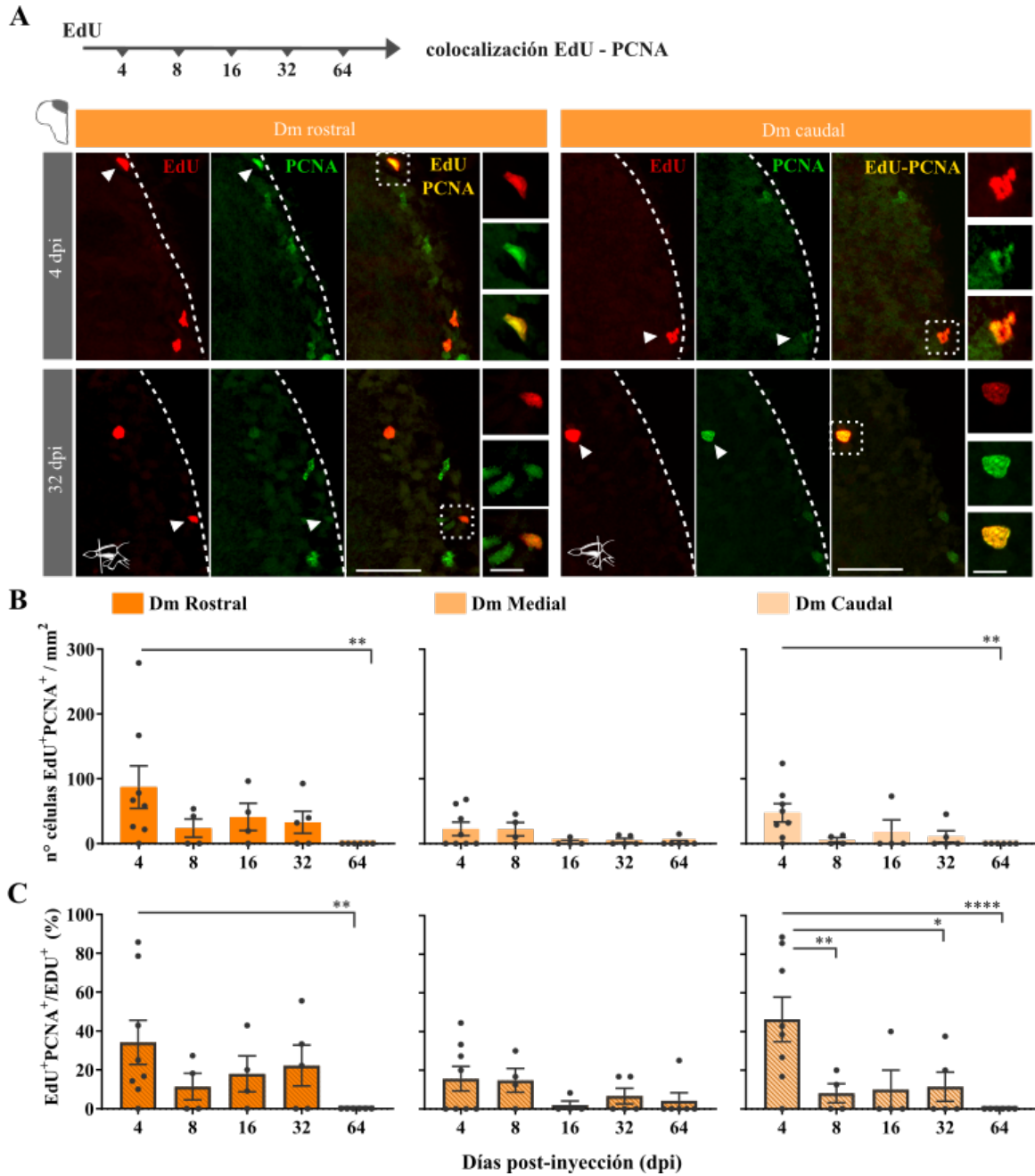


Figura 3.7: CMNs mitóticas en la región Dm del *pallium*. (A) Panel superior: diseño experimental. Diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dm rostral (izquierda) y caudal (derecha) del *pallium* a 4 y 32 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección para PCNA. Línea punteada: borde del tejido. Flechas blancas y recuadro punteado: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μ m; ampliación 10 μ m. (B,C) Curso temporal de CMNs mitóticas en la región Dm del *pallium*, evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺PCNA⁺. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: Dm-R: St=9.65, $p_v=0.047$, $p_{4vs64}=0.009$. Dm-C: St=11.72, $p_v=0.02$, $p_{4vs64}=0.005$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. Dm-R: $p_v=0.003$. Dm-C: $p_{4vs8}=0.001$, $p_{4vs32}=0.012$, $p_{4vs64}=0.0001$. $n_{4dpi}=8$, $n_{8dpi}=4$, $n_{16dpi}=4$, $n_{32dpi}=5$, $n_{64dpi}=6$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,001$.

dpi, la perdieron. Estos resultados pueden observarse en la Figura 3.7.

En la subdivisión Dl del *pallium* la tendencia fue similar. Se observó un decaimiento temporal del n° de células mitóticas que llegó a cero en un periodo de dos meses (n° de células EdU⁺PCNA⁺ /mm², media $\pm$ SEM: Rostral: 28.2 ± 8.88 ; Caudal: 69.09 ± 24.04 n_{4dpi} = 8). Al observar la proporción de CMNs mitóticas marcadas se obtuvo un 30 y 44 % de colocación a 4dpi en las regiones rostral y caudal respectivamente, con una caída a cero en la región rostral y a 9.1 % en la caudal, a 64 dpi. Estos resultados se pueden observar en la Figura 3.8.

Por último se evaluó la tasa de decaimiento temporal de las CMNs mitóticas marcadas en las distintas regiones, otro indicador de lo que sucede con la autorrenovación de las CMNs en la zona proliferativa. En Dm se encontraron tasas de -0.05 y -0.54/día en las regiones rostral y caudal respectivamente ($R^2=0.96$, $R^2=0.98$), mientras que para Dl fueron de -0.07 y -0.34/día para las mismas regiones ($R^2=0.95$, $R^2=0.98$). Estos resultados sugieren que el número de células proliferativas de la región caudal posee una caída más pronunciada, independientemente de la subdivisión palial (ver Apéndice A.4, Tabla y Figura). Este resultado coincide con los resultados de sobrevida (Dm rostral *vs* Dl caudal), con el agregado de que en la región Dl la condición proliferativa de la cohorte se pierde antes.

Si bien las diferencias se observaron en las regiones rostral y caudal (tanto para Dm como para Dl), es importante destacar que los valores más altos de CMNs proliferantes están en la región rostral de Dm y caudal en Dl, es decir, en las regiones con mayor marca de EdU. La región medial, por su parte, muestra una tasa de ciclado estable en el periodo temporal estudiado. Por otro lado, al observar lo que sucede en el último punto temporal de la curva, la región Dl caudal no llega a valores nulos de proliferación, resultado que se contradice con lo reportado en Lindsey et al. (2012) donde evidencian que las regiones rostral y caudal tienen distinta tasa de ciclado rostro-caudal.

En resumen estos hallazgos indican que una proporción de la cohorte celular marcada continúa dividiéndose por al menos un mes después de la marcación. Puede interpretarse que las CMNs se dividen de manera *no conservativa* y eso conlleva una disminución del reservorio de CMNs o quizás no haya eventos de inactivación de CMNs mitóticas y, por lo tanto, la descendencia se diferencia en su totalidad. También podría haber sucedido que el número de células marcadas no sea suficiente para evidenciar el proceso o que el intervalo temporal estudiado no es suficiente para reproducir lo observado en el trabajo de Labusch et al. (2020), donde si muestran eventos de inactivación. Es decir, si bien las alternativas son múltiples, se deberá seguir caracterizando el proceso para definir cual/cuales de las opciones son correctas.

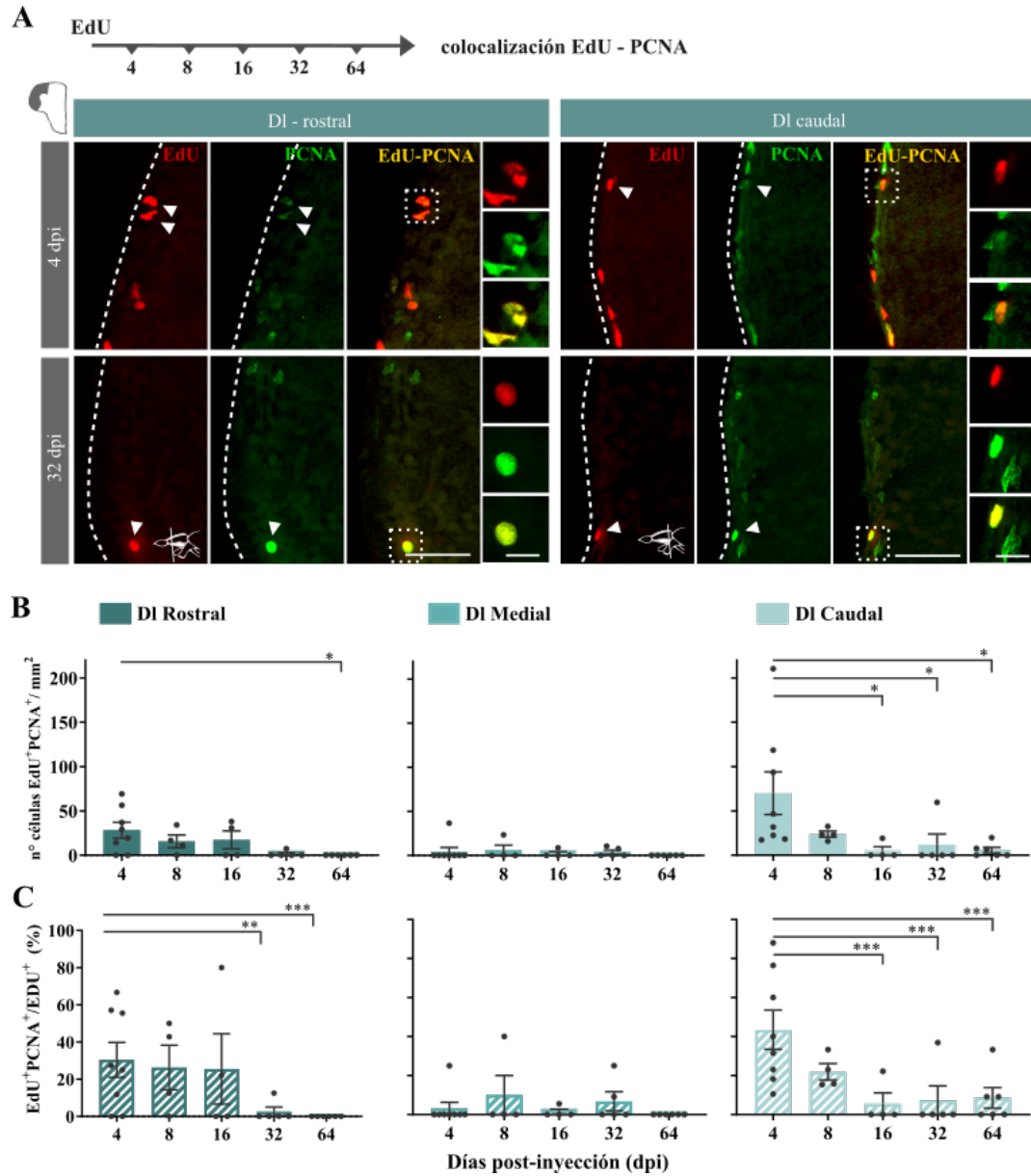


Figura 3.8: CMNs mitóticas en la región DI del *pallium*. (A) Panel superior: diseño experimental. Diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región DI rostral (izquierda) y caudal (derecha) del *pallium* a 4 y 32 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección para PCNA. Línea punteada: borde del tejido. Flechas blancas y recuadro punteado: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μ m; ampliación 10 μ m. (B,C) Curso temporal de CMNs mitóticas en la región DI del *pallium*. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺PCNA⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: DI-R: St=11.32, $p_v=0.023$, $p_{4vs64}=0.016$. DI-C: St=15.15, $p_v=0.004$, $p_{4vs16}=0.023$, $p_{4vs32}=0.028$, $p_{4vs64}=0.018$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. DI-R: $p_{4vs32}=0.004$, $p_{4vs64}=0.001$. DI-C: $p_{4vs16}=0.001$, $p_{4vs32}=0.004$, $p_{4vs64}=0.002$. $n_{4dpi}=8$, $n_{8dpi}=4$, $n_{16dpi}=4$, $n_{32dpi}=5$, $n_{64dpi}=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$.

3.1.3 Multipotencialidad de las CMNs

Múltiples estudios en el pez cebra han logrado explicar la contribución de la neurogénesis temprana al desarrollo del telencéfalo. Es decir, la regionalización funcional y morfológica tempranas dan lugar a la complejidad de su estructura. Un estudio de marcado genético condicional mostró que las poblaciones de CMNs de la ZPV se originan de dos subtipos de progenitores embrionarios distintos, uno que da forma a la superficie Dm y el otro a la superficie lateral del *pallium* y luego se mantienen durante toda la vida del individuo (Dirian et al., 2014).

Las CMNs del *pallium* dan lugar a las neuronas de proyección excitatorias o glutamatérgicas. Las mismas liberan glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del SN y pueden ser distinguidas durante su diferenciación por la expresión del factor de transcripción Tbr1 o por diversos componentes de la familia de factores de transcripción bHLH, como NeuroD1/2 y math2/3 (Mueller et al., 2006; Mueller and Wullmann, 2009).

En el *subpallium*, en cambio, los progenitores producen interneuronas inhibitorias o GABAérgicas. Las mismas liberan GABA, el neurotransmisor inhibitorio por excelencia, que se forma a partir de la α -decarboxilación del glutamato y por acción de la enzima ácido glutámico decarboxilasa 1b (gad1b, una enzima muy utilizada para el reconocimiento del fenotipo GABAérgico). También se pueden reconocer en etapas tempranas de diferenciación por la expresión de los factores de transcripción Dlx5 y Dlx6 (Schuurmans and Guillemot, 2002).

Dado que el origen de los progenitores presentes en la zona periventricular se mantiene en la adultez, sería de esperar que recapitulen los procesos de diferenciación que suceden durante el desarrollo. Sin embargo, no se han hecho estudios temporalmente sistematizados para determinar las tasas de diferenciación neuronal y los fenotipos generados.

En ese contexto y con el objetivo de dilucidar el destino funcional fenotípico de las nuevas neuronas generadas en el pez adulto se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

En los nichos neurogénicos del *pallium* del telencéfalo del pez cebra adulto se generan tanto neuronas GABAérgicas como glutamatérgicas.

Para ello se implementó la técnica clásica de marcación de progenitores neurales con EdU y se realizó un seguimiento temporal para la detección del subtipo neuronal.

NeuroD1 - CMNs adultas generan neurogénesis glutamatérgica

Dentro de las diversas alternativas de marcación y reconocimiento de células glutamatérgicas se encuentra NeuroD1 o *neuronal differentiation 1* (ND1), un factor de transcripción.

El mismo está implicado en la neurogénesis tanto embrionaria como adulta y forma parte de un programa regulatorio muy conservado en la evolución (Hevner et al., 2006; Tutukova et al., 2021).

En el hipocampo de roedores adultos ND1 se expresa transitoriamente durante el estadio de neuroblasto, etapa de transición entre el progenitor neural y la neurona madura, y está implicado en los procesos de diferenciación y supervivencia (Hsieh, 2012; Roybon et al., 2009). Se ha observado que la deficiencia de NeuroD1 en ratones está asociada a graves anormalidades del sistema nervioso central y periférico por lo que se considera esencial para inducir el compromiso neuronal (Cho and Tsai, 2004). Células madre en cultivo extraídas de la ZSV de ratón y electroporadas con NeuroD1 mostraron un aumento del 100 % del compromiso neuronal. Complementariamente, experimentos *in vivo* mostraron que la transfección de NeuroD1 provocó una disminución del número de células de glía radial en la ZSV debido a un aumento en su diferenciación. Es decir que su efecto en condiciones fisiológicas es sobre la diferenciación terminal de las neuronas (Boutin et al., 2010).

ND1 también es un marcador neuronal post mitótico ampliamente utilizado en el modelo de pez cebra. Se sabe que en etapas tempranas del desarrollo comienza a expresarse a 24 horas post-fertilización en el mesencéfalo y prosencéfalo (así como también en el tubo neural, entre otros), mientras que en el *pallium* comienza a expresarse a 48 dpf (Mueller and Wullmann, 2002; Thomas et al., 2012). En el interior de la célula se expresa tanto en el citoplasma como en el núcleo y, entre sus roles intracelulares, se encuentra la inhibición de la vía de *notch* que permite la salida del ciclo celular hacia el proceso de diferenciación (Dennis et al., 2019).

El factor de transcripción ND1 también juega un rol fundamental en el desarrollo de neuronas glutamatérgicas, no sólo porque participa en el desarrollo de distintos aspectos de las mismas, sino porque también inhibe su diferenciación a neuronas GABAérgicas. En la figura 3.9A se puede observar el mecanismo simplificado de factores de transcripción que dan lugar a la diferenciación de las CMNs. Se sabe que en la corteza cerebral de mamíferos la neurogenina2 (NGN2) es el factor de transcripción maestro que regula la diferenciación glutamatérgica, motora y sensorial periférica, mientras inhibe la diferenciación a neurona GABAérgica a través de *mash1* (Guillemot et al., 2006; Hulme et al., 2021). Se ha probado que NGN2 está involucrada en la activación de NeuroD1/2, quien a su vez regula activación de *tbr1/2*, que finalmente conduce a diferenciación glutamatérgica excitatoria. Por el contrario, NGN2 también inhibe *mash1* (factor de transcripción que promueve la salida del ciclo celular y la posterior formación de neuronas GABAérgicas) impidiendo el desarrollo de neuronas inhibitorias en la corteza de mamíferos (Roybon et al., 2010). Por lo tanto, la diferenciación glutamatérgica en la corteza cerebral de mamíferos compromete la diferenciación GABAérgica mediante la expresión del factor de transcripción NeuroD1 (Dennis et al., 2019; Schuurmans and Guillemot, 2002). ¿Podría estar sucediendo el mismo proceso en la región Dm y Dl del telencéfalo del pez cebra adulto?

En este contexto y con el objetivo de evaluar el compromiso neuronal glutamatérgico de las CMNs del *pallium* del pez cebra se analizó la colocalización de la marca EdU con el

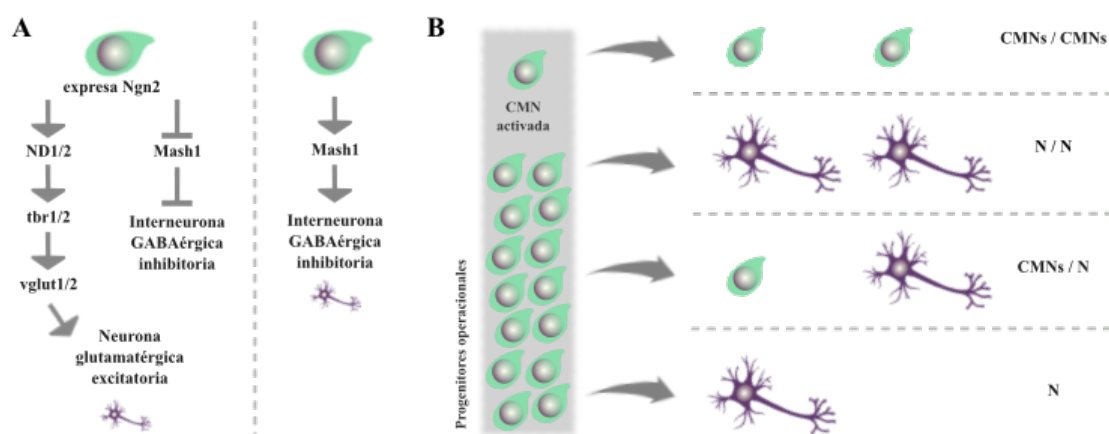


Figura 3.9: **Neurogénesis adulta: Vías alternativas de diferenciación de CMNs** (A) Regulación del proceso de diferenciación a neurona glutamatérgica (panel izquierdo) y GABAérgica (panel derecho). (B) Distintas alternativas de división/diferenciación de la población operativa de CMNs. ND1/2: NeuroD1/2; NGN2: neurogenina2; tbr1/2: *T brain 1*; vglut1/2: transportador de glutamato vesicular; mash1: *Achaete-scute homolog 1*; N: neurona.

factor de transcripción ND1 a distintos tiempos post-marcación: 4, 16 y 64 dpi.

En líneas generales los resultados mostraron una expresión de ND1 temporal y espacialmente constante en la progenie de CMNs marcada, con una alta proporción de colocalización. La subdivisión anatómica Dm mostró una colocalización constante en el eje rostro-caudal, en número y porcentaje de células. La región rostral mostró un promedio de 79 % de co-marcación (% de colocalización: 4dpi: 74.85, 16dpi: 75.84, 64dpi: 86.67), la región medial 82 % (% de colocalización: 4dpi: 72.14, 16dpi: 84.38, 64dpi: 90) y la caudal 87 % (% de colocalización: 4dpi: 90.94, 16dpi: 73.92, 64dpi: 97.5), como puede se puede ver en la Figura 3.10.

En la subdivisión Dl se observó un patrón similar. El porcentaje de colocalización no varió en tiempo y espacio en las regiones rostral y medial, obteniéndose un promedio de 77 % de colocalización rostral (% de colocalización: 4dpi: 78.57, 16dpi: 69.71, 64dpi: 82.86) y un 62 % medial (% de colocalización: 4dpi: 72.1, 16dpi: 78.31, 64dpi: 36.67). La región caudal, por su parte, mostró una media de colocalización del 90 % (% de colocalización: 4dpi: 90.39, 16dpi: 92.86, 64dpi: 86) con un decaimiento temporal del número de células (n° de células $\text{EdU}^{+}\text{ND1}^{+} / \text{mm}^2$, media $\pm$ SEM: 4dpi 139.8 ± 24.31 , 64dpi 26.77 ± 6.07 , $n_{4\text{dpi}} = 4$, $n_{64\text{dpi}} = 5$) que no se vió reflejado en el porcentaje. Estos resultados pueden observarse en la Figura 3.11.

Al analizar la tasa de decaimiento de la región Dl-C se obtuvo un valor de -0,098/día ($R^2=0.91$, como se puede ver en el Apéndice A.4, Tabla y Figura), valor similar a la tasa de decaimiento de la cohorte general en esa región (-0.11/día, ver sección “Decaimiento temporal de la cohorte”). Este resultado podría suponer que Dl posee una menor integración de células glutamatérgicas al tejido, resultado coherente con la mayor frecuencia de activación de CMNs para esta región reportada en Dray et al. (2015). Es decir, si en esa región se

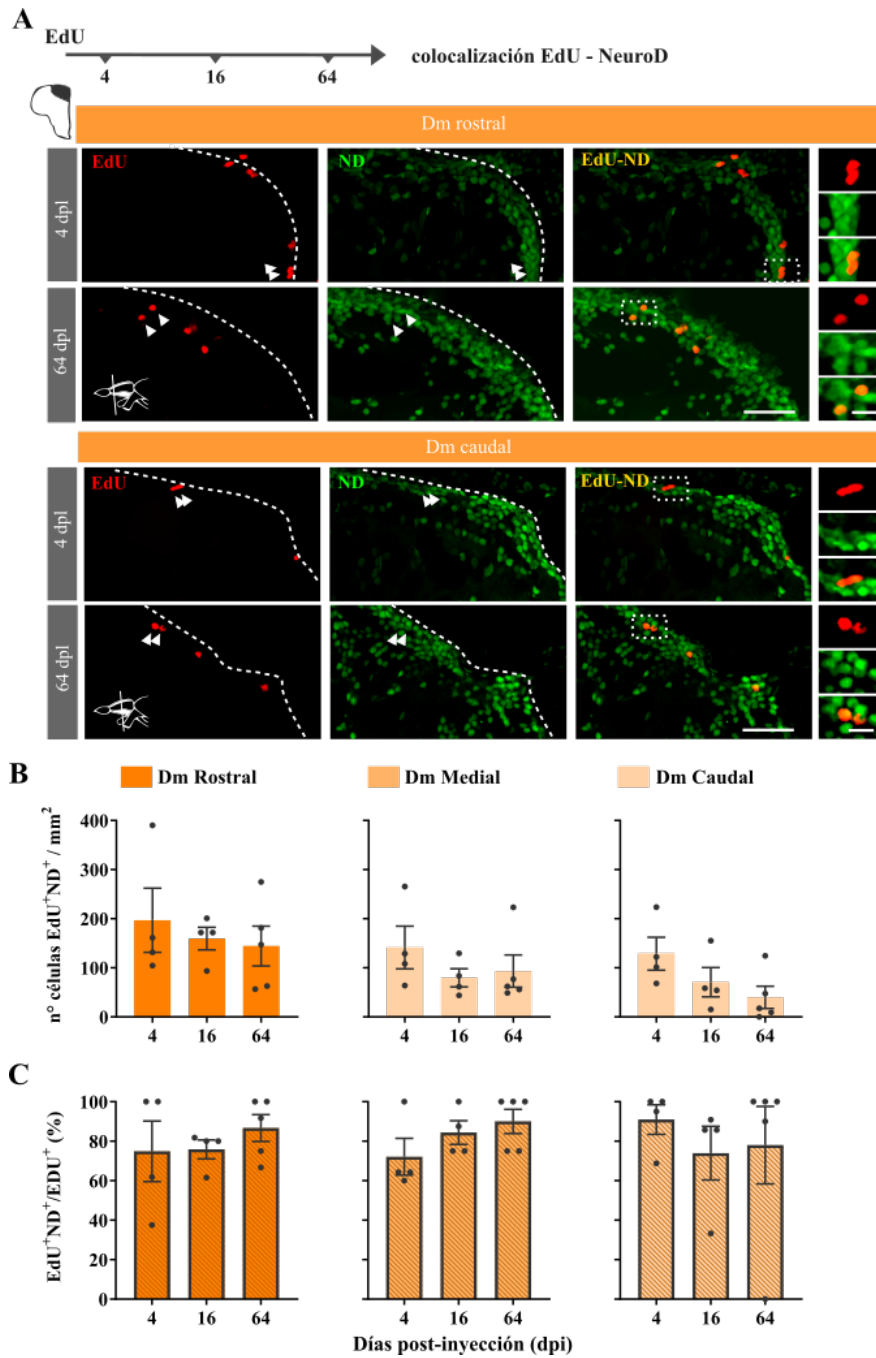


Figura 3.10: Destino glutamatérgico de la cohorte de CMNs marcada con EdU en la región Dm. (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dm rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 4 y 64 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección de ND1. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μ m; ampliación 10 μ m. (B,C) Curso temporal de adquisición de destino glutamatérgico de CMNs marcadas. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺ND1⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn's. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. $n_{4dpi}=4$; $n_{16dpi}=4$; $n_{64dpi}=5$.

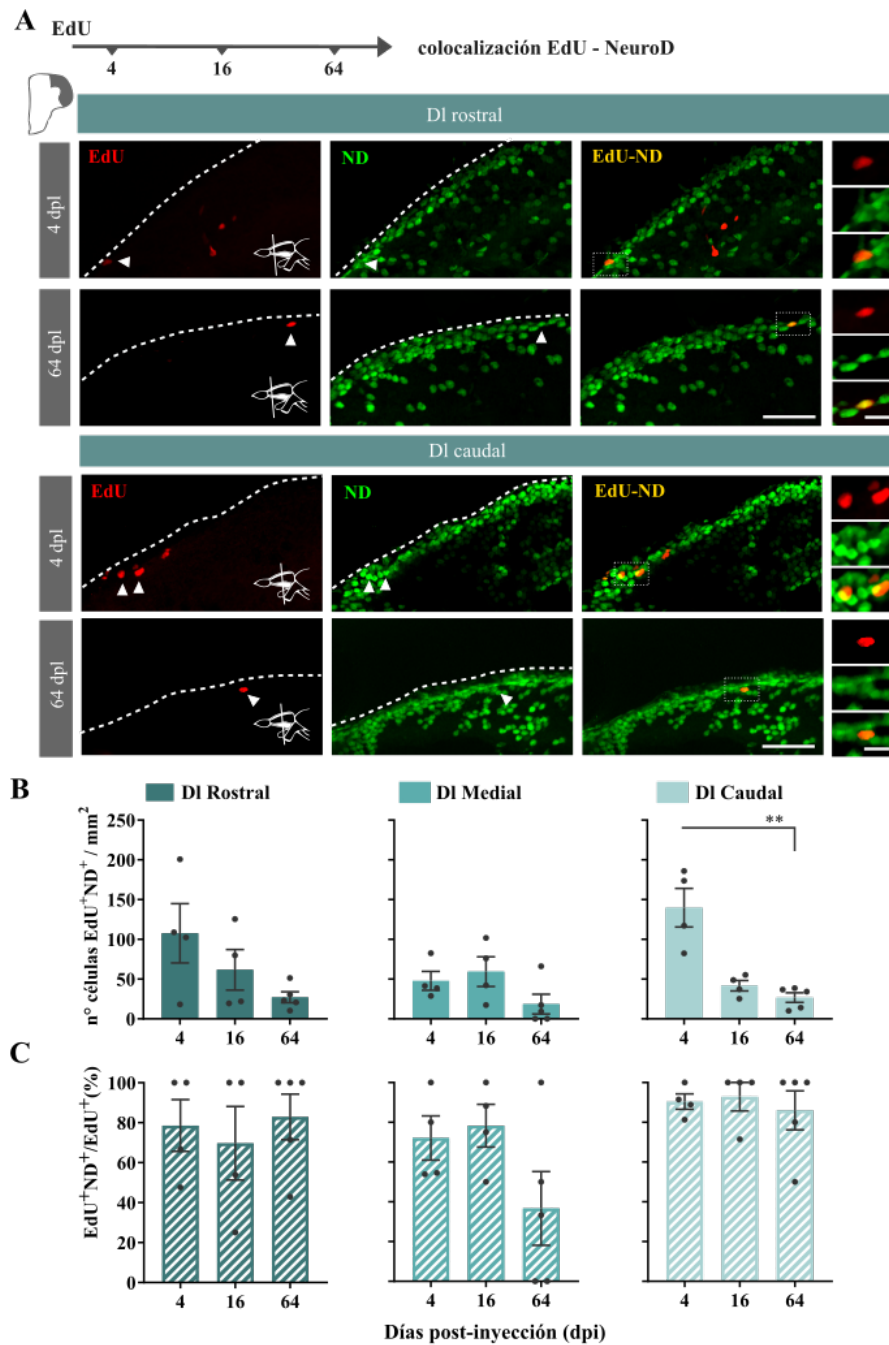


Figura 3.11: Destino glutamatérgico de la cohorte de CMNs marcada en la región DI. (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región DI rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 4 y 64 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección de ND1. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μ m; ampliación 10 μ m. (B,C) Curso temporal de adquisición de destino glutamatérgico de CMNs marcadas. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺ND1⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, DI-C: $St_{K-W}=8.78$, $p_v=0.002$, comparaciones múltiples de Dunn's: $p_{v-4vs64}=0.006$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. $n_{4dpi}=4$, $n_{16dpi}=4$, $n_{64dpi}=5$. ** $p<0.01$.

activan más CMNs por unidad de tiempo se esperaría mayor recambio de células (mueren más células EdU-ND1 por unidad de tiempo) o, el caso contrario, que esa región crezca más que el resto y eso no sucede.

Estos resultados, desde un punto de vista general, podrían indicar que la neurogénesis adulta del *pallium* del pez cebra tiene principalmente identidad glutamatérgica (aproximadamente un 80 %). A su vez, la escasa variabilidad del número de células en el tiempo podría interpretarse como que se mantiene constante la tasa de generación de células glutamatérgicas a lo largo del tiempo. Es decir, si bien el número de células EdU decae, las nuevas CMNs que se van diferenciando podrían estar generando este tipo neuronal y compensando esa disminución.

gad1b - expresión en el proceso de neurogénesis adulta

Como se mencionó anteriormente, una de las técnicas más implementadas para el reconocimiento del fenotipo neuronal GABAérgico es la detección de *gad1b*. Su expresión indica que en esa célula se produce la biosíntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA y, por lo tanto, da carácter de inhibitoria a la neurona. Evidencia de ello es un estudio de inhibición espacio temporal con morfolinós fotoactivables (bloqueadores de traducción) mostró que al bloquear *gad1b* a 1 dpf y observar el efecto en el periodo de 3 a 7 dpf se produce una actividad electrofisiológica cerebral anormal y aumentada en comparación con condiciones basales (O'Connor et al., 2018).

En ese contexto y con la finalidad de determinar la presencia de neurogénesis adulta GABAérgica a partir de CMNs presentes en el *pallium* se marcaron progenitores con EdU a 8, 32 y 64 dpi y luego se cuantificó su colocalización *gad1b*. Dado que la inmunodetección de *gad1b* es dificultosa debido a que se observa marca tanto en el citoplasma como en la región presináptica se utilizó la cepa *tg(gad1b:GFP)* que, como su nombre lo indica, expresa la proteína fluorescente verde (GFP) bajo la dirección del promotor de *gad1b*. En la Figura 3.12 puede observarse un ejemplo de colocalización de ambas marcas.

Los resultados mostraron un alto porcentaje de colocalización inicial con un posterior decaimiento a valores nulos en un periodo de dos meses. Dicho comportamiento se vio tanto para el número de células como para el % de colocalización EdU⁺-*gad1b*⁺ en ambas regiones paliales.

Por un lado, en la región Dm rostral y medial del *pallium* se observó un 47 y 34 % de colocalización a 8dpi y una disminución significativa del número de células con el paso del tiempo. En Dm rostral el decaimiento a 64 dpi fue del 96 % respecto de la marca a 8dpi (n° de células EdU⁺*gad1b*⁺ /mm², media ± SEM: 8dpi 71.85 ± 13.37; 64 dpi 2.91 ± 2.91, n_{8dpi} = 5, n_{64dpi} = 4). En la región medial el decaimiento fue del 91 % (n° de células EdU⁺*gad1b*⁺ /mm², media ± SEM: 8dpi 32.37 ± 11.44; 64 dpi 2.78 ± 2.78, n_{8dpi} = 5, n_{64dpi} = 4). Ambos resultados pueden observarse en la Figura 3.13. La región caudal de Dm no mostró significancia pero se observó la disminución y podría estar interfiriendo el bajo

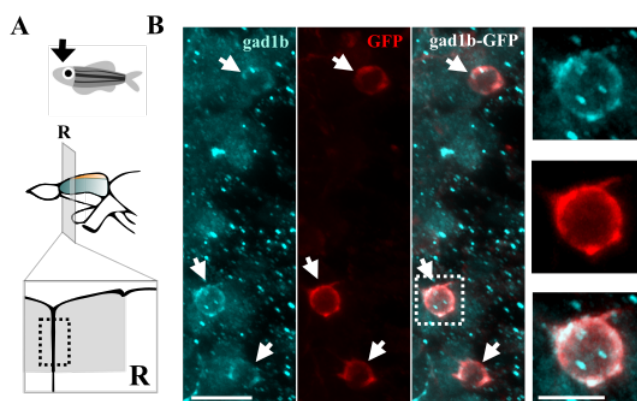


Figura 3.12: **Marca de gad1b en el tg(gad1b:GFP).** A) Diagrama de un corte coronal de la región Dm del *pallium* rostral del telencéfalo del pez cebra. Recuadro punteado negro: sección fotografiada en B. B) Imagen representativa de marca de gad1b (cian, izquierda), GFP (rojo, medio) y la colocalización de ambos (blanco, derecha). Ambas marcas fueron reveladas por técnicas inmunohistoquímicas. Flecha blanca: células gad1b⁺. Recuadro punteado blanco: sección ampliada. Barra de escala: foto: 10 μ m; ampliación: 5 μ m.

número de células marcadas en esa región.

En la subdivisión palial Dl las regiones R y C mostraron la misma tendencia. A 8dpi presentaron 42 y 54 % de colocalización en las regiones R y C respectivamente. La magnitud del decaimiento al comparar 8 y 64 dpi fue del 100 % (n° de células EdU⁺gad1b⁺ /mm², media $\pm$ SEM: Dl-R: 8dpi 12.19 $\pm$ 3.48; Dl-C: 8dpi 48.41 $\pm$ 10.94; n_{8dpi} = 5). Las mismas tendencias se observaron para % de células, como puede verse en la Figura 3.14 C.

Para este conjunto de datos también fue posible evaluar las tasas de decaimiento de la progenie con destino GABAérgico. Sin embargo no fueron interpretadas debido al bajo número de células que colocalizan. De igual manera los resultados pueden ser consultados en el Apéndice A.4.

En su conjunto, los resultados muestran una expresión de gad1b en CMNs marcadas a 8dpi que decae a valores nulos en un plazo de dos meses. Una posible interpretación de estos resultados consiste en que se generan neuronas GABAérgicas pero las mismas no se logran integrar en condiciones basales o en el periodo temporal evaluado. Si eso fuese correcto se esperaría que el porcentaje de células glutamatérgicas y GABAérgicas sea complementario en tiempos tempranos, ya que seguirían vías de diferenciación distintas. Sin embargo, al evaluarlo se observó que hay superposición en los porcentajes, es decir, no son complementarios. Por ejemplo, para Dm rostral se cuantificó un 79 % de neurogénesis glutamatérgica que se mantiene en el tiempo y, un 42 % de neurogénesis GABAérgica a 8 dpi. Es decir, existe un 20 % de superposición de los valores en esa región y eso puede estar indicando una subpoblación que expresa ND1 y gad1b simultáneamente. Como ambas cuantificaciones fueron realizadas en distintas muestras de tejido, se buscó evidencia cualitativa de la triple marca. Se encontró células EdU⁺ que presentaban ambos marcadores a 8 dpi, como puede observarse en la Figura 3.15.

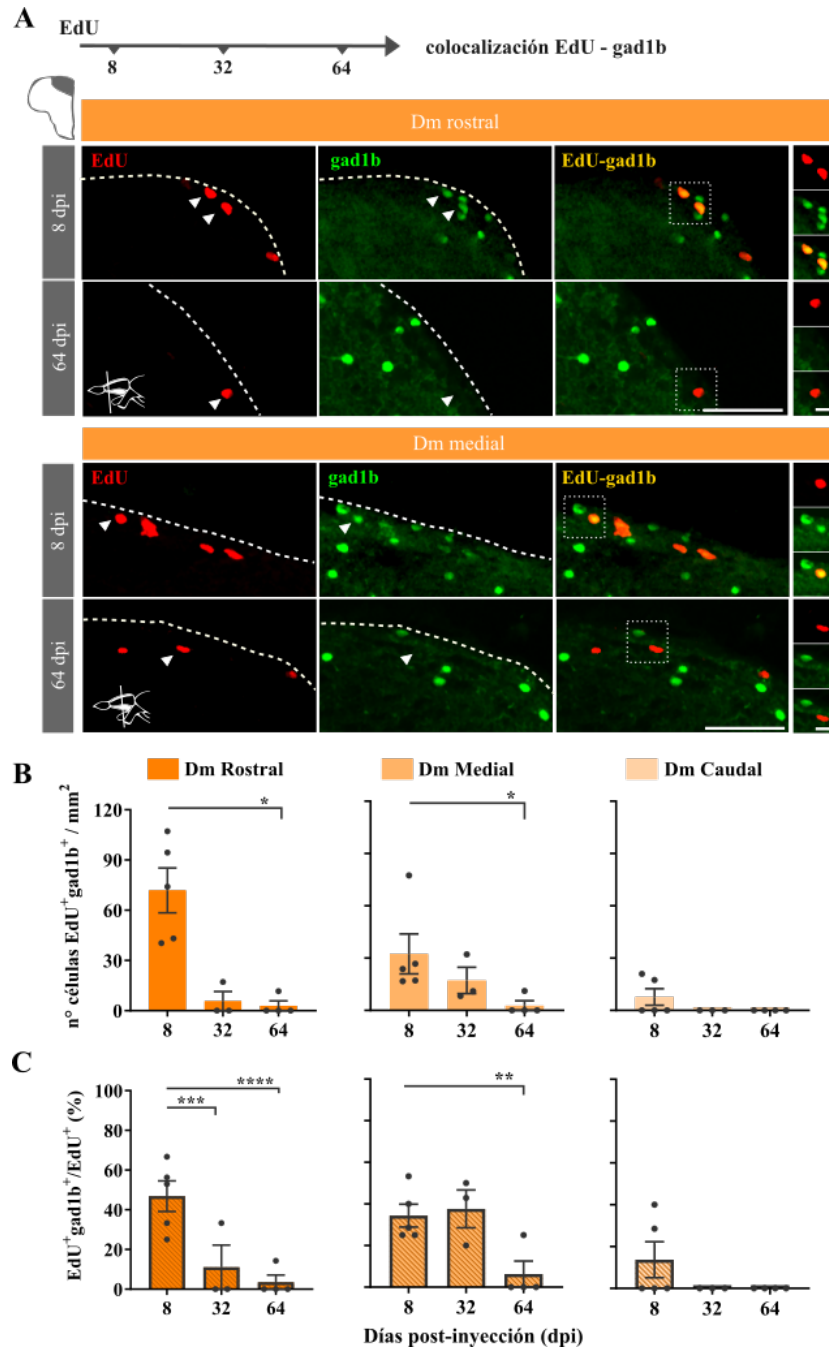


Figura 3.13: Destino GABAérgico de CMNs marcadas con EdU en la región Dm. (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y tratamiento del tejido. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dm rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 8 y 64 dpi. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto: 40 μ m, ampliación: 10 μ m. (B,C) Curso temporal de adquisición de destino GABAérgico de CMNs marcadas, en la región Dm. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺gad1b⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: Dm-R: St=8.73, $p_v=0.003$, $p_{8vs64}=0.014$. Dm-M: St=6.67, $p_v=0.02$, $p_{8vs64}=0.02$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. Dm-R: $p_{8vs32}=0.032$, $p_{8vs64}=0.0001$. $n_{8dpi}=5$, $n_{32dpi}=3$, $n_{64dpi}=4$. * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

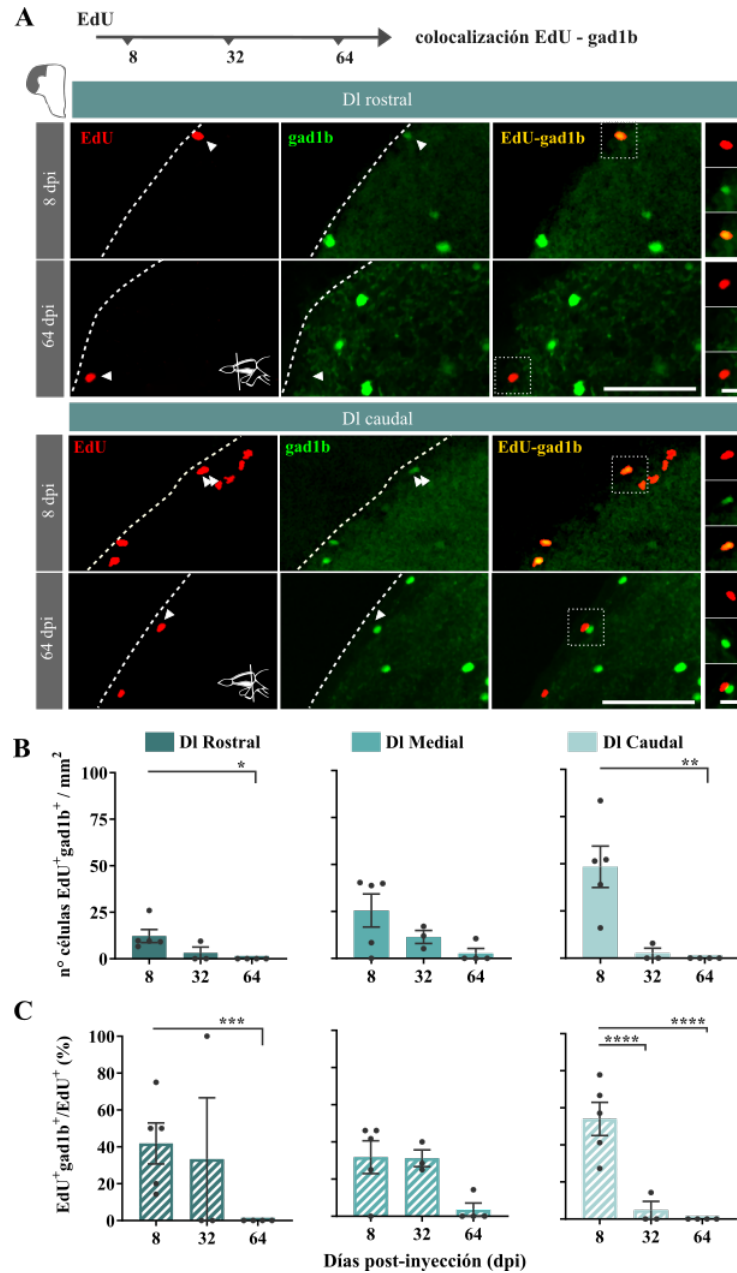


Figura 3.14: Destino GABAérgico de CMNs marcadas con EdU en la región DL. (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y tratamiento del tejido. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región DL rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 8 y 64 dpi. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto: 40 μ m, ampliación: 10 μ m. (B,C) Curso temporal de adquisición de destino GABAérgico de CMNs marcadas en la región DL. (B-C) Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺gad1b⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: DL-R: $St_{K-W}=7.73$, $p_v=0.009$, $p_{8vs64}=0.014$. DL-C: $St_{K-W}=8.55$, $p_v=0.02$, $p_{8vs64}=0.009$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. DL-R: $p_{8vs64}=0.002$. DL-C: $p_{8vs32}=0.0005$, $p_{8vs64}=0.00001$. *** $p<0.005$, **** $p<0.001$. $n_{8dpi}=5$, $n_{32dpi}=3$, $n_{64dpi}=4$.

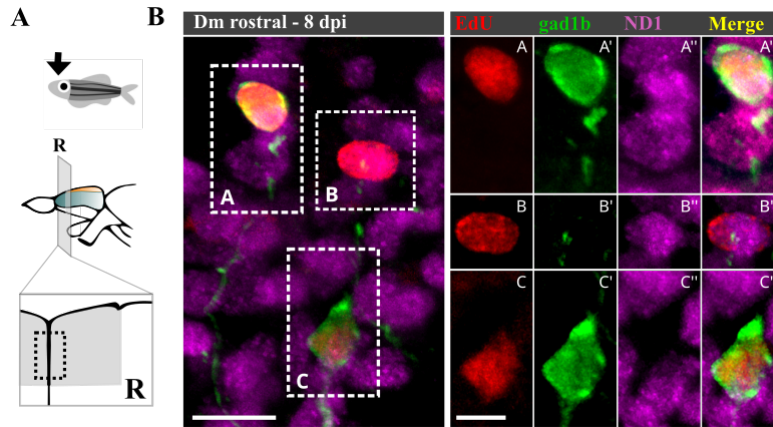


Figura 3.15: Subpoblación de CMNs $\text{EdU}^+\text{gad1b}^+\text{ND1}^+$ a 8dpi, en peces $\text{tg}(\text{gad1b:GFP})$. (A) Diagrama de selección de corte coronal de la región Dm del *pallium* del telencéfalo del pez cebra. (B) Imagen representativa de marca a 8dpi de EdU (A,B,C; rojo), gad1b (A',B',C'; verde), ND1 (A'',B'',C''; magenta) y su colocalización (A''',B''',C'''). Las marcas fueron reveladas por reacción de *click* (EdU) y técnicas inmunohistoquímicas (otras). Recuadros punteados en blanco: ampliación. Barra de escala: foto: 10 μm ; ampliación: 5 μm .

Dado ese resultado es necesario considerar otra alternativa de interpretación. Existe evidencia de que en etapas tempranas del desarrollo y en la adultez de mamíferos hay sistemas de desarrollo neuronal que sufren un *switch* fenotípico. Es decir, las neuronas del sistema nervioso cambian su neurotransmisor principal y, por ende, su perfil de respuesta (Spitzer, 2017). Se observó la presencia de represión de vías de señalización por factores de transcripción como NeuroD1 que previenen la formación de interneuronas GABAérgicas (Roybon et al., 2010). En este contexto podría considerarse la opción de que algunas CMNs marcadas con EdU comiencen a dividirse/diferenciarse y expresen gad1b tempranamente (carácter GABAérgico o inhibitorio inicial). Luego, al expresarse NeuroD1 se inhibe la expresión de gad1b y así se diferencia a neurona glutamatérgica. El decaimiento absoluto de los porcentajes en el tiempo va en línea con esta hipótesis.

En función de los resultados obtenidos es posible sugerir que las CMNs de la ZPV del *pallium* del pez cebra sólo generan células glutamatérgicas y una subpoblación de las mismas podría estar expresando gad1b tempranamente y perdiendo su marca durante el desarrollo.

3.2 Discusión y conclusiones

La neurogénesis adulta es una de varias estrategias de plasticidad que ha permanecido filogenéticamente. Comprender su funcionamiento en condiciones basales es esencial para poder estudiar la dinámica de procesos más complejos como la regeneración o la diversidad de respuestas a estímulos externos. En el presente trabajo se pudo avanzar con la caracterización del proceso de diferenciación de CMNs a neuronas en el *pallium* en el pez cebra adulto y, particularmente, en las regiones homólogas al hipocampo y la amígdala basolateral de

mamíferos, Dl y Dm, respectivamente.

El marcado de células con EdU permitió un correcto seguimiento del destino de las CMNs por un periodo de hasta 64 días luego de la inyección. Si bien la concentración utilizada fue lo suficientemente alta como para saturar su incorporación, no se descarta la posibilidad de haber tenido un proceso de dilución de la intensidad durante las sucesivas divisiones mitóticas. Si bien este proceso no ha sido caracterizado para EdU, se ha estudiado para BrdU confirmándose la disminución/segmentación de la marca en el núcleo con el paso del tiempo (Sauerzweig et al., 2009).

Por otro lado, se pudo observar que la región medial no mostró variaciones en la mayoría de los estudios. Eso puede comprenderse debido a que la región posee menor tasa neurogénica y, en consecuencia, la cantidad de CMNs marcadas es muy baja para detectar diferencias. En conclusión, no se descarta que todos los procesos mencionados sucedan también en esta región.

Dinámica espacio-temporal de CMNs mitóticas en el *pallium*

Gradiente de distribución rostro-caudal

La primera observación fue una distribución heterogénea del número de células marcadas en los nichos paliales. La región Dm del *pallium* presentó mayor número de células rostralmente mientras que en la región Dl la mayor densidad estaba en la región caudal. Esta distribución coincide con resultados previos obtenidos para Dl en el trabajo de Lindsey and Tropepe (2014) donde marcaron CMNs con BrdU y evaluaron el número de células 2 horas luego de la inyección. Obtuvieron mayor número de células en Dl caudal pero, para Dm, no vieron diferencias. Una posible explicación de ello es que no llegaron a evaluar regiones tan caudales como las exhibidas en el presente estudio y/o que al evaluar a 4 dpi las diferencias se acentuaron.

Un aspecto importante a considerar en el análisis de los resultados es la función de las regiones telencefálicas en estudio. Se sabe que tanto Dm rostral como Dl caudal son zonas susceptibles a modulación por aprendizaje. En el trabajo de Mazzitelli-Fuentes et al. (2022) se entrenaron peces cebra en un paradigma de comportamiento espacial y se reveló que el aprendizaje aumenta la neurogénesis en adultos a través de dos mecanismos, impulsar la proliferación de CMNs y el rescate de neuronas recién nacidas del proceso de apoptótico tanto en la región Dm rostral como la Dl caudal. Es decir, las regiones donde se vio modulación son las que poseen mayor tasa proliferativa.

Posicionamiento laminar

El análisis de la distribución espacial de las células EdU reveló un aumento progresivo en su distancia con respecto a la ZPV, siendo más evidente a 64 dpi. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones anteriores que indican que el *pallium* experimenta un crecimiento mediante la incorporación de neuronas originadas en la ZPV (Furlan et al., 2017; Labusch et al., 2020; Lindsey et al., 2012).

Entonces, la disposición de las células EdU en relación con la ZPV podría atribuirse al proceso de adición de neuronas en la superficie ventricular, donde las neuronas más jóvenes se integran sobre las recién formadas o podrían experimentar migración local. Así, los resultados respaldan la hipótesis de deposición laminar de células nuevas, sugiriendo que las neuronas generadas se organizan en capas específicas o láminas dentro del telencéfalo, reflejando procesos similares a los de la neurogénesis embrionaria.

A pesar de esta interpretación, no se descarta la posibilidad de migración celular, especialmente dada la ausencia de un crecimiento significativo del telencéfalo durante el periodo estudiado, lo que podría indicar migración a una escala de pocos micrones. Coincidiendo con esta perspectiva, investigaciones previas han informado la activación de CMNs quiescentes y su migración al parénquima, aunque en condiciones de reparación de tejido lesionado (Barbosa et al., 2015).

En conclusión, la observación detallada de la distribución de las células EdU respalda la idea de un proceso organizado de adición neuronal en el *pallium* adulto, aunque no excluye la posibilidad de migración celular, planteando interrogantes significativas sobre los mecanismos que regulan esa dinámica celular. A futuro se deberá abordar el estudio del microambiente que incide en esa migración celular a corta distancia y explorar cómo es dirigido espacialmente.

Decaimiento temporal de la cohorte

Analizando la filogenia, se observa una variabilidad significativa en los procesos de incorporación de neuronas nuevas al SN. Estudios realizados en ratas de 12 meses de edad mostraron que el tamaño del GD del hipocampo y su número de células granulares permanecen constantes, un fenómeno que se atribuye a un reemplazo celular sin aumento neto del tamaño de la región (Heine et al., 2004). Algo similar sucede en el BO de ratones pero en el hipocampo se observa un aumento aditivo de neuronas granulares, que resulta en un crecimiento constante de la región (Imayoshi et al., 2008). En peces cebra, en cambio, el crecimiento continúa a lo largo de toda su vida y eso implica incorporación de neuronas nuevas al SN para sostenerlo. Es decir que se evidencian respuestas divergentes en la producción de neuronas nuevas según la especie y el nicho neurogénico en estudio.

En el contexto de esta tesis, se investigó el comportamiento de las CMNs en el *pallium* del pez cebra adulto a lo largo de dos meses. Se observó un decaimiento temporal en el número de células marcadas, sugiriendo una producción en exceso de neuronas nuevas, con un rescate a demanda. Es decir, en condiciones basales y con mínimas exigencias ambientales, se podría estar produciendo una integración baja de neuronas nuevas, y una activación de mecanismos apoptóticos para las células que no se integran. Evidencia de ello fue la observación de núcleos condensados y segmentados a 4 dpi.

Sin embargo, estudios previos informan tasas bajas de apoptosis en el *pallium* del telencéfalo del pez cebra. Than-Trong et al. (2020) propuso un modelo aditivo de neurogénesis adulta sin eventos apoptóticos significativos, respaldado por la dificultad para detectar caspasa3, una proteasa vinculada a la apoptosis, en varios estudios (Jeon et al., 1999; Rothe-

naigner et al., 2011; Than-Trong et al., 2020). Aunque se reportó solo un 2 % de muerte celular en un análisis de expresión de caspasa3 a diferentes puntos temporales, aún no hay evidencia suficiente para atribuir el decaimiento observado a muerte celular (Labusch et al., 2020; Rothenaigner et al., 2011).

Por otra parte, en la presente Tesis se utilizaron peces cebra longevos, lo que podría implicar una menor tasa neurogénica y una cinética de diferenciación de CMNs más lenta. Than-Trong et al. (2020) no observó cambios significativos en la población de CMNs, la actividad proliferativa de las CMN y la elección del destino en la división a lo largo de un periodo extenso (500 dpi). En cambio, Barbosa et al. (2015) informó que la edad disminuye el número de CMNs activas. Es decir, la interacción de la edad con el mecanismo de rescate celular es un aspecto que aún requiere una evaluación más detallada para comprender completamente su impacto en el proceso neurogénico.

Potencial de autorrenovación de CMNs

En primer lugar es importante destacar que la técnica de marcación con EdU y PCNA en peces adultos permitió un revelado exitoso de CMNs mitóticas a lo largo de todo el telencéfalo dorsal y en distintos puntos temporales, como se ha mostrado en trabajos previos (Adolf et al., 2006; Than-Trong et al., 2020; Zupanc et al., 2005). Los resultados confirmaron la presencia de una subpoblación de células proliferantes dentro de la cohorte marcada, desde los 4 dpi y hasta un mes posterior a la marcación.

El primer aspecto a definir es el subtipo de CMNs proliferante que se marcó en el trabajo. Dado que la doble marca EdU-PCNA da carácter de CMNs activa, se consideró perteneciente a la subpoblación de células operacionales (ver Sección “Células Madre Neurales” del Capítulo 1). En el trabajo de Than-Trong et al. (2020) hacen referencia a esta subpoblación como progenitores neurales que son activables en tránsito, es decir que “generan neuronas después de un número limitado de divisiones”.

Luego, considerando que el marcado de células con EdU tiene por condición que la CMN esté proliferando, sería de esperar que en el instante posterior a la marcación la colocalización con PCNA sea del 100 %. Entonces con el correr de los días ese porcentaje podría: a) aumentar, si el proceso de división tiene mayor tasa que el de diferenciación; b) mantenerse, si ambos procesos están compensados o, c) disminuir, si la diferenciación tiene mayor tasa que la división. Los resultados obtenidos muestran que a partir de 4dpi se produce un decaimiento continuo. Dicho resultado es consistente con lo obtenido por Than-Trong et al. (2020). Mediante un seguimiento *in vivo* de cohortes marcadas durante 23 días observaron un decaimiento similar del número de CMNs para una misma línea clonal y propusieron un modelo de diferenciación de una CMN basado en las siguientes alternativas de división/diferenciación simétricas o asimétricas. Encontraron que la tasa de autorrenovación de progenitores del reservorio de CMNs posee un valor de 0.007células/día, lo que implica una división cada 142 días. Ese dato informa la baja probabilidad de que ese proceso suceda en un periodo de 64 días. Entonces, la caída continua de las CMNs mitóticas

podría ser nueva evidencia de ello y una confirmación de que se evaluó casi íntegramente CMNs operativas.

También es posible hacer un análisis sobre el comportamiento de esas células en relación a su distribución. En las regiones rostral y caudal, tanto para Dm como Dl, se observó disminución con el tiempo y las tasas fueron mayores para las regiones caudales y menores para las rostrales. Estos resultados permiten proponer que la región caudal tenga un mayor recambio de células. Este resultado podría relacionarse con lo presentado en el trabajo de März et al. (2010) donde sugieren la heterogeneidad de los progenitores PCNA⁺, clasificándolos en lentos (que expresan sox2) o rápidos (que expresan PSA-NCAM, marcador de neuroblastos).

Destino neuronal de las CMNs paliales

Aunque se posee mucha información sobre la neurogénesis en etapas tempranas del desarrollo del *pallium* del pez cebra todavía no se ha caracterizado completamente en el pez adulto. En el presente trabajo, los resultados obtenidos para la colocalización de EdU y NeuroD1 indican que las CMNs a 4 dpi ya poseen un carácter inicial de diferenciación a neurona (presentan $\approx 80\%$ de colocalización). Evidencia indirecta del mismo proceso son los porcentajes complementarios de dicha colocalización con la expresión a 4dpi de EdU y PCNA ($\approx 40\%$). Esos resultados sugieren que una parte de los progenitores que se encuentran proliferando tienen un destino neuronal ya establecido (los porcentajes se superponen en al menos un 30%). Caracterizaciones previas respaldan dicha interpretación, evidenciando una amplia diversidad de células progenitoras del *pallium* PCNA⁺, de las cuales una subpoblación expresa PSA-NCAM, un marcador de neuroblastos (März et al., 2010).

Por otro lado, el hecho de que la proporción de células EdU⁺- ND1⁺ se mantenga constante en el tiempo mientras la marca de EdU sólo decae, permite inferir que la cohorte marcada se va diferenciando progresivamente. En principio estos resultados difieren de trabajos previos como el estudio de (Than-Trong et al., 2020) donde se muestra un incremento constante de neuronas incorporadas a la región Dm del *pallium*. En ese trabajo definen neurona como la pérdida de expresión del marcador GFAP, que se encuentra presente sólo en estadios de CMNs indiferenciada. Allí, durante los primeros 64 dpi se observa un incremento temporal del número de neuronas pero el mismo se observa en peces de 5 meses de edad. Al mirar lo que sucede al final de esa curva (entre 200 y 300 dpi, correspondiente a peces de 9 meses) se alcanza una asíntota horizontal (Lam et al., 2009). Otro trabajo que respalda estos resultados es el de Lindsey et al. (2012) donde se marcan CMNs con BrdU y se cuantifica la colocalización con el marcador neuronal temprano HuC/D a 2 hs y 1, 2 y 4 semanas post marcación. Obtienen un incremento entre las 2hs y las 2 semanas que luego se mantiene constante, llegando a una asíntota horizontal tanto en Dm como Dl de un $\approx 50\%$. Es decir, obtienen resultados equiparables a los obtenidos en la tesis. La diferencia en los porcentajes finales a los que se llega con HuC/D y ND1 podrían deberse al marcador utilizado y los periodos de expresión en el ciclo celular.

Neurogénesis glutamatérgica

La expresión inicial y constante de ND1 en la cohorte marcada también dio información sobre el destino fenotípico de las nuevas neuronas, indicando que la neurogénesis de las regiones Dm y Dl del *pallium* del pez cebra es principalmente glutamatérgica (ver mecanismo de diferenciación a neurona glutamatérgica en la Figura 1.4). Si bien en el modelo del pez cebra no existe evidencia previa al respecto, se sabe que los nichos neurogénicos de mamíferos poseen neurogénesis glutamatérgica dirigida por factores de transcripción específicos como NeuroD1 (Hodge et al., 2012). Por lo tanto, podría interpretarse que la región Dl exhibe procesos similares a su región homóloga: la ZSG del hipocampo que también posee neurogénesis glutamatérgica (Hodge et al., 2012).

Neurogénesis GABAérgica

Para la visualización de células $gad1b^+$ o GABAérgicas se utilizó exitosamente la línea transgénica $tg(gad1b:GFP)$ (Kim et al., 2019; Satou et al., 2013). Se observó, por un lado, un indicio de neurogénesis GABAérgica con la colocalización EdU- $gad1b$ del $\approx 40\%$ a 8dpi. Sin embargo, la disminución gradual de esa colocalización y la presencia de células $EdU^+ND1^+gad1b^+$ puso en duda la hipótesis de neurogénesis GABAérgica y reforzó la hipótesis de *switch* fenotípico. Esta última se encuentra sustentada por múltiples trabajos, entre ellos, el trabajo de Roybon et al. (2010). Allí se mostró que la expresión ectópica de las proteínas NeuroD1/2 da como resultado la pérdida del fenotipo GABAérgico. Otro estudio de transgénicos doble *knockout* para neurogenina 1/2 en etapas tempranas del desarrollo mostró una mayor diferenciación cortical de neuronas GABAérgicas al inducirse la vía de *Mash1* e inhibirse totalmente la expresión de ND1 (Fode et al., 2000).

Es decir que puede suponerse que la cuantificación de NeuroD1 corresponde a la vía glutamatérgica mientras que $gad1b$ mostró como su expresión se fue inhibiendo gradualmente. En línea con esta idea, un estudio de transcriptoma de célula única y su linaje en el *pallium* del pez cebra mostró evidencia de que la mayoría de las neuronas generadas poseen los marcadores glutamatérgicos *slc16a6a* o *slc16a6b*, mientras que una porción más chica expresó los marcadores $gad1b/gad2$, concluyendo una identidad glutamatérgica del linaje palial marcado (Lange et al., 2020).

Para corroborar las hipótesis que se desprenden de los resultados planteados todavía queda mucho por hacer. El próximo paso debería consistir en hacer un seguimiento *in vivo* de células marcadas para evaluar que sucede. Alternativas para ello sería la conjugación de técnicas de marcado de CMNs -como el uso de retrovirus derivados del *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV), que ya ha sido empleado con éxito en pez cebra (Rothenaigner et al., 2011)- junto con técnicas de *imaging in vivo* como la que se propone para regiones dorsales del telencéfalo en el trabajo de Dray et al. (2015).

CAPÍTULO 4

Electrofisiología de células el *pallium* del pez cebra

Introducción

La actividad eléctrica de una neurona en proceso de diferenciación es esencial para su supervivencia e integración. Según las características que adopta durante su desarrollo puede integrarse y favorecer procesos de memoria y adaptación que le permiten ajustarse a un ambiente en constante cambio.

Numerosas líneas de investigación han caracterizado los procesos de maduración morfológica e integración funcional de neuronas nuevas en mamíferos adultos y han establecido los cambios que se producen en las distintas etapas de su desarrollo. Las CMNs del GD del hipocampo son un claro ejemplo de ello. Durante la primera semana de diferenciación las CMNs dan lugar a neuroblastos que migran radialmente a la capa de células granulares. En paralelo se van desarrollando las aferencias GABAérgicas, inicialmente despolarizantes, pero que luego de cambios en la expresión génica de canales pasan a tener carácter inhibitorio. Luego, durante la segunda y tercera semana, se desarrollan los axones y las dendritas en simultáneo con el establecimiento de aferencias excitatorias glutamatérgicas. A partir de ese momento y hasta la sexta semana la neurona nueva atraviesa un periodo en el cual ya está integrada sinápticamente y posee propiedades de membrana que la hacen más excitable. Durante esa fase las neuronas nuevas aún no se conectan con los circuitos de *feedback inhibition* y poseen menor umbral de disparo, siendo entonces el periodo crítico para la plasticidad sináptica. (Espósito et al., 2005; Mongiat et al., 2009; Mongiat and Schinder, 2011; Trinchero et al., 2019a).

De manera similar a lo que sucede en mamíferos, el pez cebra también incorpora neuronas nuevas durante su vida adulta, en distintas regiones del SN y las mismas se logran integrar anatómica y funcionalmente. Un estudio de *desarrollo temprano* realizado en el tectum óptico de larvas de pez cebra realizó la descripción completa de la morfología, identidad celular y el desarrollo funcional de las neuronas recién nacidas. Las células electroporadas en un estadio inmaduro temprano mostraron incorporación a circuitos funcionalmente maduros a 10 días post-electroporación y se identificaron tanto neuronas GABAérgicas como glutamatérgicas. (Boulanger-Weill et al., 2017).

En el telencéfalo adulto, en cambio, no hay suficiente evidencia sobre las características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas nuevas. El grupo de Rothénaigner et al. (2011) encontró que las neuronas recién nacidas marcadas con retrovirus maduran entre la cuarta y octava semana, momento en que logra integrarse funcionalmente a los circuitos locales. Morfológicamente encontraron que las neuronas inmaduras de 28dpi son de tamaño pequeño, tenían axones cortos y ya presentaban contactos SV2⁺ (de vesículas sinápticas). También registraron potenciales de acción espontáneos, que a dos semanas no se observaban pero sí a las siete semanas. Este resultado podría indicar tiempos de integración relativamente similares a los de roedores.

Es decir, es muy poco lo que se sabe actualmente sobre la caracterización morfológica y funcional de las neuronas nuevas en el telencéfalo del pez cebra adulto y se desconocen muchos de los mecanismos que subyacen a su diferenciación e integración.

Hipótesis y objetivo

Dado que la actividad posee un rol determinante en el desarrollo neuronal su caracterización es indispensable. Considerando los resultados obtenidos del Capítulo 3 y el conocimiento respecto a la posición de las CMNs y la hipótesis laminar se postula la siguiente hipótesis de esta Tesis doctoral:

La posición de las neuronas del *pallium* del pez cebra adulto refleja su edad y condición de madurez e integración circuital.

Es decir, en la presente sección se profundizará en el estudio de la distribución espacial de las células del *pallium* mediante el análisis de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas a distintas distancias de la ZPV. La evidencia previa permite hipotetizar que las células cercanas a la ZPV tendrán propiedades electrofisiológicas inmaduras y a medida que se aumente la distancia del ventrículo adquirirán características más maduras. A su vez, se espera obtener mayor información respecto de las subpoblaciones glutamatérgicas y GABAérgicas presentes en el *pallium*.

Estrategia experimental

Para el estudio funcional de las neuronas GABAérgicas se implementó la línea transgénica tg(gad1b:GFP) donde gad1b se encuentra fusionada al reportero fluorescente GFP. En cambio, para el estudio de células glutamatérgicas se utilizó la línea tg(NeuroD1:GCaMP6), donde la proteína calmodulina se encuentra fusionada a GFP en neuronas ND1⁺ y su unión a Ca²⁺ emite fluorescencia y permite medir actividad neuronal.

Para ambas líneas se realizaron preparaciones telencefálicas mediales *ex vivo* de 300 μ m de espesor (ver Figura 4.1 A). Dado que los peces transgénicos expresan proteínas fluorescentes en las células de interés se fueron seleccionando neuronas fluorescentes al azar, a distintas distancias de la ZPV del *pallium* y se midió la actividad poblacional a nivel de célula única en células gad1b⁺ y ND1⁺ mediante la técnica de *patch clamp*, *Voltage clamp* y *Current clamp*.

En todos los casos se registró propiedades pasivas de la membrana en la configuración de *Current clamp*: (a) resistencia de membrana en reposo (R_m), inversamente proporcional a la cantidad de canales iónicos abiertos en la membrana celular en reposo; (b) capacitancia de membrana (C_m), una medida proporcional del área del soma y las dendritas proximales y (c) el potencial de reposo (V_m) cuyo valor indica las concentraciones iónicas relativas y su permeabilidad.

También se midió propiedades activas, entre ellas los disparos de potencial de acción, de los cuales se cuantificó el umbral del pico del potencial de acción (PA_{umb}), la amplitud (PA_{amp}) frecuencia (PA_{frec}) y duración (APD), la amplitud del pico de *after hyperpolarization* (AHP_{amp}) y las corrientes de Na y K voltaje dependientes (I_{Na} y I_K). Otro método que se implementó para evaluar la conectividad sináptica de las neuronas fue el registro de corrientes post sinápticas excitatorias espontáneas (sEPSC), se cuantificó su frecuencia (sEPSC_{frec}) y amplitud (sEPSC_{amp}) (Sunstrum and Inoue, 2019). En la Figura 4.1 B-E se muestra un esquema de potencial de acción con las distintas mediciones realizadas.

4.1 Resultados

Propiedades funcionales de las neuronas GABAérgicas

En función de los resultados obtenidos previamente se decidió evaluar las características electrofisiológicas de las células GABAérgicas respecto de su distribución espacial desde la ZPV del *pallium*. Las células gad1b⁺ se detectaron por la presencia de fluorescencia GFP. Se definió la maduración neuronal como la capacidad de generar PA y en relación a ello se clasificó las células según la ausencia de PA (s/PA) o la presencia de disparos inmaduros (PA_{inm}) o maduros (PA). Se observó que las neuronas sin PA estaban cerca de la ZPV

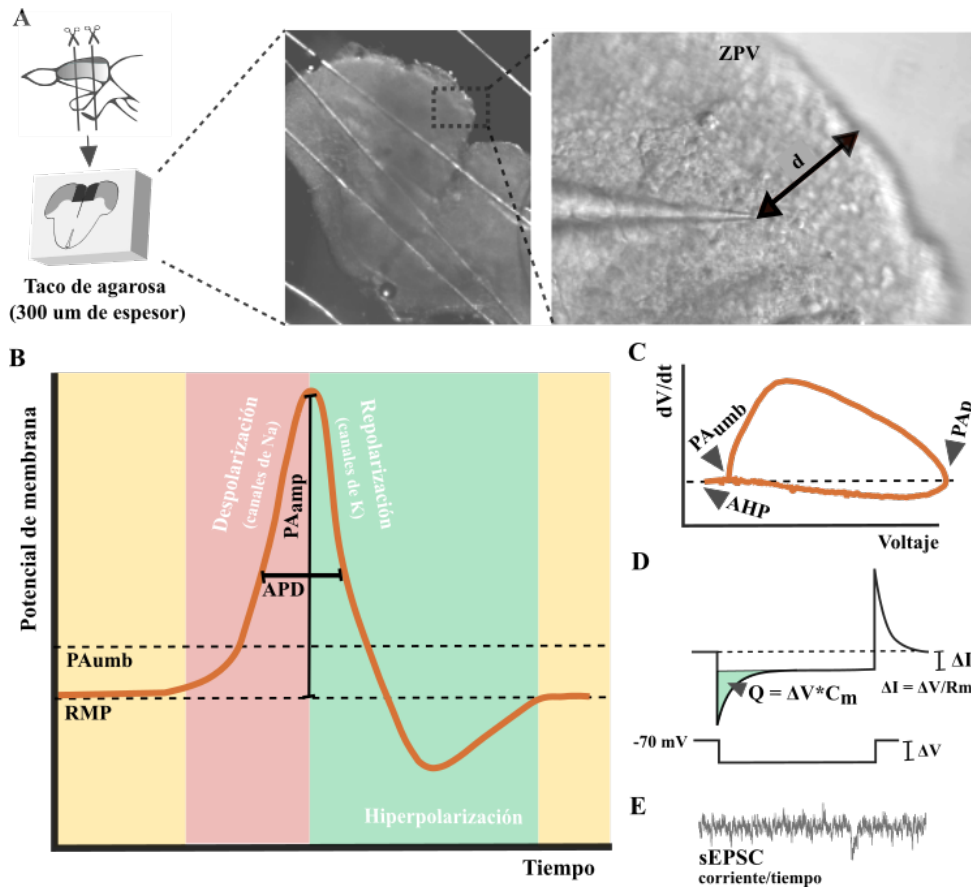


Figura 4.1: **Protocolo de registro electrofisiológico.** (A) Procedimiento experimental. Izquierda: vista esquemática sagital del cerebro del pez cebra indicando posición de corte del taco de agarosa (superior) para extraer región medial (inferior). Centro: imagen representativa del tejido. Derecha: imagen representativa del registro de *patch-clamp* en una célula de la región Dm medial, d : distancia de la ZPV. (B) Esquema de potencial de acción. La célula se encuentra en su potencial de membrana en reposo (RMP) hasta que se le administra un estímulo eléctrico. Allí se produce un aumento del potencial de membrana que si supera cierto umbral (PAumb) produce la apertura masiva de canales de Na^+ generando una rápida despolarización. Al alcanzar el pico máximo de potencial se cierran los canales de Na^+ y se abren los de K^+ generando la repolarización de la membrana que llegará por debajo del potencial de reposo, generando una hiperpolarización o *after hiperpolarization* (AHP). Los canales de K^+ se cierran y la célula vuelve a su RMP. (C) Diagrama de fases ($\partial V / \partial t$). Las medidas exactas del PAumb, AHP y PAp se toman del gráfico. (D) Protocolo de *Voltage clamp* del cual se toman las medidas de capacitancia (C_m) y resistencia (R_m) de membrana. (E) Imagen ilustrativa de corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas (sEPSC).

mientras que las de PA maduro se encontraban alejadas (ver Figura 4.2 A).

Propiedad	sin PA (6)	PA inmaduro (10)	PA maduro (7)
Rm ($M\Omega$)	940.5 ± 214.8	1160 ± 205.1	1698 ± 576.1
Cm (pF)	9.70 ± 1.82	10.25 ± 1.17	14.01 ± 3.18
Vm (mV)	$-41.00^{(a)} \pm 2.24$	-57.00 ± 1.73	$-57.86^{(a)} \pm 3.80$
INa (pA)	$-86.02^{(a)} \pm 26.6$	$-460.1^{(b)} \pm 88.03$	$-939.0^{(a,b)} \pm 99.99$
IK (pA)	315.7 ± 126.8	259.4 ± 30.88	331.7 ± 120.4
$sEPSC_{amp}$ (pA)	-5.82 ± 3.76	-15.13 ± 5.42	-13.37 ± 2.67
$sEPSC_{freq}$ (Hz)	1.08 ± 0.60	1.25 ± 0.46	2.59 ± 1.17
PA_{umb} (mV)	—	-41.47 ± 2.39	-38.33 ± 1.02
PA_{amp} (mV)	—	13.91 ± 3.46	26.33 ± 4.45
PA_{freq} (Hz)	—	17.83 ± 7.43	5.21 ± 2.79
AHP (mV)	—	-0.96 ± 0.65	-2.36 ± 0.74
APD ($msec$)	—	4.78 ± 1.06	4.08 ± 0.82

Cuadro 4.1: Los datos de las neuronas $gad1b^+$ se agruparon por condición de disparo de PA: las células sin PA (sin PA), las que presentaron PA inmaduro (PA inmaduro) y las que disparaban PA maduros (PA maduro). Se muestra el resumen de los valores obtenidos de las propiedades de las neuronas en valores de media $\pm$ SEM. El número de células analizadas se indica entre paréntesis. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn's post hoc. (a) * $p < 0,05$; (b) **** $p < 0,0001$. Los datos de cada célula individual pueden observarse en el Apéndice A.6.

Propiedades pasivas y espontáneas de la membrana

Al observar las propiedades de reposo de la célula se obtuvieron resultados variables, pero en su mayoría las propiedades mostraron un perfil de maduración que correlaciona con la posición. La Rm fue muy variable en las distintas profundidades del *pallium* y para las distintas condiciones de madurez (media: s/PA, $940.5 M\Omega$ - PA, $1698 M\Omega$; rango, 278 - $4469 M\Omega$). La Cm , en cambio, mostró una tendencia al aumento en función de la distancia y del proceso de maduración (media: s/PA, $9.7 pF$ - PA, $14.01 pF$; rango; 4.6 - $28 pF$). El Vm presentó una disminución significativa con la madurez (media: s/PA, $-41 mV$ - PA, $-57.86 mV$; rango, -35 a $-70 mV$), siendo mayor en la zona más cercana a la ZPV. Estos resultados en conjunto pueden observarse en la Figura 4.2 B, Tabla 4.1.

Al evaluar las corrientes de Na^+ y K^+ , así como también las EPSCs en las distintas posiciones se obtuvieron resultados similares. Se encontraron diferencias significativas para las I_{Na} que presentaron una disminución con la profundidad y la condición de madurez (media: s/PA, $-86.02 pA$ - PA $-939.0 pA$; rango, -20 a $-1209 pA$) mientras que las I_K no presentaron diferencias estadísticas pero si una tendencia a aumentar con la profundidad y madurez (ver Figura 4.2C, Tabla 4.1). Al evaluar las corrientes excitatorias post sinápticas espontáneas (EPSCs) se observó que la amplitud mostró mucha variabilidad con la posición y madurez mientras que la frecuencia sí evidenció una tendencia a aumentar (media: s/PA, $1.08 Hz$ - PA, 2.59 ; rango, 0 a $7.3 Hz$), como se puede ver en la Figura 4.2D, Tabla 4.1.

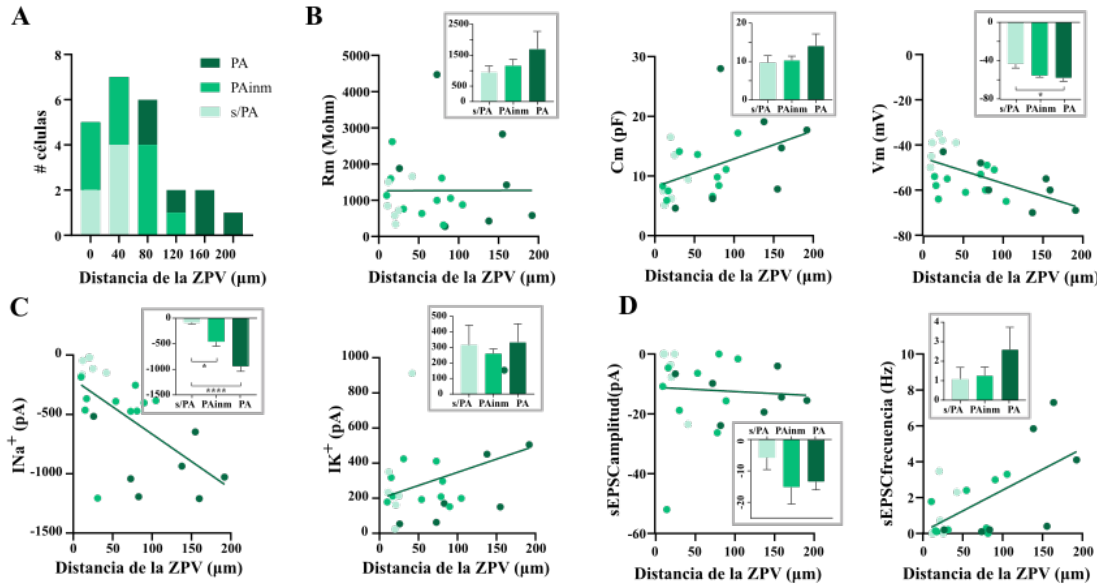


Figura 4.2: **Propiedades pasivas y espontáneas de células $gad1b^+$ en el *pallium* del pez cebra.** (A) Distribución de neuronas registradas en la línea transgénica $tg(gad1b:GFP)$ en función de su posición respecto a la ZPV y de su capacidad de disparo de PA. (B) Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades pasivas de la membrana: resistencia de membrana en reposo (R_m), capacitancia de membrana (C_m) y potencial de reposo (V_m). (C) Corrientes de sodio (I_{Na}) y potasio (I_K). (D) Amplitud (izquierda) y frecuencia (derecha) de EPSCs. Test I_{Na} y V_m : Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: V_m : s/PA - c/PA, $St=8.93$ y $pv=0.036$. I_{Na} : s/PA - PA_{imm} , $St=8.60$ y $pv=0.0281$ y PA_{imm} - c/PA: $St=15.64$, $pv=0.00001$. $n_{total}=23$ - $n_{s/PA}=6$ - $n_{PA_{imm}}=10$ - $n_{c/PA}=7$.

Propiedades del PA

Al analizar las propiedades de las células que dispararon PA se obtuvieron resultados similares a lo visto para las propiedades pasivas. El umbral de disparo mostró valores dispersos tanto para neuronas maduras como inmaduras, con una distribución espacial que va desde la ZPV, con características inmaduras, hacia el parénquima con características más maduras (media: PA_{imm} , -41.47 mV - PA, -38.33 mV; rango: -34.3 a -55.2 mV). La amplitud del pico mostró valores significativamente mayores en neuronas maduras, sin patrón aparente en la distribución espacial (media: PA_{imm} , 13.91 mV - PA, 26.33 mV; rango: 7.5 a 48.5 mV). Por su parte, la frecuencia de PA mostró una tendencia a disminuir con el nivel de madurez y a mayor profundidad del parénquima (media: PA_{imm} , 17.83 Hz - PA, 5.21 Hz; rango: 1.0 a 68.6 Hz). Estos resultados pueden observarse en la Figura 4.3 A, Tabla 4.1.

Por otro lado, no se observó variación en la duración de los PA con la posición en el *pallium* ni la condición de madurez (media: PA_{imm} , 4.78 msec - PA, 4.08 msec; rango: 1.7 a 12.70 msec). Al observar los picos de *after hyperpolarization* se encontró mucha variabilidad, con una tendencia (no significativa) a disminuir con la madurez y el incremento de la distancia de la ZPV (media: PA_{imm} , -0.96 mV - PA, -2.36 mV; rango, -5.2 a 0 mV). Los datos se pueden ver en la Figura 4.3 C o en la Tabla 4.1.

Es decir, la respuesta eléctrica de las células GABAérgicas respecto a los estadios de

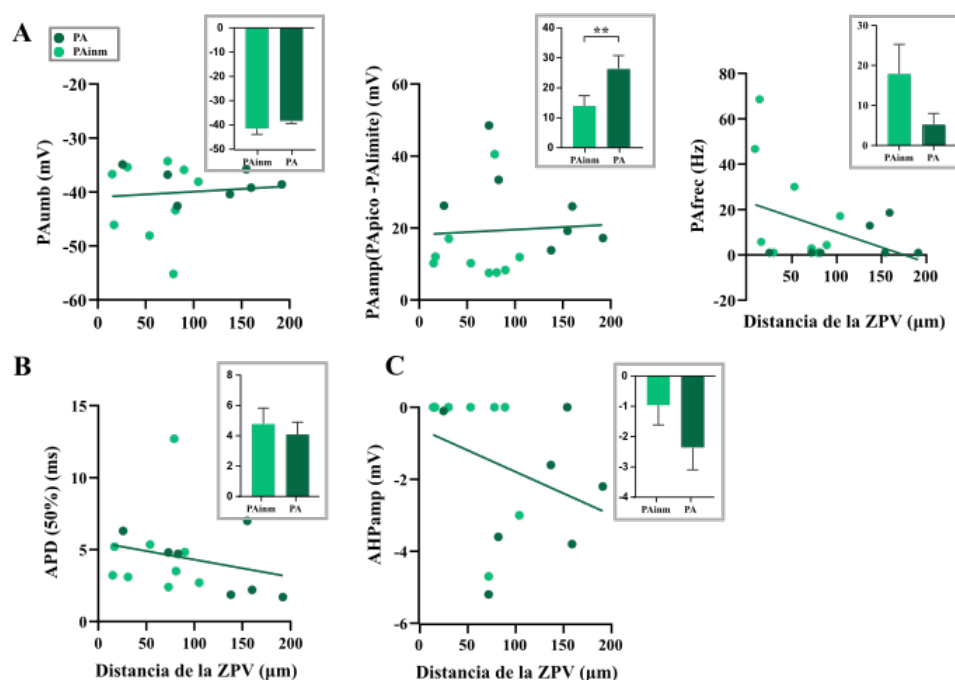


Figura 4.3: **Propiedades activas de células *gad1b*⁺ en el *pallium* del pez cebra.** Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades de disparo de PA de la membrana. (A) Umbral (izquierda, PAumb), amplitud (centro, PAamp) y frecuencia (derecha, PAfrec) de disparo de PA. (B) Duración del PA (APD). (C) Amplitud de la *After hyperpolarization* (AHPamp). Test I_{Na} y V_m : Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: PAamp: PA_{inn} - PA, $St=7$ y $p_v=0.0073$ $n_{total}=17$ - $n_{PA_{inn}}=10$ - $n_{PA}=7$.

maduración y su posición pareciera mostrar un patrón acorde a lo esperado respecto a la posición de las células medidas y su condición de madurez. Se observa una tendencia a características inmaduras en la ZPV y maduras lejos de la misma, resultado que se ve reflejado estadísticamente en el V_m y en la I_{Na} . Los otros parámetros probablemente requieran de un aumento del n muestral para mostrar el mismo patrón dado que la variabilidad de estado de maduración de las células medidas puede estar interfiriendo.

Propiedades funcionales de las neuronas glutamatérgicas

Con el objetivo de caracterizar también la neurogénesis adulta excitatoria se evaluaron las características electrofisiológicas de las células glutamatérgicas en relación con su distancia a la ZPV. Las células *ND1*⁺ se detectaron por expresión de fluorescencia de GFP y, al igual que las células GABAérgicas, se clasificaron en función de su disparo de PA. A excepción de una célula, todas registraron PA maduros (ver Figura 4.4 A).

Propiedades pasivas y espontáneas de la membrana

Se registraron células en distintas posiciones del *pallium* y, si bien todas se definieron como maduras, no mostraron patrones de respuesta esperados para las propiedades pasivas. Tanto la R_m , la C_m como el V_m presentaron valores muy dispersos. La R_m mostró una tendencia

Propiedad	sin PA (1)	PA maduro (6)
Rm ($M\Omega$)	229.00 $\pm$.00	531.00 $\pm$ 119.80
Cm (pF)	10.30 $\pm$.00	20.57 $\pm$ 2.98
Vm (mV)	-58.00 $\pm$.00	-70.48 $\pm$ 2.78
INa (pA)	2.60 $\pm$.00	1250.00 $\pm$ 455.30
IK (pA)	271.1 $\pm$.00	171.40 $\pm$ 19.92
$sEPSC_{amp}$ (pA)	-5.4 $\pm$.00	-7.82 $\pm$ 1.35
$sEPSC_{freq}$ (Hz)	0.1 $\pm$.00	0.29 $\pm$ 0.1
PA_{umb} (mV)	—	-32.98 $\pm$ 0.93
PA_{amp} (mV)	—	46.70 $\pm$ 2.91
PA_{freq} (Hz)	—	6.27 $\pm$ 1.27
AHP (mV)	—	-4.94 $\pm$ 0.77
APD (mseg)	—	4.52 $\pm$ 0.56

Cuadro 4.2: Los datos de las neuronas ND1⁺ se agruparon por condición de disparo de PA: la célula sin PA (sin PA) y las que disparaban PA maduros (PA maduro). Se muestra el resumen de los valores obtenidos de las propiedades de las neuronas maduras en valores de media $\pm$ SEM. El número de células analizadas se indica entre paréntesis. Debido a falta de n muestral no se realizaron análisis comparativos entre grupos. Los datos de cada célula individual pueden observarse en el ApéndiceA.7.

a aumentar con la distancia de la ZPV, resultado contrario al que se hubiera esperado (media: 531 $M\Omega$; rango, 172-884.2 $M\Omega$). En cambio, la Cm y el Vm mostraron la tendencia esperada: una disminución con la posición (media Cm : 20.57 pF, rango: 11.1-29.6 pF; media Vm : -70.48 mV, rango: -80 a -59 mV). Estos resultados en conjunto pueden observarse en la Figura 4.4 B, Tabla 4.2.

Al evaluar las I_{Na} y I_K los valores presentaron menos dispersión y no presentaron tendencias respecto de la posición (media I_{Na} : -1250 pA, rango de -3113 a -445.8 pA; media I_K : 171.4 pA, rango de 127 a 258.6 pA), como se puede observar en la Figura 4.4 C, Tabla 4.2. Al observar las EPSCs, tanto la amplitud (media: -7.82 ; rango -9.63 a -3.9) como la frecuencia (media: 0.29 Hz; rango de 0.1 a 0.55 Hz) mostraron una tendencia a disminuir o aumentar con la posición, respectivamente (ver Figura 4.4 C, Tabla 4.2).

Propiedades del PA

Al analizar las propiedades de las células glutamatérgicas que dispararon PA se obtuvieron resultados similares a lo visto para las propiedades pasivas. El umbral de disparo mostró valores similares en las distintas posiciones del *pallium* (media: -32.98 mV; rango: -36.3 a -26.5 mV). Lo mismo sucedió con la amplitud del pico, sin patrón aparente en la distribución espacial (media: 46.7 mV; rango: 32.69 a 63.6 mV). Por su parte, cerca de la ZPV la frecuencia de PA mostró mucha dispersión, que se fue estabilizando al alejarse (media: 6.27 Hz; rango: 0.00 a 16.6 Hz). Estos resultados pueden observarse en la Figura 4.5 A, Tabla 4.2.

Luego, al analizar la duración de los PA (APD) con la posición en el *pallium* no se observó ninguna tendencia y los valores fueron muy dispersos (media: 4.52 mseg; rango: 1.87

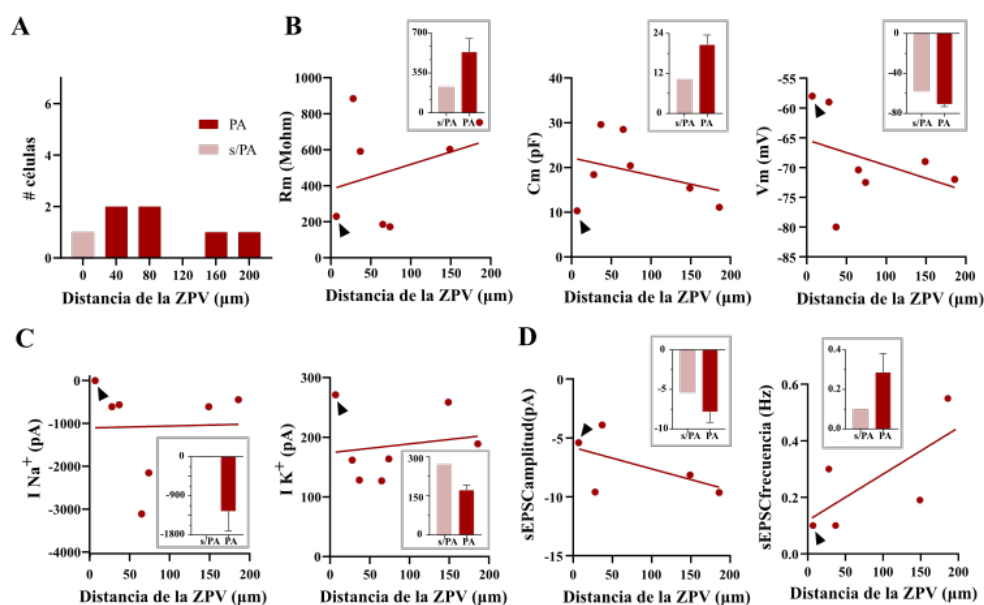


Figura 4.4: **Propiedades pasivas y espontáneas de células ND1⁺ en el *pallium* del pez cebra.** (A) Distribución de neuronas registradas en la línea transgénica tg(NeuroD1:GCaMP6f), en función de su posición respecto a la ZPV y de su capacidad de disparo de PA. (B) Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades pasivas de la membrana: resistencia de membrana en reposo (R_m), capacitancia de membrana (C_m) y potencial de reposo (V_m). (C) Corrientes de sodio (I_{Na^+}) y potasio (I_{K^+}). (D) Amplitud (izquierda) y frecuencia (derecha) de EPSCs. Flecha negra: célula registrada que no presente disparo de PA. Ajuste a regresión lineal simple: no significativos. $n_{s/PA}=1$ - $n_{PA}=6$

a 7.4 mseg). Los picos de *after hyperpolarization* mostraron una disminución significativa con la distancia (media: -4.94; rango, -8.7 a 0 mV), es decir, un incremento de este tipo de respuesta a mayor distancia de la ZPV lo que podría indicar mayor madurez a más distancia. Los datos se pueden ver en la Figura 4.5C o en la Tabla 4.2.

En resumen, los valores obtenidos no parecen representar las propiedades de una población en su mayoría madura. La dispersión de los datos puede deberse al submuestreo y a la presencia de neuronas en distintos estadios de maduración, lo cual se ve representado en el resultado obtenido para AHP.

4.2 Discusión y conclusiones

La descripción del desarrollo electrofisiológico de las neuronas nuevas es importante para una caracterización completa de la neurogénesis adulta en el *pallium* del pez cebra. Si bien existe evidencia previa, la misma refiere a etapas del desarrollo neuronal en edades tempranas y la expresión de marcadores del desarrollo pero aún no se ha comenzado a caracterizar la integración funcional de las mismas. En ese contexto, los resultados presentados son la primer descripción de las propiedades fisiológicas de neuronas excitatorias e inhibitorias en

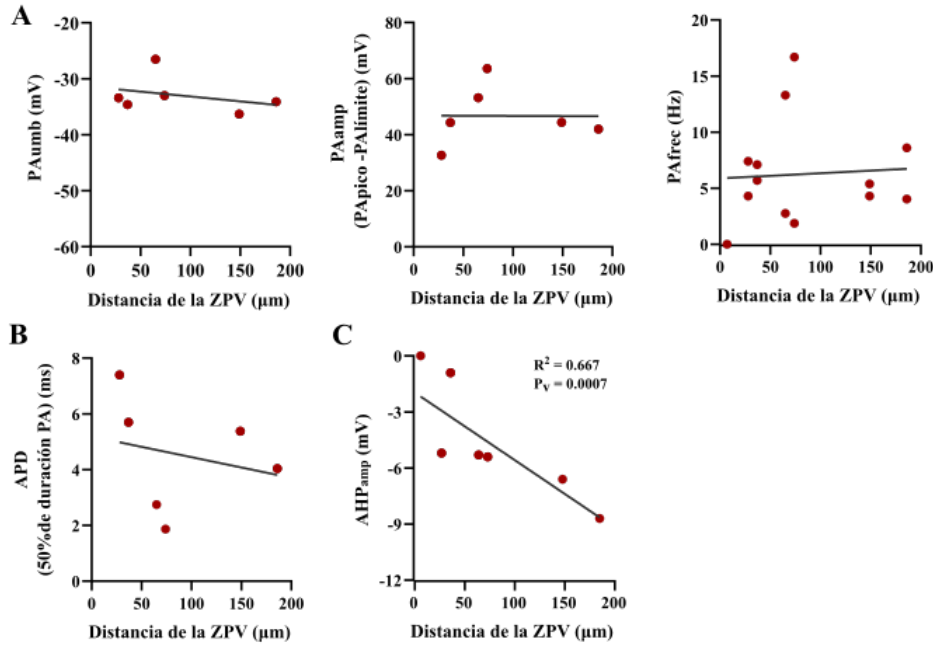


Figura 4.5: **Propiedades activas de células ND1^+ en el *pallium* del pez cebra.** Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades de disparo de PA de la membrana. (A) Umbral (izquierda, PAumb), amplitud (centro, PAamp) y frecuencia (derecha, PAfrec) del disparo de PA. (B) Duración del PA (APD). (C) Amplitud de la *After hyperpolarization* (AHPamp). Regresión lineal AHP: $R^2=0.667$, $P_V=0.0007$. $n_{\text{total,PA}}=6$

el *pallium* del pez cebra adulto.

Para la medición electrofisiológica de células GABAérgicas y glutamatérgicas se utilizaron exitosamente las líneas transgénicas *tg(gad1b:GFP)* y *tg(NeuroD1:GCaMP6f)*, respectivamente. Estas líneas habían sido implementadas previamente en una amplia diversidad de estudios cuyos objetivos fueron la visualización de la función neuronal y su regulación o la búsqueda de correlatos comportamentales en la actividad neuronal, entre otros (Brenet et al., 2019; Kim et al., 2019; Liao et al., 2019; Rupprecht et al., 2016).

Evidencia previa de registros electrofisiológicos en *cell attached* de CMNs marcadas seguidas en el tiempo mostraron respuestas funcionales maduras a 7 semanas de edad (Rothenaigner et al., 2011). Por ello es importante considerar que los registros celulares analizados en el presente trabajo corresponden a células en estadios de diferenciación muy amplios. Esto se refleja al observar los resultados presentados en el Capítulo 3-Sección Posicionamiento laminar. Allí se observó que en la región medial del telencéfalo las células marcadas a 64 dpi se ubicaron entre los 0 y los $28,6 \mu\text{m}$, con lo cual la mayoría de las células registradas electrofisiológicamente, al estar fuera de ese rango, son preexistentes o generadas en etapas anteriores del desarrollo. Es decir, la dispersión observada en las distintas propiedades funcionales podría tener ese fundamento y por ello las tendencias reales quedan enmascaradas. Alternativas para resolver eso serían (a) el marcado de sucesivas cohortes de la misma edad para comprender la dinámica funcional y espacial de incorporación o (b) incrementar el

tamaño muestral de los registros para lograr diferenciarlas en función de sus propiedades.

Propiedades pasivas y espontáneas de la membrana

Dado que se conoce ampliamente el proceso de neurogénesis adulta de roedores, se esperaba una recapitulación similar en el pez cebra. El estudio de las propiedades eléctricas de células *gad1b*⁺ mostró resultados consistentes aunque no definitivos respecto a la condición de madurez o inmadurez en las distintas posiciones del *pallium*. El *V_m* se hiperpolariza en función de ambos parámetros (madurez y posición), reflejando un incremento de la expresión y desarrollo de canales y bombas de iones a mayor profundidad del tejido, tal como se esperaba. La *I_{Na}* también refleja dicha tendencia, mostrando indirectamente un incremento de la expresión de canales voltaje dependientes de *Na*⁺ a medida que la célula madura. Al observar las EPSCs, sabiendo que su frecuencia aumenta con la madurez neuronal, se puede inferir que hay menor maduración en la ZPV y mayor hacia dentro del parénquima.

Por su parte, las propiedades pasivas de las células glutamatérgicas no fueron concluyentes. Por un lado, como se mencionó previamente, es necesario incrementar el *n* muestral para obtener propiedades más consistentes. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las células ND1 medidas fueron reconocidas por actividad del mecanismo GCaMP6. Este consiste en un incremento de la fluorescencia en función del incremento de *Ca*²⁺ en el interior de la célula. Esto podría estar justificando el hecho de que en su mayoría hayan sido neuronas maduras las que se midieron pero, a su vez, habla de células, que al momento de ser registradas estaban comprometidas en una respuesta neuronal y quizás eso dio lugar a la variabilidad observada.

Propiedades del PA

Al observar las características activas de las neuronas los resultados también se mostraron coherentes con la hipótesis planteada. En primer lugar, la distribución de las neuronas GABAérgicas en función de su disparo de PA mostró la relación esperada: cerca de la ZPV estaban las células inmaduras o sin PA, luego seguían las de PA inmaduro hacia dentro del parénquima y a mayor distancia se encontraban las células maduras o con PA maduro. La amplitud del PA reflejó esta tendencia y los otros parámetros también pero en menor medida.

Para el caso de las células glutamatérgicas nuevamente los datos mostraron mucha dispersión. Los valores de AHP siguieron la tendencia esperada en función de la distancia pero los otros parámetros no fueron concluyentes.

Sin embargo, al analizar en mayor profundidad la frecuencia de disparos de PA de ambas poblaciones neuronales surgió un nuevo análisis. En la Figura 4.6 A,B,B' puede observarse que las neuronas GABAérgicas poseen uno o múltiples disparos en toda la distribución del *pallium*, ya sea en los primeros 100 μ m o por fuera de ellos e independientemente de la condición de madurez (observar fracciones de las barras). Sin embargo, las que se ubican a más de 100 μ m son células en su mayoría maduras y por la posición deben haber sido generadas en las primeras etapas del desarrollo. Por otro lado, al observar las neuronas glutamatérgicas en la Figura 4.6 A,C se ve que todas presentaron disparos múltiples. Entonces,

¿podrá ser que las células $gad1b^+$ inmaduras con múltiples disparos y ubicadas a menos de 100 μm sean una subpoblación de células glutamatérgicas inmaduras que expresan $gad1b$, tal como se había planteado en el Capítulo 3? La colocación de ambas marcas expuesta en dicho capítulo contribuye a esa idea (ver figura 3.15).

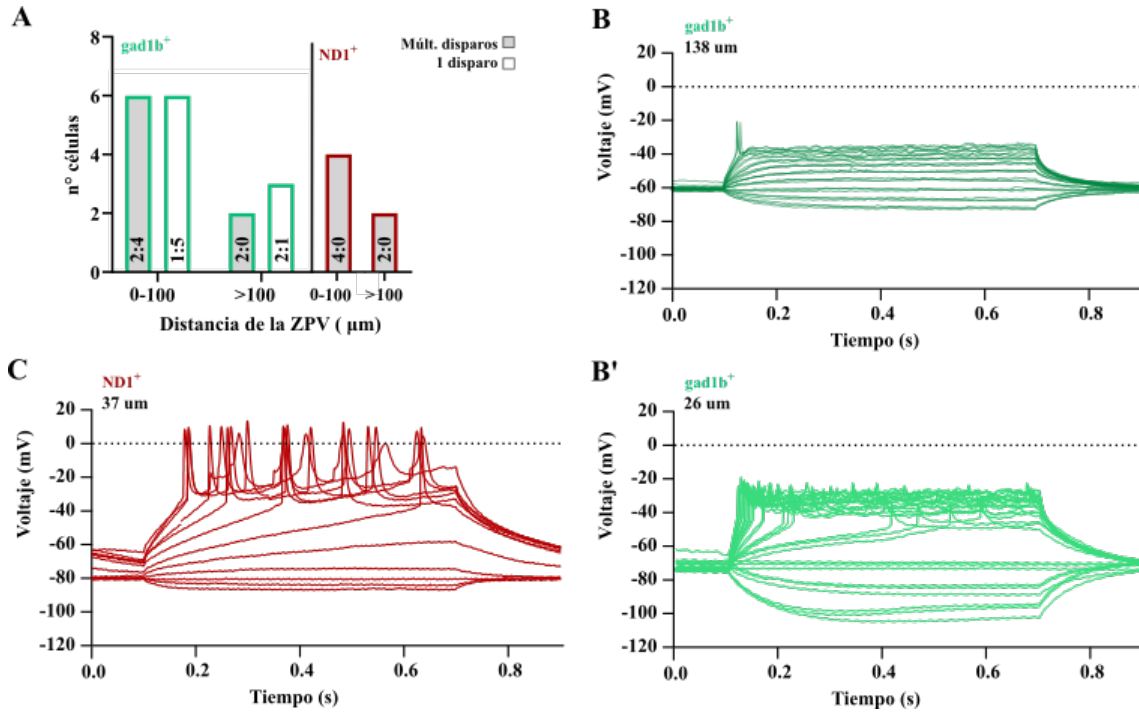


Figura 4.6: **Frecuencia de disparos de PA en células GABAérgicas y glutamatérgicas.** (A) Número de células registradas ($gad1b^+$ y $ND1^+$) en función de la posición (próximas a la ZPV -0 a 100- o alejadas -<100-) que presentaron uno o múltiples disparos de PA. Proporciones: neuronas maduras:inmaduras. (B-C) Pasos de voltaje depolarizante (10mV) evocan diferente respuesta según fenotipo neuronal y posición en la ZPV: neurona GABAérgica alejada (B) o cercana a la ZPV (B') y neurona glutamatérgica (C). Trazos completos en ApéndiceA.5.

Es decir, se retoma la hipótesis de expresión temprana de $gad1b$ en neuronas glutamatérgicas que luego se inhibe por la vía de NGN2. Podría interpretarse entonces la existencia de diversas subpoblaciones $gad1b^+$ registradas: las completamente diferenciadas (provenientes de CMNs del *subpallium* en etapas tempranas del desarrollo) con 1 o múltiples disparos de PA y las que dan lugar a neurogénesis glutamatérgica en cuanto se inhibe la expresión de $gad1b$.

Actualmente se está realizando un análisis de datos de RNAseq extraídos del trabajo de Lange et al. (2020) que podría fortalecer esta hipótesis. En dicho trabajo se realizó una caracterización de CMNs paliales y su progenie en función de la expresión génica, estableciendo subpoblaciones de células en proceso de diferenciación del *pallium* del pez cebra. La información del transcriptoma (de libre acceso) se está utilizando para analizar la expresión de ambos marcadores ($gad1b$ y $ND1$) en las células de interés.

CAPÍTULO 5

Modulación de las zonas proliferativas de *pallium*

Introducción

La neurogénesis adulta es un proceso susceptible de ser modulado por condiciones internas o externas al animal, es decir, puede aumentar o disminuir según la exposición a determinados ambientes o entornos fisiológicos. A continuación se explorarán algunos de los moduladores de la neurogénesis adulta más estudiados.

Ambiente físico

Un ambiente enriquecido (AE) puede ser entendido como un contexto físico estimulante a escala motriz, sensorial, cognitiva y social. Múltiples estudios en roedores han analizado los beneficios que trae este tipo de ambiente, debelando las regiones cerebrales que se activan y los procesos fisiológicos que se modifican en respuesta a esos estímulos. Se observó que solo una semana de exposición a AE es suficiente para incrementar la neurogénesis en el hipocampo de roedores, mediante un incremento tanto de la proliferación de CMNs como de la maduración neuronal (Deng et al., 2010; Kempermann et al., 1997; Pérez-Martín et al., 2016). Estudios de dinámica temporal revelaron que 21 días de exposición a este ambiente es suficiente para producir una aceleración del crecimiento dendrítico (por ejemplo su longitud) y el número de espinas dendríticas (Trinchero et al., 2017).

Otros estudios han demostrado que la experiencia del AE promueve la integración de nuevas neuronas inmaduras a través de la activación de células parvalbúmina, un tipo de interneurona (Alvarez et al., 2016). Se sabe que en mamíferos las interneuronas parvalbúmina⁺ (PV) participan en el desarrollo de nuevas neuronas en el hipocampo de ratones adultos, ya que al ser activadas liberan GABA, el cual causa una despolarización en progenitores neurales y así juegan un rol de intermediarias entre la actividad de la región y la neurogénesis (Song et al., 2013). En consecuencia, se ha reportado que animales expuestos a AE poseen mejor desempeño cognitivo. Ratones expuestos a AE y luego a un entrenamiento en MWM mostraron un mejor desempeño en este último, disminuyendo de la latencia y la distancia recorrida (Nilsson et al., 1999; Van Praag et al., 1999).

Para el caso de peces, la dinámica neurogénica no ha sido muy estudiada en contexto de AE (Dunlap, 2016). Un estudio reporta un aumento de la proliferación en todo el telencéfalo en condiciones de AE (von Krogh et al., 2010) pero todavía quedan muchas preguntas por responder.

Ambiente social

En el otro extremo de la dinámica estudiada por exposición a AE está la restricción social (RS). La capacidad de adaptarse a entornos sociales es una característica esencial de distintos sistemas biológicos y es sabido que el entorno social modula las tasas proliferativas y neurogénicas. En mamíferos se ha observado que el AS postembrionario o adulto genera una disminución de la tasa de proliferación y de la neurogénesis en el hipocampo asociado a un incremento del cortisol en sangre, es decir, se genera una respuesta fisiológica asociada al estrés (Schoenfeld and Gould, 2012). También se ha observado que este tipo de respuesta fisiológica no es fácilmente reversible por exposición a estímulos que incrementan la neurogénesis. En ratas la actividad física no revierte el efecto proliferativo del aislamiento, mientras que una exposición a AE restaura la condición de estrés, pero sólo a escala hormonal hipofisiaria (Leasure and Decker, 2009; Veena et al., 2009). Un dato importante es que los distintos paradigmas implementados para evaluar la modulación contextual y social de la neurogénesis modulan sólo la ZSG del GD pero no la ZSV. Esta sólo se ve afectada por exposición a enriquecimiento olfativo (Rochefort et al., 2002). Estos datos indican la especificidad del proceso de modulación en relación a la función de la región.

En peces la modulación producida por el AS es muy variable y esto se debe, en parte, a la diversidad de organización social entre las especies (Dunlap et al., 2013; Maruska et al., 2019). En trucha arcoíris, se observó que el AS disminuye la neurogénesis en la región Dm del telencéfalo y también impacta en el rendimiento en una tarea de evitación activa (Ausas et al., 2019). En el pez cebra un trabajo mostró las diferencias producidas por el AS según si se aplicaba durante el desarrollo o de manera aguda en la adultez. Se observó que los nichos que residen en las estructuras sensoriales son más sensibles a los cambios en el contexto social durante el desarrollo y que disminuye la cantidad de células en proliferación mientras aumenta la cantidad de neuronas recién nacidas. En cambio, individuos adultos

con exposición aguda al AS mostraron que las regiones telencefálicas dorsal-rostral y Dl no mostraban cambios en la proliferación pero si generaban un aumento en la integración de nuevas neuronas. También encontraron que la exposición posterior a enriquecimiento social revirtió el efecto en forma región-dependiente. La región dorsal recupero los niveles de proliferación mientras que Dl no (Lindsey and Tropepe, 2014).

Hipótesis y objetivos

La neurogénesis adulta es un fenómeno dinámico sensible a diferentes estados fisiológicos. Sin embargo, en la actualidad se desconocen, entre otras cosas, los focos de activación de las regiones moduladas. Es por ello que se propone la siguiente hipótesis:

La actividad sostenida de las regiones Dm y Dl del *pallium* modula los procesos de sobrevida y autorrenovación de CMNs en el pez cebra adulto expuesto a ambiente enriquecido o restricción social.

Entonces, se estudiará cómo la neurogénesis adulta del *pallium* del pez cebra puede verse modulada por diversos estímulos conductuales. Se evaluará si peces mantenidos en condiciones de restricción social o ambiente enriquecido varían los niveles de autorrenovación y sobrevida de las CMNs, cuantificando la expresión de PCNA y EdU en la ZPV del telencéfalo.

Estrategia experimental

Se expuso a condiciones de restricción social y ambiente enriquecido a peces *wild type* AB de 12 meses de edad, mantenidos en condiciones normales de cría y contexto social hasta el momento de iniciado el experimento. Se marcó las CMNs en proliferación con EdU (como se describe en la sección 2.3) y se mantuvo a los peces durante 32 dpi en las condiciones experimentales que se describen a continuación.

Modulación ambiental. Los peces se mantuvieron en menor densidad respecto de las condiciones de cría (a razón de 1 pez/0.75 lts H₂O) y en un ambiente enriquecido con sustrato, plantas artificiales y otros objetos (como se muestra en la Figura 5.1B).

Modulación social. Los peces se mantuvieron en peceras individualizadas (1 pez/1.4 lts H₂O) con barreras a ambos lados de la pecera para evitar el estímulo visual de conespecíficos (como se muestra en la Figura 5.1C).

En ambos casos se utilizó como control a peces que se mantuvieron en condiciones de

cría (aproximadamente 1 pez/0.350 lts H₂O) como se muestra en la Figura 5.1D. Finalizado el tiempo de tratamiento, se sacrificó a los tres grupos experimentales para evaluar el efecto que produjeron sobre el proceso de neurogénesis.

Debido a los resultados presentados en el Capítulo 3 acerca de la proliferación (PCNA), la supervivencia (EdU) y la neurogénesis a los 32 días, se optó por centrarse exclusivamente en el seguimiento de las marcas de EdU y PCNA. Es decir, debido a que aproximadamente el 90 % de las células marcadas con EdU que habían sobrevivido después de un mes colocalizaban con ND1, se consideró a esa marca como generación de nuevas neuronas glutamatérgicas. Y, por otra parte, la marca de PCNA en condiciones control disminuyó para ese mismo punto temporal. En este contexto, se llevará a cabo la evaluación de la sobrevivencia de las células marcadas con EdU⁺, entendiéndola como neurogénesis glutamatérgica, y se examinará la proliferación de las CMNs del telencéfalo.

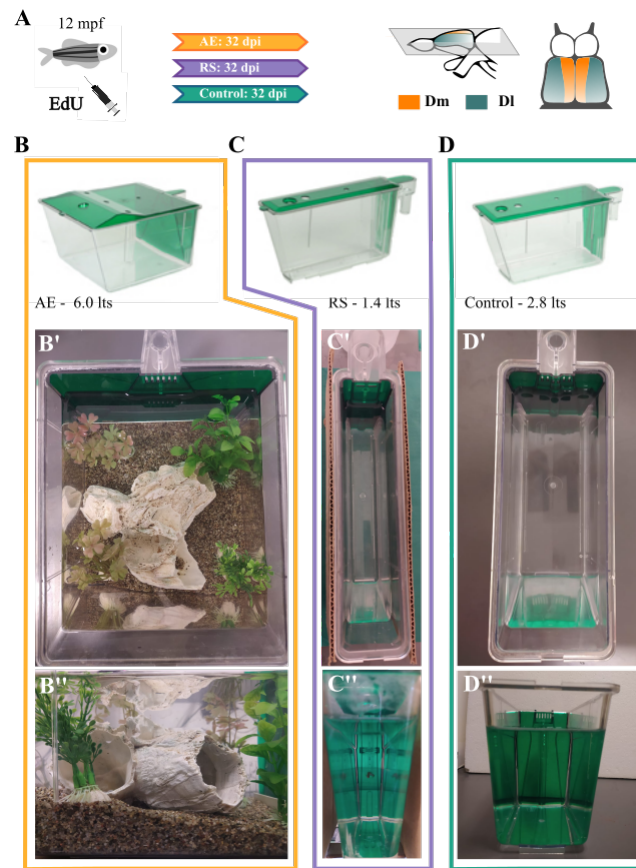


Figura 5.1: **Protocolo de modulación de las zonas proliferativas del *pallium* del pez cebra.** Los peces fueron expuestos durante un mes a distintos tratamientos luego de haber sido inyectados con EdU (A, panel izquierdo) y luego se procesó el cerebro entero mediante técnicas inmunohistoquímicas para evaluar diferencias en regiones Dm y Dl del *pallium* (A, panel derecho). Durante el tiempo de tratamiento se los mantuvo en condiciones de ambiente enriquecido (B, B', B''), restricción social (C, C', C'') o en condiciones control (D, D', D''). Dm: dorso-medial, Dl: dorso-lateral.

Procesamiento de imágenes

Como ya se observó en el Capítulo 3, la disposición espacial de la progenie de CMNs marcada y la deposición laminar cercana a la ZPV hace posible la observación y el estudio de las regiones Dm y Dl del *pallium* del telencéfalo con una vista dorsal. Las herramientas microscópicas adecuadas para tomar imágenes confocales y la implementación de técnicas de aclarado del tejido hicieron posible la observación de capas celulares superficiales y parénquimáticas sin necesidad de realizar cortes coronales. Por ello la caracterización se realizó con el cerebro entero y se tomaron imágenes correspondientes a las marcas de EdU⁺ y PCNA⁺ desde la superficie del *pallium* y hasta 200 μ de profundidad.

Dado que existe variación tanto en el tamaño del pez como en las dimensiones del telencéfalo de los distintos peces se realizó un ajuste de la distancia considerada en profundidad (μ m) para cada telencéfalo. Se midieron las dimensiones del ancho del telencéfalo (a la altura donde comienza la comisura o surco ipsiliforme en la región medial) y las dimensiones estándar publicadas en el Atlas de Wullimann et al. (1996). Se seleccionó el telencéfalo más grande y se midió la proporción de Dm a la que se llegaba con 200 μ m. Con esa información se determinó una profundidad del 95 % de Dm para todos los peces (protocolo descrito en la Figura 5.2). De esta manera, cuantificando sobre la misma proporción del telencéfalo en todos los peces, se logró evitar sesgos de profundidad. Por último, se realizó una proyección ortogonal del *stack* de fotos y se registraron las coordenadas (x_i, y_i) de cada una de las células EdU⁺ o PCNA⁺.

Para la búsqueda de diferencias entre regiones anatómicas del *pallium* se definieron los parámetros indicados en la Tabla 5.1. En la Figura 5.3A puede observarse cada uno de dichos parámetros y la nube de puntos generada de la cuantificación de EdU, a modo de ejemplo. Luego se ajustó la nube de puntos mediante la implementación de la siguiente fórmula:

$$f(x_i, y_i) = \cos(\alpha_{\text{rad}})(x_i - x_m) - \sin(\alpha_{\text{rad}})(y_i - y_m) = x_j, y_j$$

y así se generó una rotación de los puntos en el eje x, y para que sea más simple el procesamiento comparativo de regiones. Se asumió que no había variación en el eje z ya que todos los cerebros se posicionaron sobre el cubreobjetos antes de ser fijados con agarosa.

Entonces, se obtuvo una nube de puntos homogénea a partir de la cual se realizó la subdivisión por áreas y la posterior cuantificación. De esta manera se alinearon todos los hemisferios telencefálicos a la posición (x_c, y_c) y se los rotó de manera que coincidieron en el eje rostro-caudal y la línea interna del hemisferio, como se ve en la Figura 5.3 C.

Luego se analizó la matriz de puntos completa mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para comparar tratamiento *vs* control para ambos ejes. Posteriormente se dividió el telencéfalo en 20 regiones (4 subdivisiones en el eje latero-medial -dos antes de la comisura y dos después- y 5 en el rostro-caudal) como se muestra en la Figura 5.3D y se realizó la comparación de cada subregión entre tratamientos.

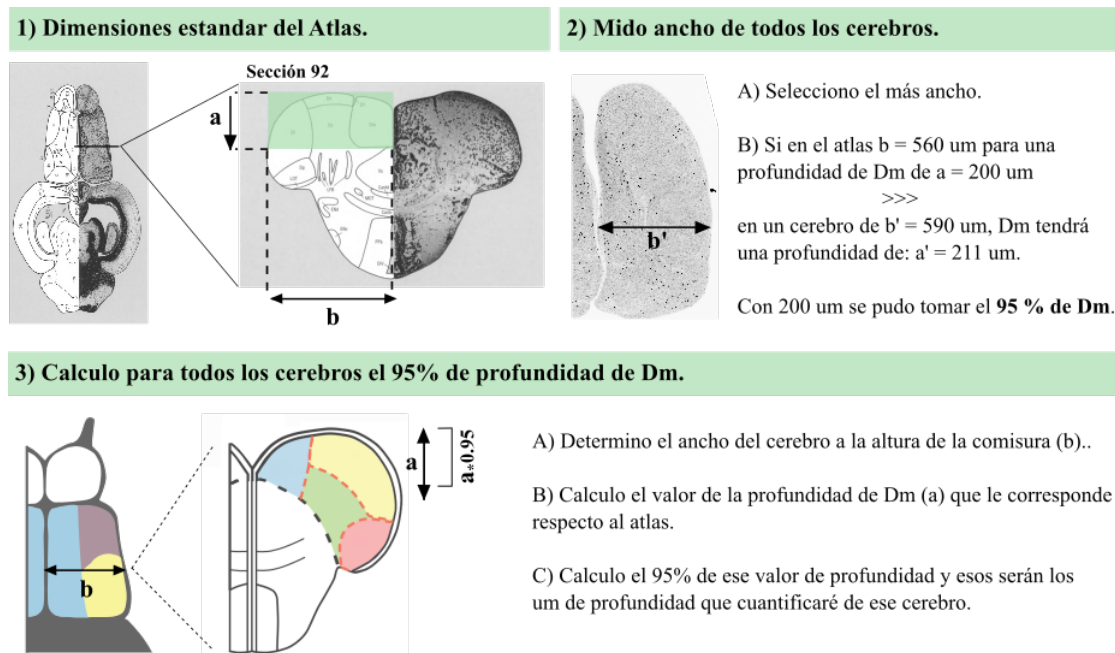


Figura 5.2: **Protocolo de ajuste de profundidad de Dm para evitar sesgo de profundidad.** Panel superior izquierdo: Se determinó para la región medial del telencéfalo cual era el ancho del mismo (b) y la profundidad de Dm (a) según el Atlas de Wullimann et al. (1996). Panel superior derecho: Con esos datos se midió el ancho de todos los cerebros del experimento y se seleccionó el más ancho de todos. Se determinó la profundidad de Dm para ese cerebro en % y luego se aplicó la misma metodología para determinar la profundidad de todos los telencéfalos (Panel inferior). De esa manera las proyecciones ortogonales y las cuantificaciones 3D abarcaron la misma profundidad de Dm y Dl para todos los individuos muestreados.

5.1 Resultados

5.1.1 Ambiente enriquecido

Como se demostró previamente en roedores, la exposición a ambientes enriquecidos produce una estimulación cognitiva que afecta positivamente el proceso de neurogénesis. Se observó que la actividad de la red regula la tasa de maduración de nuevas neuronas en el hipocampo en el momento de maduración e integración neuronal (Piatti et al., 2011). En peces, en cambio, se ha visto un mayor número de núcleos positivos para PCNA cuando se los mantuvo en acuarios enriquecidos (von Krogh et al., 2010), pero aún no se ha caracterizado la región específica donde se produce la modulación ni la etapa de amplificación de CMNs que se ve afectada. Es decir, podría estar incrementándose la división de CMNs activas o podrían haberse activado más progenitores latentes del reservorio.

Por todo ello, se decidió estudiar el efecto en la proliferación y supervivencia de CMNs marcadas con EdU luego de 32 dpi de actividad sostenida del telencéfalo por exposición a ambiente enriquecido.

Coordenada	Descripción
x_m, y_m	Par ordenado correspondiente a la posición central del telencéfalo.
x_c, y_c	Par ordenado correspondiente a la comisura anatómica de la región medial del telencéfalo.
$x_{m\acute{a}x}$ y $x_{m\acute{i}n}$	Puntos máximo y mínimo del eje lateral.
$y_{m\acute{a}x}$ y $y_{m\acute{i}n}$	Puntos máximo y mínimo del eje rostro-caudal.
α_{rad}	Ángulo de inclinación del telencéfalo respecto del eje Y.

Cuadro 5.1: Parámetros considerados para la subdivisión de regiones del *pallium*.

Sobrevida

Por un lado se evaluó el efecto en la sobrevida de CMNs marcadas con EdU a 32 dpi de exposición a ambiente enriquecido. Se realizó un análisis preliminar de los datos para observar si alguno de los ejes telencefálicos mostraba diferencias en el n° de células EdU⁺. Se observó que ambos ejes (lateral y rostro-caudal) diferían en ambiente enriquecido respecto del grupo control (eje lateral: $D=0.11$, $Z=0.003$; eje rostro-caudal: $D=0.05$, $Z=0.002$; $n=5$ por tratamiento). Estos resultados pueden observarse en la Figura 5.4 B-D. Indican que las dos matrices de células deberían diferir ya sea en valores de tendencia central, forma o asimetría. Luego se procedió con un análisis más exhaustivo para reconocer la región telencefálica que difería entre los tratamientos. El resultado del ANOVA de un factor no mostró diferencias entre el control y el ambiente enriquecido para ninguna sección, como puede observarse en la Figura 5.5.

Proliferación

Por otro lado, se evaluó la proliferación de las CMNs a 32 dpi, es decir, el número de células PCNA⁺ a 32 días de exposición al tratamiento. Se realizó el análisis preliminar de los datos para ver diferencias en los distintos ejes y se observó que solo el eje lateral presentó diferencias con el control ($D=0.19$, $Z=0.005$, $n=5$ por tratamiento). Estos resultados pueden observarse en la Figura 5.6 B-D. Luego se realizó un ANOVA de un factor para las distintas regiones y se observó un incremento de la proliferación en peces expuestos a ambiente enriquecido en la región lateral-medial de Dl (Figura 5.7 C, región d3).

5.1.2 Restricción social

Como se mencionó anteriormente, es sabido que la restricción social prolongada en roedores tiene un impacto negativo en la neurogénesis adulta. Cuatro semanas de restricción social (RS) generan una disminución del número de células BrdU positivas (marcadas a tiempo cero) y de la tasa de diferenciación neuronal en ratones (Ibi et al., 2008). Por otro

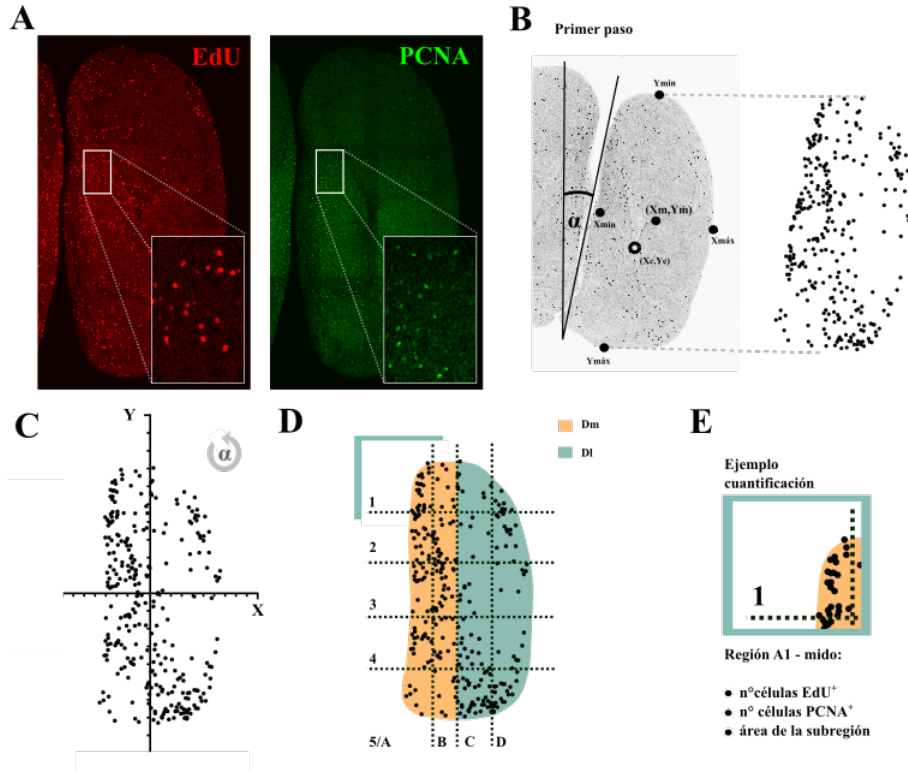


Figura 5.3: **Protocolo de procesamiento y cuantificación de células.** (A) Imágenes representativas de la proyección ortogonal de la marca de EdU (izquierda) y PCNA (derecha) en un hemisferio telencefálico. (B) Ejemplo de marca y cuantificación de EdU con señalización de los parámetros necesarios para el ajuste y subdivisión de regiones. (C) Células EdU luego del procesamiento de alineación del eje de coordenadas. (D) Diagrama de las regiones Dm y Dl con sus respectivas subdivisiones. (E) Ejemplo de subregión analizada, en ese caso es Dm rostral1. $X_{\max}$ y $X_{\min}$: extremos del eje lateral; $Y_{\max}$ y $Y_{\min}$: extremos del eje rostro-caudal; (X_m, Y_m) : posición central del hemisferio; X_c, Y_c : posición de la comisura.

lado, la exposición a RS previo a un entrenamiento cancela el incremento de la proliferación hipocámpal esperado por el ejercicio (Leasure and Decker, 2009). En peces, en cambio, todavía quedan aspectos del proceso sin caracterizar. En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se observó que la exposición a RS durante un mes disminuyó los niveles de neurogénesis adulta en la región Dm del telencéfalo, mientras que la proliferación y sobrevivencia de las CMNs marcadas no se vieron alteradas. Por otro lado, factores de estrés social como la condición de subordinación en la jerarquía social reducen la proliferación celular en el telencéfalo de la trucha arcoíris (Ausas et al., 2019; Sørensen et al., 2012).

En el pez cebra, en cambio, se sabe que el estrés social es un factor crítico en etapas tempranas del desarrollo ya que afecta el comportamiento del pez adulto, por ejemplo la formación de reacciones de evitación mecano-sensorial, así como también sus funciones inmunes, entre otros aspectos fisiológicos y comportamentales (Forsatkar et al., 2017; Gronenberg et al., 2020; Shams et al., 2018). Por otro lado, Tunbak et al. (2020) estudió mapas funcionales del cerebro del pez cebra aislado y reveló que se producen cambios en la actividad neuronal general, viéndose involucradas las regiones que participan en el comportamiento social, el procesamiento de las señales sociales y la ansiedad/estrés (Tunbak et al., 2020).

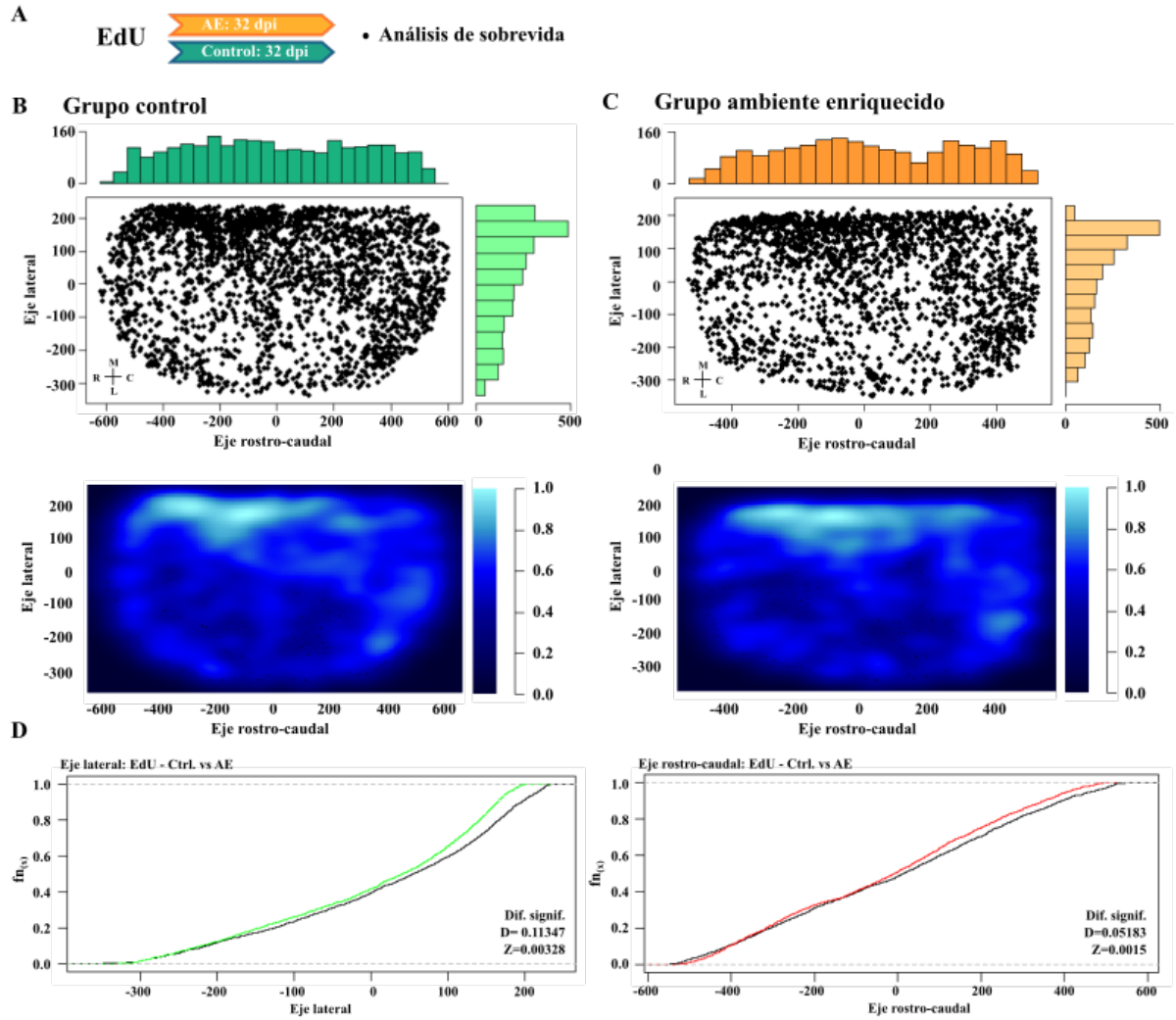


Figura 5.4: Distribución de CMNs EdU⁺ a 32 dpi en el *pallium* telencefálico en ambiente enriquecido. (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis. (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal (B-C, panel superior) y *heat map* (B-C, panel inferior). Para su realización se superpusieron las matrices de puntos de las células cuantificadas de todos los individuos de un mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (AE). AE: ambiente enriquecido. R:rostral, M: medial, C:caudal, L: lateral. $n=5$ por tratamiento.

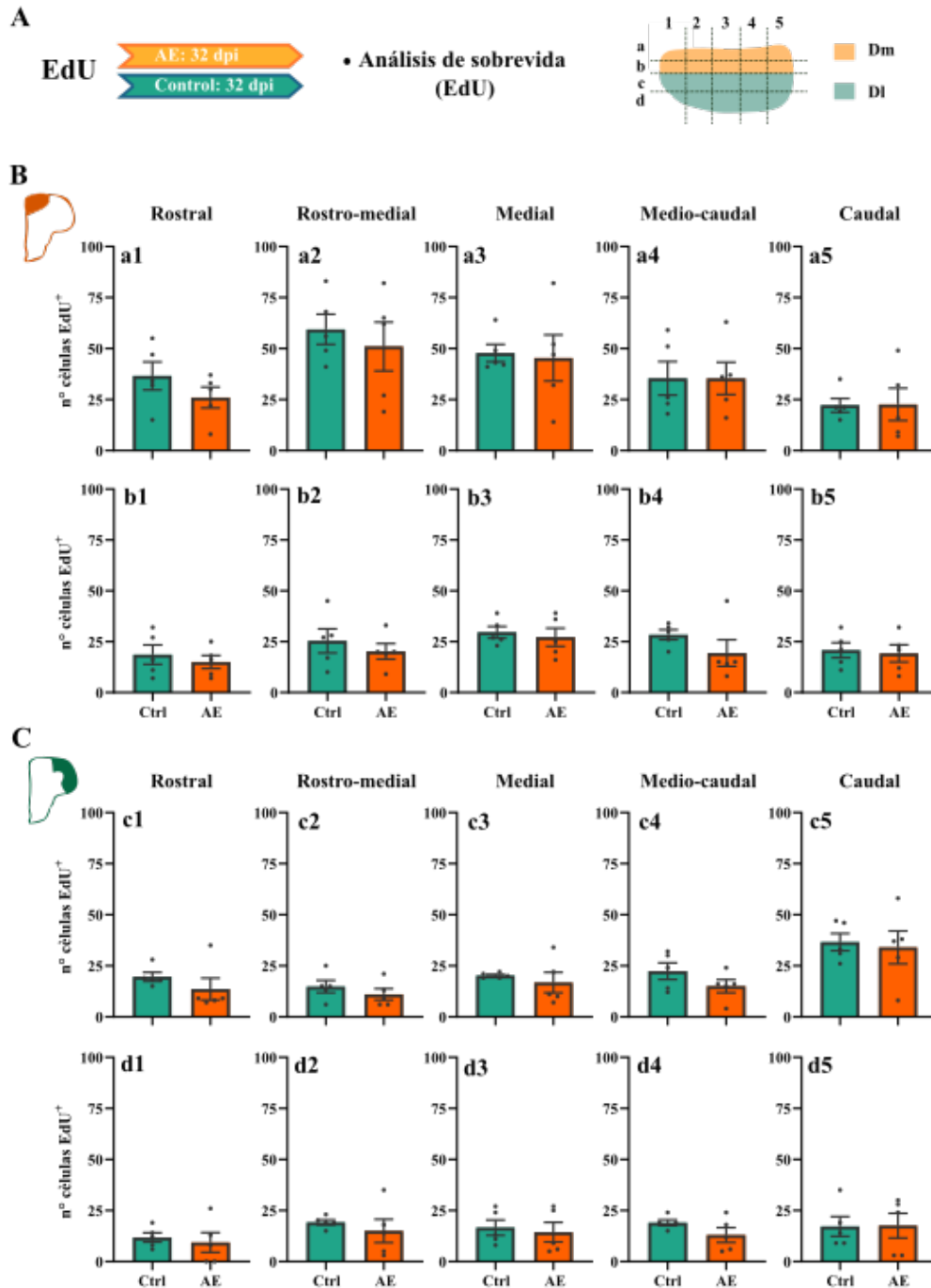


Figura 5.5: Sobrevivencia de CMNs EdU⁺ a 32 dpi en las distintas regiones del *pallium* en ambiente enriquecido. (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células EdU⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). AE: ambiente enriquecido. $n=5$ por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental.

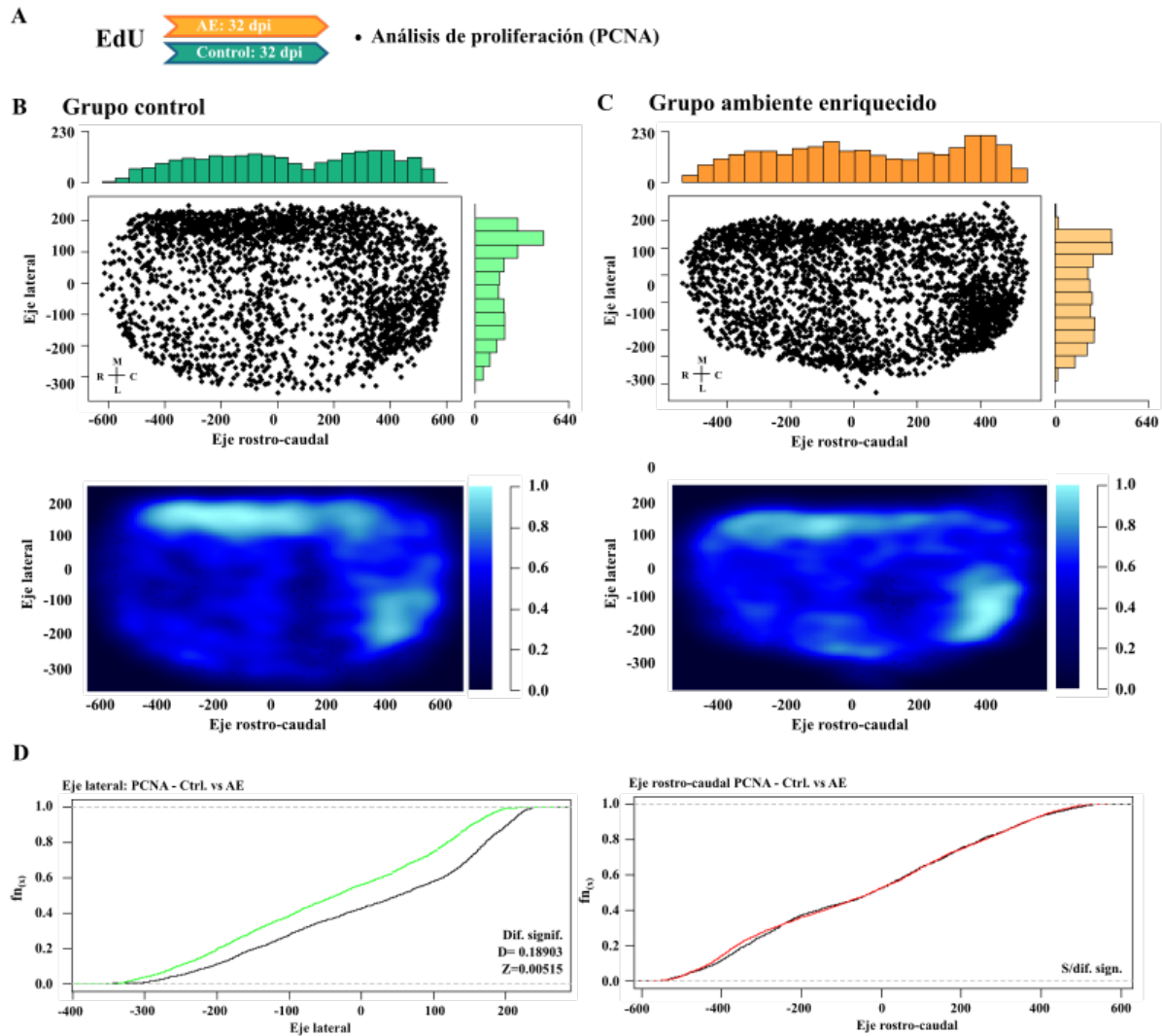
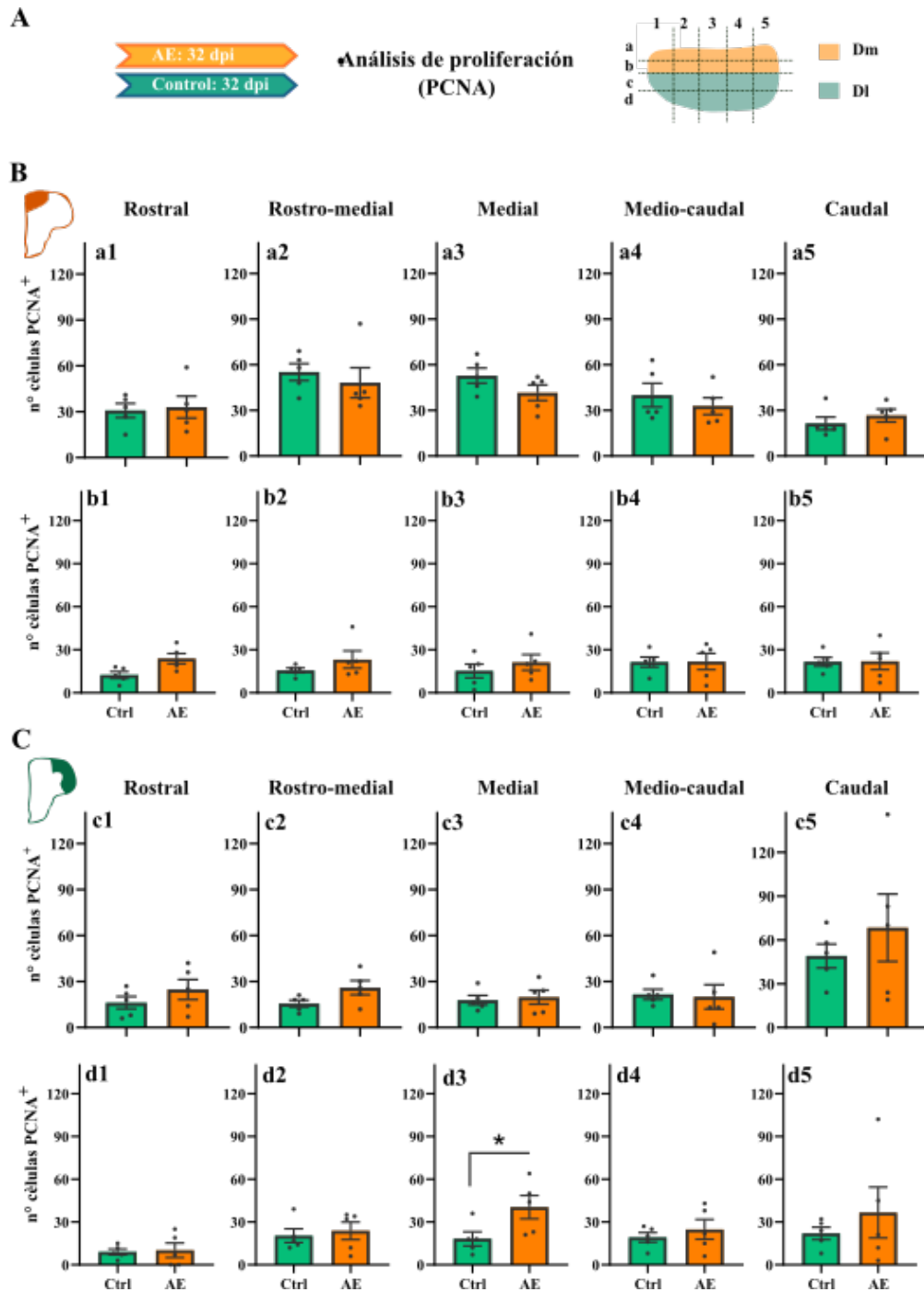


Figura 5.6: CMNs mitóticas $PCNA^+$ en el *pallium* del pez cebra luego de exposición durante 32 días a ambiente enriquecido. (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis de CMNs proliferantes ($PCNA^+$). (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal (B-C, panel superior) y *heat map* (B-C, panel inferior). Para su realización se superpusieron las matrices de puntos de las células cuantificadas de todos los individuos de un mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (AE). AE: ambiente enriquecido. R:rostral, M: medial, C:caudal, L: lateral. $n=5$ por tratamiento.



En ese contexto y frente a la poca información que existe sobre la región telencefálica que se modula, se decidió estudiar el efecto sobre la proliferación y sobrevida de CMNs marcadas con EdU, luego de 32 dpi de actividad sostenida por exposición a RS.

Sobrevida

En primer lugar se estudió el efecto de la restricción social sobre la sobrevida de CMNs marcadas con EdU, a 32 dpi de exposición. Se analizó si alguno de los ejes telencefálicos mostraba diferencias en el n° de células EdU⁺ y se vieron diferencias para ambos ejes (lateral y rostro-caudal) al comparar RS con el grupo control (eje lateral: $D=0.06$, $Z=0.002$; eje rostro-caudal: $D=0.05$, $Z=0.001$; $n=5$ por tratamiento). Estos resultados pueden observarse en la Figura 5.8 B-D. Luego se realizó un análisis para reconocer la región telencefálica que presentaba diferencias. El resultado del ANOVA de un factor arrojó diferencias entre el control y la RS en la región rostro-medial central de Dm (b2), como puede observarse en la Figura 5.9 B.

Proliferación

Al evaluar la proliferación de las CMNs a 32 dpi, es decir, el número de células PCNA⁺ a 32 días de exposición al tratamiento, se obtuvo que ambos ejes, lateral y rostro-caudal, presentan diferencias significativas entre tratamiento y control (lateral: $D=0.09$, $Z=0.002$; rostro-caudal: $D=0.07$, $z=0.002$; $n=5$ por tratamiento). Estos resultados pueden observarse en la Figura 5.10 B-D. Luego se realizó un ANOVA de un factor para las distintas regiones y se observó un incremento de la proliferación en peces expuestos a restricción social en la región lateral-medial de Dl (Figura 5.11 C, región c3).

5.2 Discusión y conclusiones

La modulación de la neurogénesis basal frente a estímulos ambientales debe ser estudiada para el reconocimiento de las regiones telencefálicas implicadas y para la comprensión y caracterización del fenómeno de neurogénesis como una estrategia de adaptación. En este sentido, la exposición a AE no ha sido ampliamente caracterizada. El trabajo de von Krogh et al. (2010) da evidencia de que una exposición de 7 días a AE genera alteraciones en la actividad proliferativa de CMNs (PCNA), además de aumentar los niveles de cortisol y disminuir la actividad locomotora, pero todavía queda mucho por saber de los mecanismos y nichos neurogénicos implicados. En el caso de exposición a RS, se ha caracterizado el efecto en etapas tempranas del desarrollo pero aún queda por dilucidar que sucede en el pez adulto. En este contexto, los resultados del presente trabajo contribuyen a la caracterización del efecto neurogénico de esos ambientes moduladores.

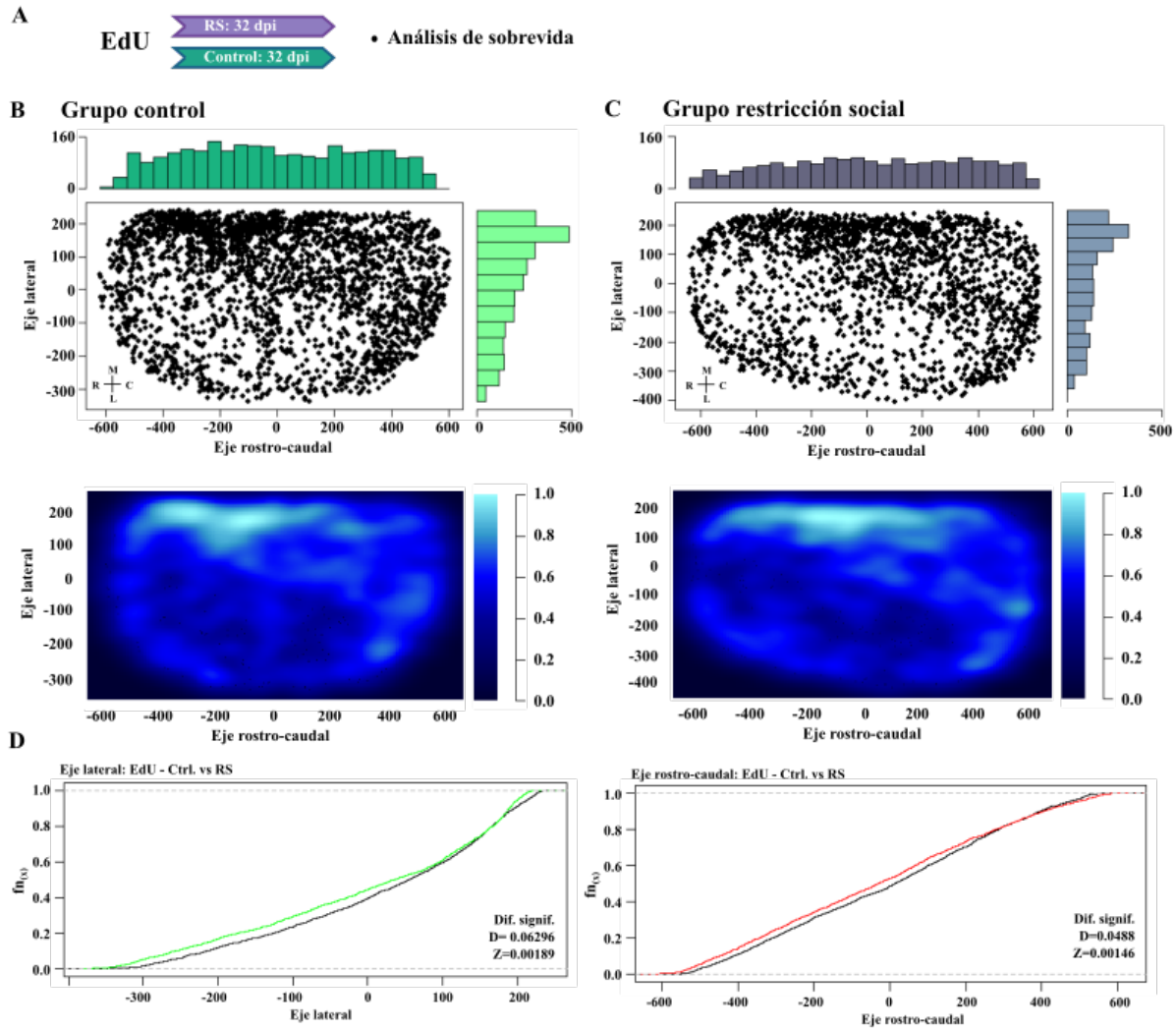


Figura 5.8: Sobrevivencia de CMNs por exposición de 32 días a restricción social. (A) Diseño experimental, inyección de EdU, seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis. (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal para el tratamiento (B-C, panel superior) y *heat map* de ambos (B-C, panel inferior). Se superpusieron la totalidad de células cuantificadas para todos los individuos del mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (RS). RS: restricción social. R:rostral, C:caudal. $n=5$ por tratamiento.

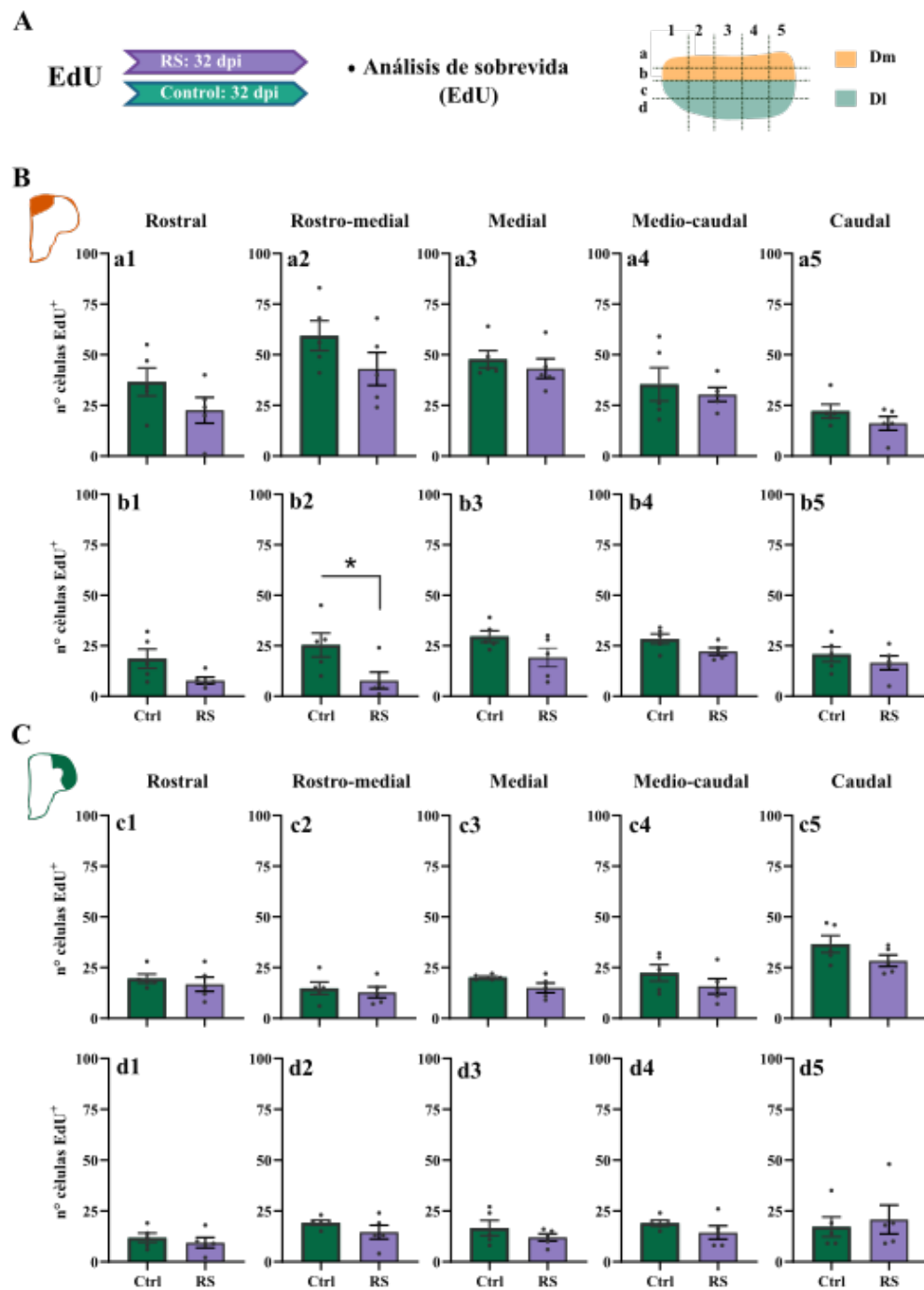


Figura 5.9: Sobrevida de CMNs EdU⁺ con 32 dpi de exposición a restricción social y en las distintas regiones del *pallium*. (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células EdU⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). AE: ambiente enriquecido. $n=5$ por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental.

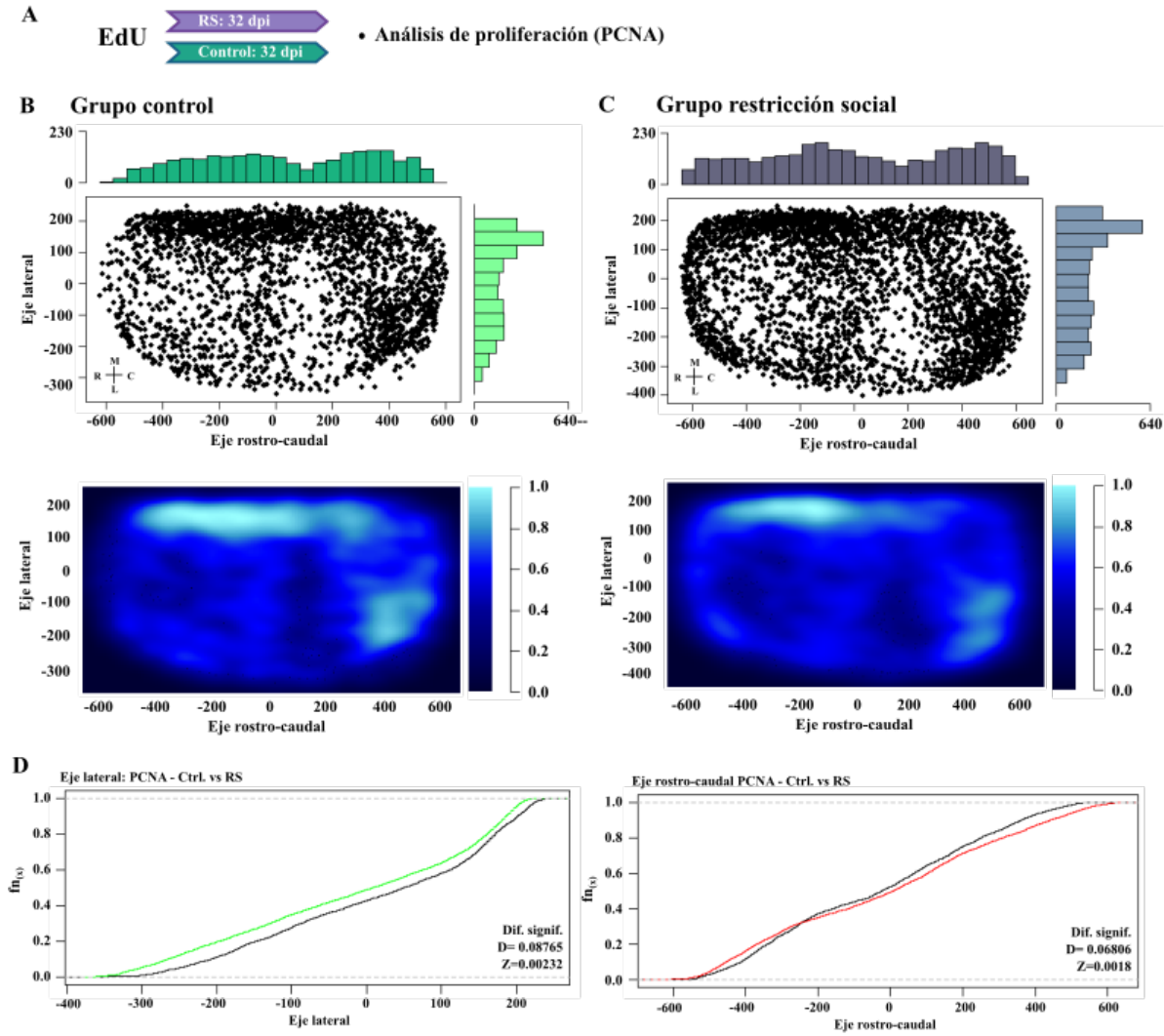


Figura 5.10: CMNs mitóticas luego de 32 días de exposición a AS. (A) Diseño experimental, inyección de EdU, seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis del marcador de proliferación PCNA. (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal para el tratamiento (B-C, panel superior) y *heat map* de ambos (B-C, panel inferior). Se superpusieron la totalidad de células cuantificadas para todos los individuos del mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (RS). RS: restricción social. R:rostral, C:caudal. $n=5$ por tratamiento.

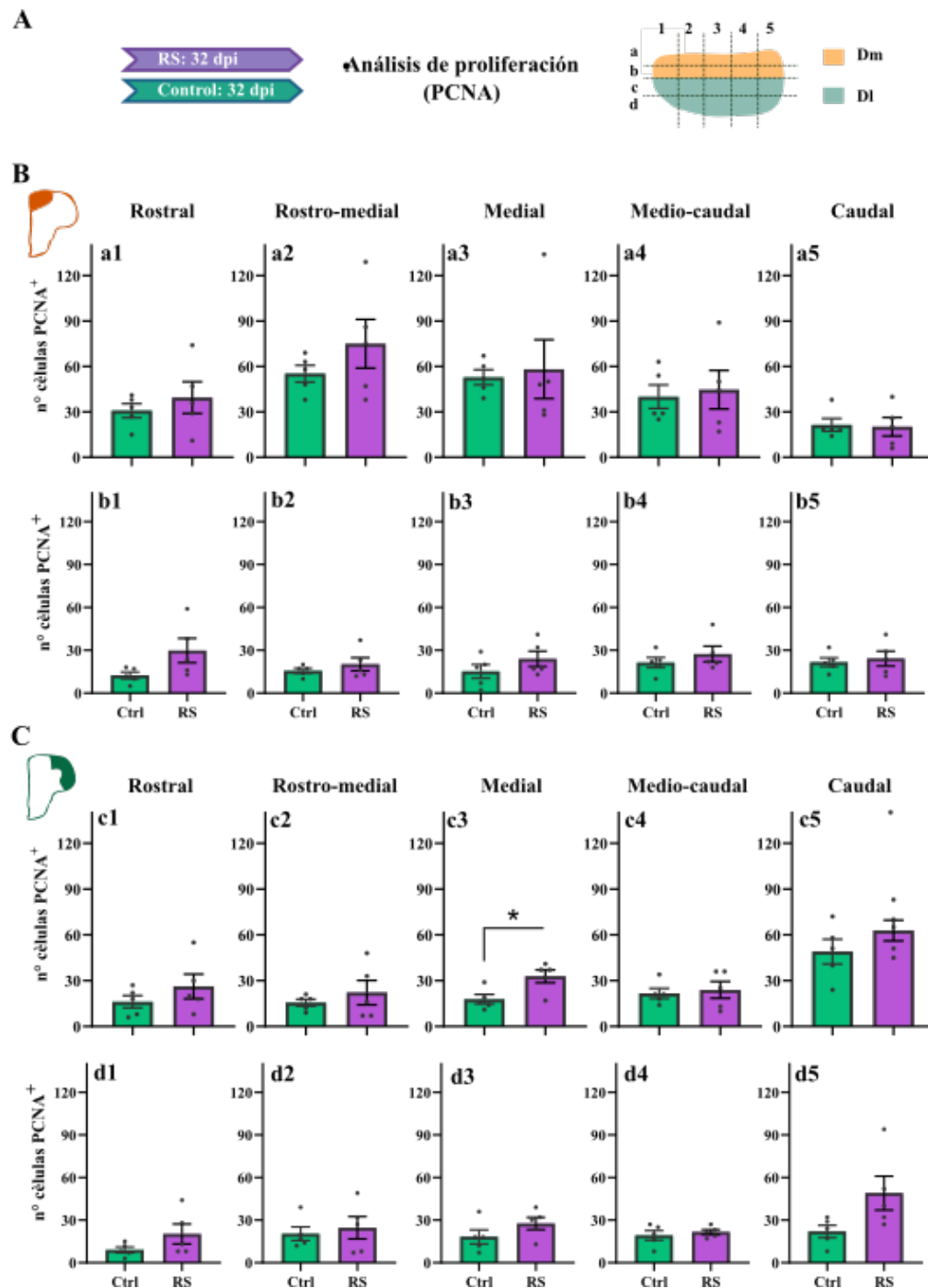


Figura 5.11: CMNs mitóticas PCNA⁺ en el *pallium* del pez cebra luego de exposición durante 32 días a restricción social. (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis de la proliferación por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células PCNA⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). RS: restricción social. $n=5$ por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental.

Modulación de la autorrenovación de CMNs. La exposición de 32 días a AE y RS mostró un incremento de la proliferación de CMNs en regiones contiguas de Dl medial. El resultado de AE se condice con lo observado previamente por von Krogh et al. (2010), pero con el agregado de la región cerebral exacta donde se produce la modulación. Por otro lado, el resultado de RS coincide con lo observado por Ausas et al. (2019) en la trucha arcoíris en cuanto a que no se observan diferencias en la región Dm luego de 4 semanas de aislamiento, pero con el agregado de reconocer a Dl como la región modulada.

Modulación de la sobrevida. La sobrevida de células EdU⁺ a 32 dpi, entendida como una medida indirecta de neurogénesis, no se vio afectada por exposición a AE, pero sí en RS donde mostró una disminución en Dm rostro-medial. Ambos resultados son novedosos ya que en el caso de AE no había evidencia previa al respecto y se observa que, al menos en ese periodo de exposición, la sobrevida no se altera. En RS en cambio se pudo reconocer la región telencefálica modulada, y eso marca una diferencia en el efecto neurogénico de ambos tratamientos.

En resumen, se corroboró la hipótesis de que ambos tratamientos producen una modulación del fenómeno de neurogénesis. Sin embargo la exposición a AE pareciera modular la región Dl medial del telencéfalo mientras que la RS implica tanto a Dm como a Dl. Por otro lado, las sutiles diferencias estadísticas observadas entre los tratamientos destacan cuan complejo es el impacto de las condiciones ambientales en el proceso de neurogénesis adulta. Se esperaba un efecto antagónico más marcado entre los tratamientos debido a su posición respecto a las condiciones naturales para el pez.

A futuro, sería de interés incrementar el tamaño de la muestra ya que permitiría reducir el error y proporcionaría mayor robustez estadística para identificar nuevas diferencias o intensificar las preexistentes. Además, sería valioso explorar la existencia de periodos temporales intermedios que podrían revelar variaciones en otros aspectos del proceso neurogénico, como la proliferación en AE o los tiempos de maduración de las neuronas. Por otro lado, podría evaluarse si el efecto es más temprano y se diluye o si afecta el fenotipo de las neuronas generadas a los 32 dpi. Este enfoque permitiría obtener una visión más completa y detallada de cómo las condiciones ambientales extremas afectan dinámicamente el proceso de neurogénesis en el pez cebra.

CAPÍTULO 6

Conclusión general

La neurogénesis adulta ha demostrado ser un mecanismo de plasticidad ampliamente distribuido en la filogenia de especies de vertebrados, con implicancias tanto en el crecimiento de los individuos como en su capacidad de adaptación a una amplia diversidad de estímulos. En relación con ello, la presente tesis logra caracterizar exitosamente la neurogénesis adulta en relación a los procesos de sobrevivencia, autorrenovación y destino neuronal de las CMNs que residen en los nichos Dm y Dl del telencéfalo del pez cebra (ver Figura 6.1). En líneas generales, se observó que cada nicho presentaba características únicas en cuanto a la distribución rostro-caudal de sus CMNs mientras que los procesos intrínsecos de diferenciación eran compartidos. En segundo lugar, se realizó una caracterización electrofisiológica de las neuronas del *pallium* considerando que si los nichos neurogénicos se encontraban en la ZPV también deberían encontrarse allí las características de células inmaduras en proceso de diferenciación. Múltiples parámetros electrofisiológicos respaldaron dicha hipótesis (ver Figura 6.2). Por último, se evaluó como la neurogénesis adulta era modulada por exposición a AE y RS. Se encontró que la actividad sostenida de las regiones Dm y Dl del *pallium* alteró los valores de sobrevivencia y autorrenovación de CMNs (ver Figura 6.3).

En resumen, los resultados de esta Tesis representan una valiosa contribución al entendimiento de la neurogénesis adulta, al mismo tiempo que abren la puerta a nuevos interrogantes que guiarán futuras investigaciones del campo de estudio. Estos hallazgos no solo amplían nuestro conocimiento sobre la neurogénesis adulta, sino que también enfatizan su relevancia en la adaptabilidad y la plasticidad del sistema nervioso en vertebrados, lo que potencialmente podría tener implicancias en diversas áreas de la neurociencia y la medicina.

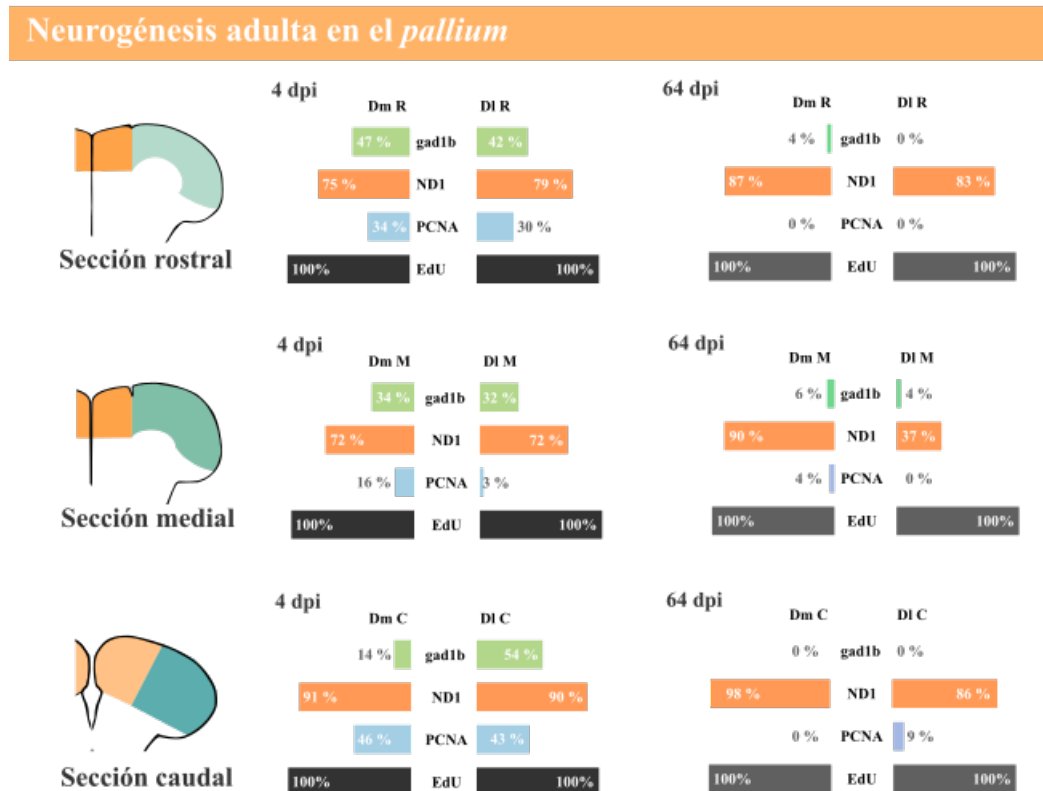


Figura 6.1: Resumen de resultados de la caracterización general de la neurogénesis adulta. % de colocación con EdU a 4 y 64 dpi de los distintos marcadores (gad1b, ND1, PCNA) en las regiones rostral, medial y caudal, tanto para Dm (izquierda) como Dl (derecha). *Aclaración:* los datos de gad1b corresponden a 8 dpi.

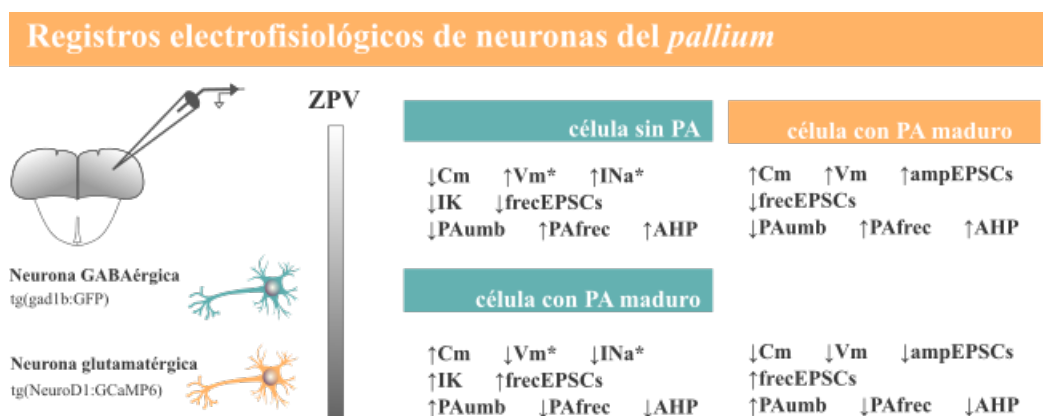


Figura 6.2: Resumen de resultados obtenidos a partir de registros electrofisiológicos de neuronas del *pallium* medial. Propiedades que siguieron la tendencia esperada para la hipótesis de distribución espacial y madurez en células GABAérgicas (azul) y glutamatérgicas (naranja).

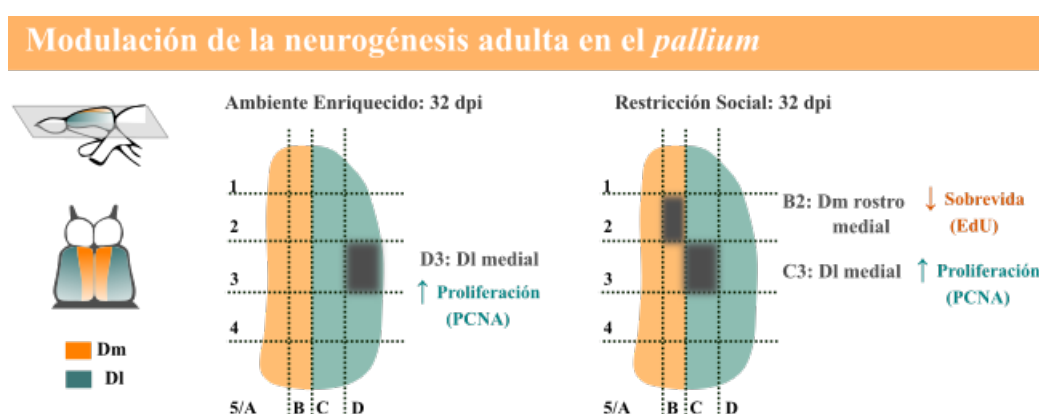


Figura 6.3: **Resumen de resultados de modulación de la neurogénesis adulta.** Efecto de modulación de la neurogénesis adulta por exposición a AE y RS. Tratamientos aplicados y regiones que presentaron diferencias (cuadro gris) respecto del grupo control.

CAPÍTULO 7

Lista de publicaciones

- Mazzitelli-Fuentes, L. S., **Román, F. R.**, Castillo Elías, J. R., Deleglise, E. B., & Mongiat, L. A. (2022). Spatial learning promotes adult neurogenesis in specific regions of the Zebrafish pallium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 829.
- Aiello, I., Mul Fedele, M. L., **Román, F. R.**, Golombek, D. A., & Paladino, N. (2022). Circadian disruption induced by tumor development in a murine model of melanoma. *Chronobiology International*, 39(1), 12-25.
- Aiello, I., Fedele, M. M., **Román, F.**, Marpegan, L., Caldart, C., Chiesa, J. J., ... & Paladino, N. (2020). Circadian disruption promotes tumor-immune microenvironment remodeling favoring tumor cell proliferation. *Science advances*, 6(42), eaaz4530.
- 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.

A.1 Apéndice 1: Reacción de click

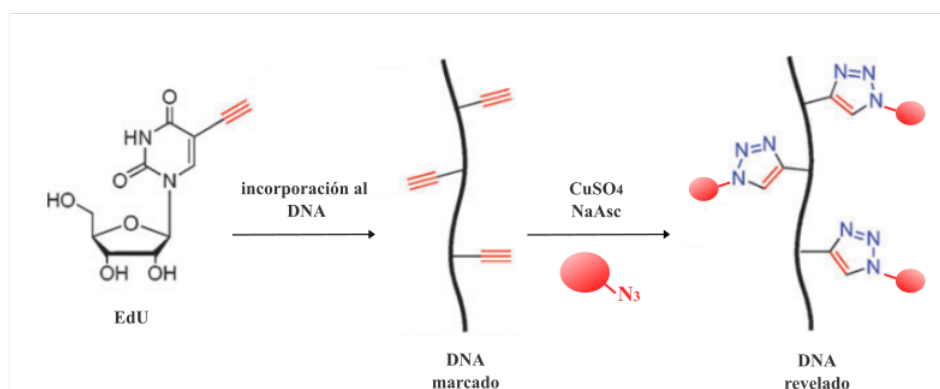


Figura A.1: **Reacción de *click***. La molécula de EdU se incorpora al DNA en las posiciones correspondientes a la timidina y, en presencia de una azida unida a molécula fluorescente (con Cu(I) como catalizador y ascorbato de Na) permite el revelado. Figura modificada de Le Droumaguet et al. (2010).

A.2 Apéndice 2: Distribución de CMNs marcadas a 4dpi

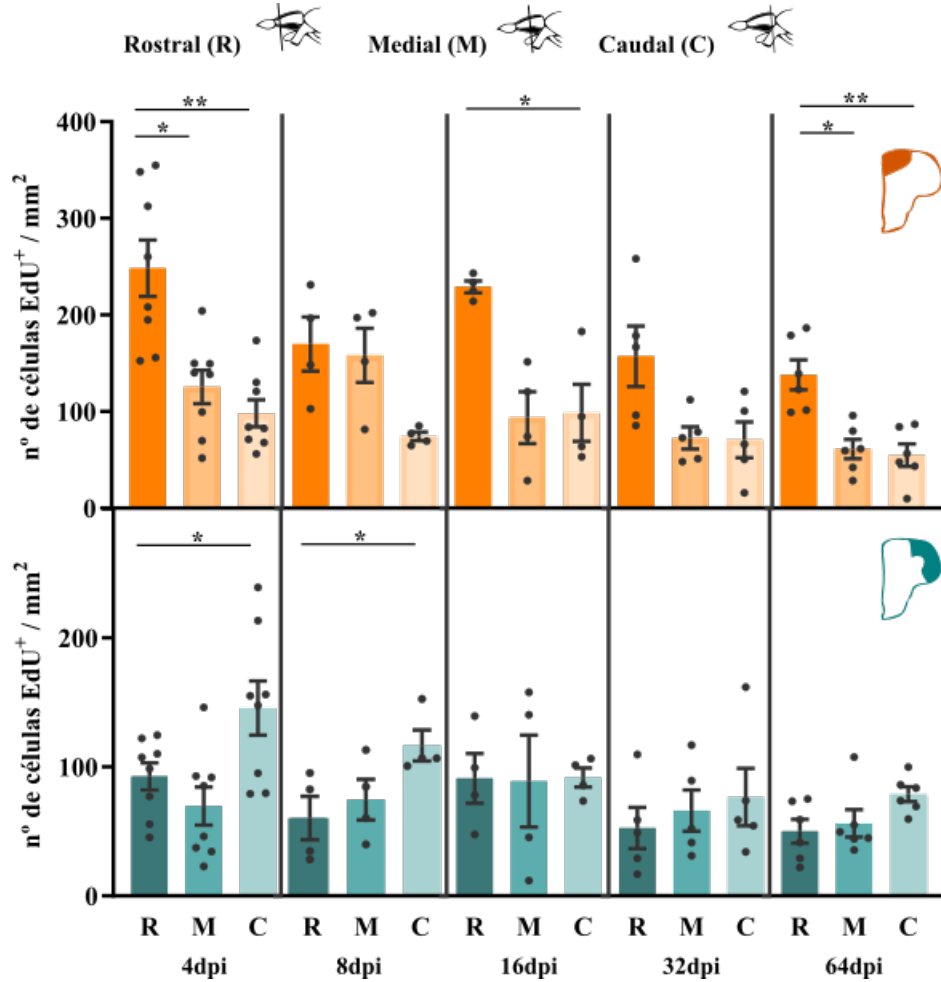


Figura A.2: Curva temporal de distribución espacial de la cohorte marcada de CMNs a distintos tiempos. Gradiente de distribución rostro-caudal de células EdU⁺ en la región Dm (panel superior, naranja) y Dl (panel inferior, azul) a 4, 8, 16, 32 y 64 dpi. R: rostral, M: medial, C: caudal. Test de Friedman, comparaciones múltiples de Dunn's, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, $n_{4dpi} = 8$, $n_{8dpi} = 4$, $n_{16dpi} = 4$, $n_{32dpi} = 5$, $n_{64dpi} = 6$. R: rostral, M: medial, C: caudal.

A.3 Apéndice 3: Protocolo de medición de distancias

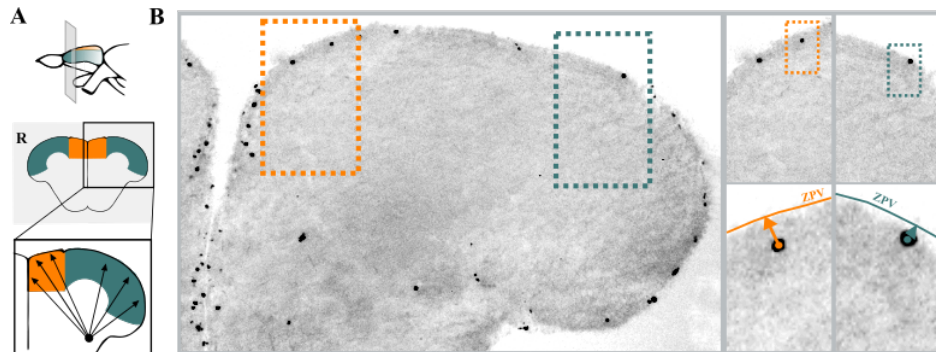


Figura A.3: **Medición de la posición de la cohorte de células EdU⁺**. A) Panel superior: vista esquemática sagital del telencéfalo del pez cebra, indicando la posición de la sección coronal rostral (R, a modo de ejemplo). Panel inferior: magnificación de la sección esquemática en estudio, el círculo negro indica el punto de referencia a partir del cual se extienden líneas virtuales radialmente hacia cada una de las células EdU⁺. B) Sección representativa de tejido teñido por reacción de *click* para revelado de EdU en región rostral. Los recuadros indican sucesivas magnificaciones correspondientes a la región Dm (naranja) y Dl (azul). Las flechas representan la distancia medida desde la célula hasta el borde del pallium. ZPV: zona periventricular.

A.4 Apéndice 4: Ajustes a curvas exponenciales

Marca	Región	Fórmula	Coef.a (cél/día)	Coef.b (cél/día)	Coef.c (1/días)	R ²
EdU	Dm-R	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	112,228	126,696	-0,026	0.95
	DI-C	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	76,2532**	112,164*	-0,114*	0.99
PCNA-EdU	Dm-R	$Y = b * e^{(c*x)}$	0	88.116*	-0,045	0.96
	Dm-C	$Y = b * e^{(c*x)}$	0	413.919	-0,542	0.98
	DI-R	$Y = b * e^{(c*x)}$	0	33.580*	-0,066	0.95
	DI-C	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	7.304*	248.727	-0,344	0.98
ND1-EdU	DI-C	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	0	206.728	-0,098	0.91
gad1b-EdU	Dm-R	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	0	102.32*	-0,088	0.99
	Dm-C	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	0	37.03	-0,029	0.97
	DI-R	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	0	14.993*	-0,051	0.99
	DI-C	$Y = a + b * e^{(c*x)}$	0	69.343**	-0,09*	0.99

Cuadro A.1: **Coefficientes de ajuste del decaimiento de la progenie de células marcadas a una función exponencial.** EdU solo: tasa de disminución del número de células EdU⁺ con el tiempo. PCNA-EdU: células mitóticas. ND1-EdU: células glutamatérgicas. gad1b-EdU: células GABAérgicas.

Coefficientes: La suma de 'a' y 'b' el número de células por unidad de área que se marcaron a tiempo 0. El coeficiente 'c' es la tasa de decaimiento del número de células con el tiempo. Significancia de los coeficientes: *p<0,05, **p<0,01.

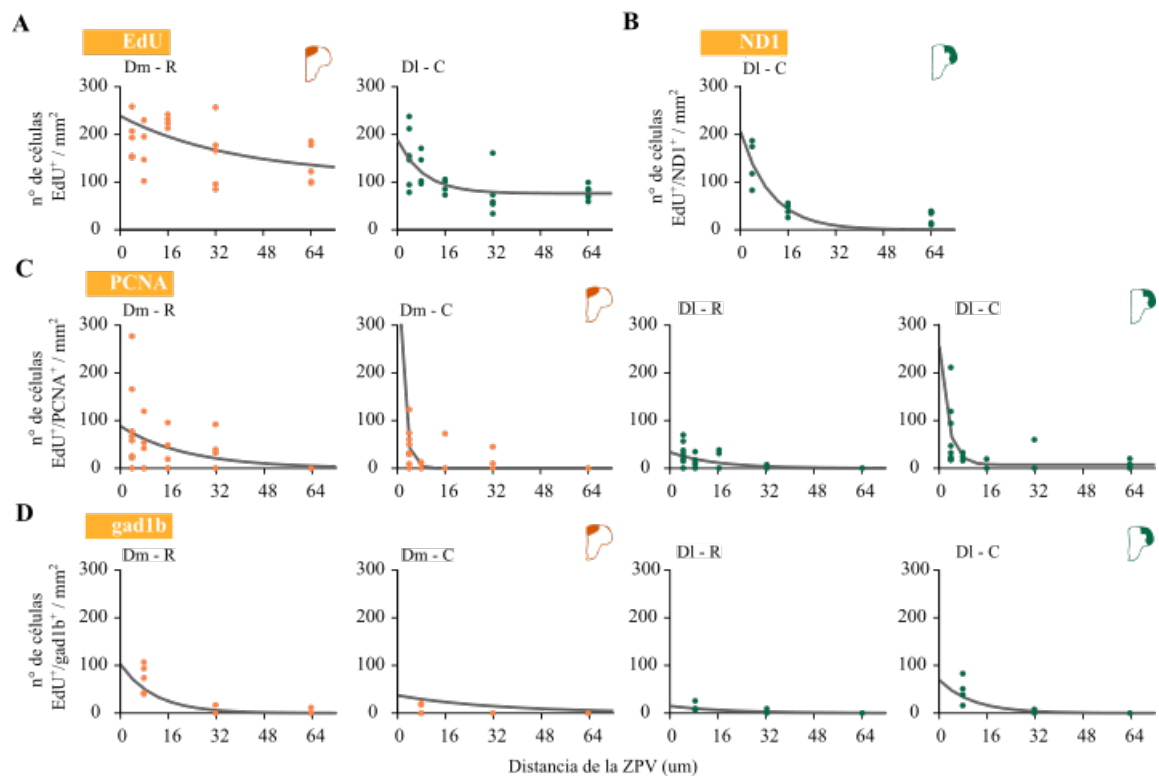


Figura A.4: Ajuste del decaimiento de la progenie de células marcadas a una función exponencial. (A) Curso temporal de la sobrevivencia de CMNs marcadas con EdU. (B) Curso temporal de la neurogénesis adulta glutamatérgica. (C) Curso temporal de la proliferación de CMNs. (D) Curso temporal de la neurogénesis adulta GABAérgica. Naranja: Dm, Azul: Dl. Dm-R: región rostral de Dm, Dm-C: región caudal de Dm, Dl-R: región rostral de Dl, Dl-C: región caudal de Dl.

A.5 Apéndice 5: Ejemplos de trazos neuronales.

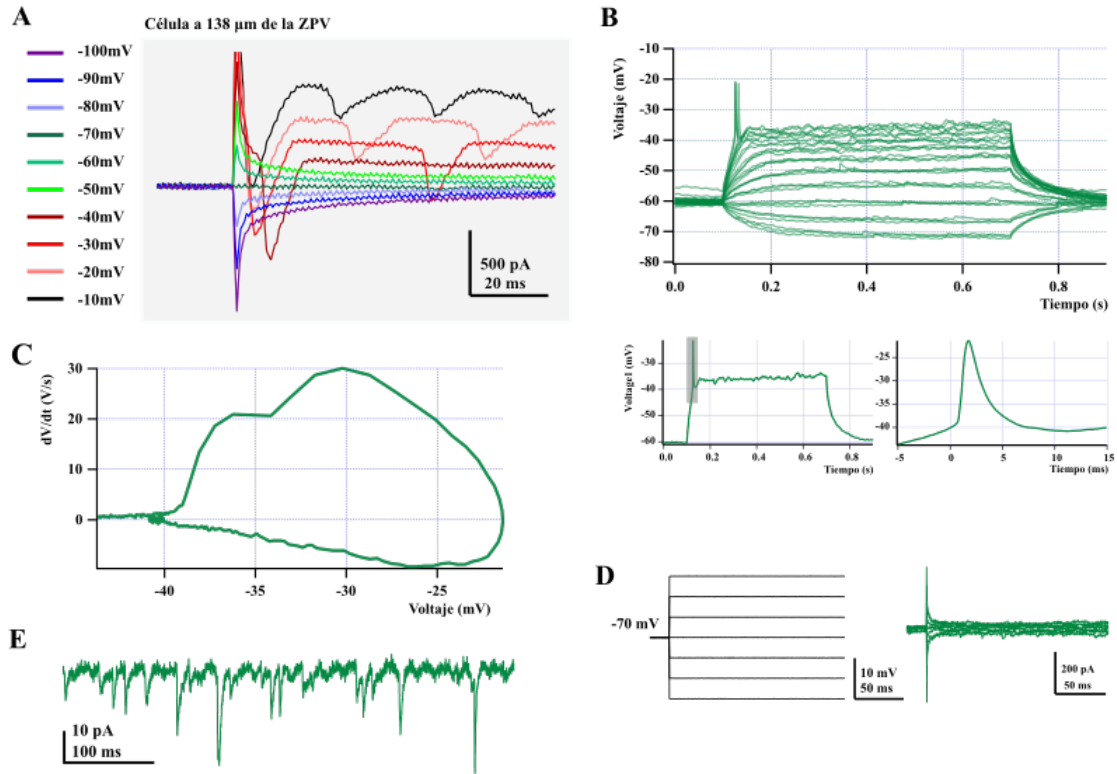


Figura A.5: Trazo de neurona GABAérgica madura posicionada a 138 μm de la ZPV. (A) Corrientes post-sinápticas evocadas por pulsos de voltaje despolarizante de (10mV). (B) Potencial de membrana evocado por pulsos de corriente depolarizante. (C) Derivada del potencial de membrana dV/dt en función del potencial. (D, E) Corrientes post-sinápticas espontáneas.

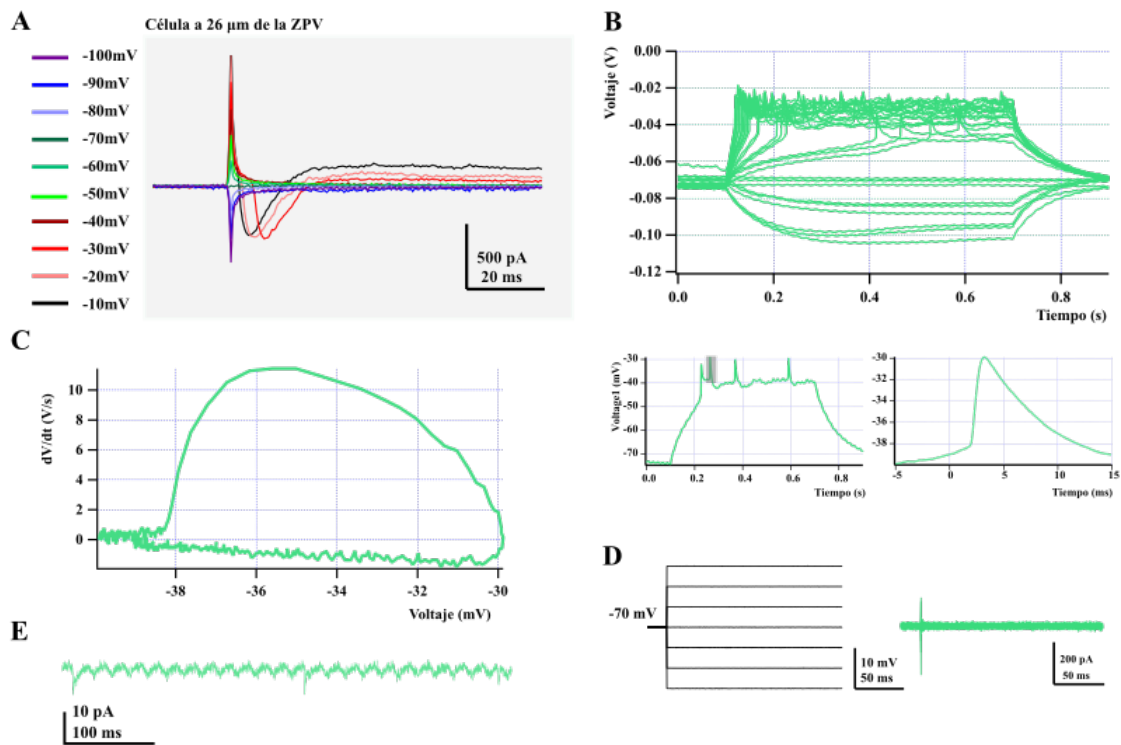


Figura A.6: Trazo de neurona GABAérgica inmadura posicionada a 26 μm de la ZPV. (A) Corrientes post-sinápticas evocadas por pulsos de voltaje despolarizante de (10mV). (B) Potencial de membrana evocado por pulsos de corriente depolarizante. (C) Derivada del potencial de membrana dV/dt en función del potencial. (D,E) Corrientes post-sinápticas espontáneas.

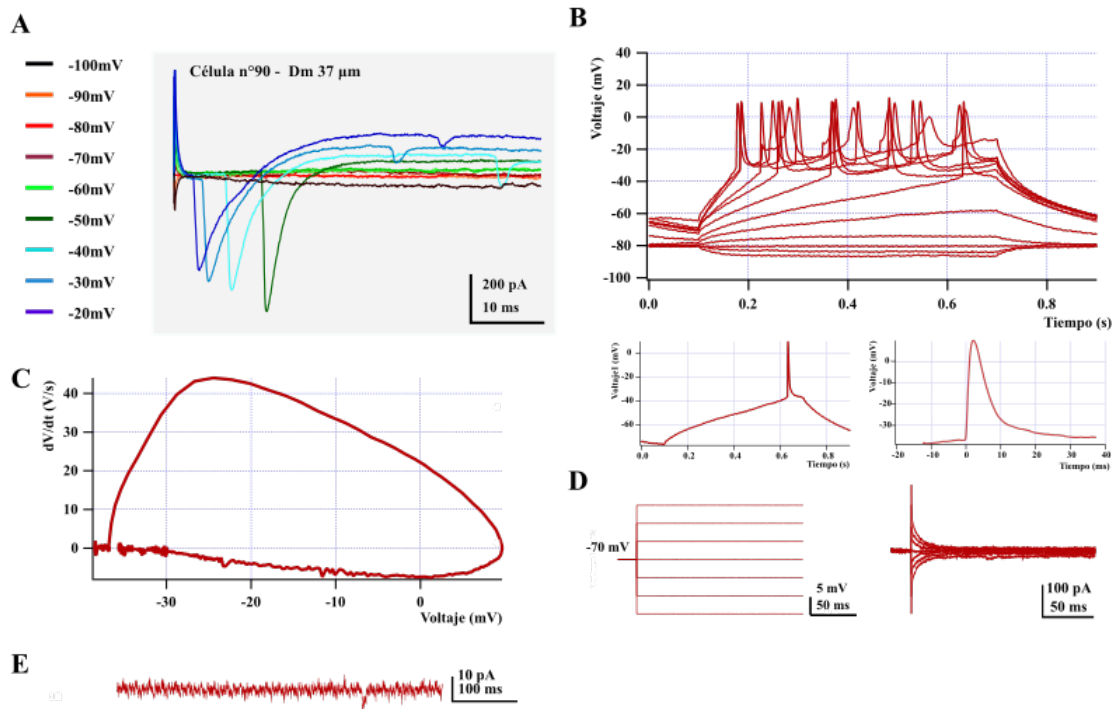


Figura A.7: Trazo de neurona glutamatérgica inmadura posicionada a 37 μm de la ZPV. (A) Corrientes post-sinápticas evocadas por pulsos de voltaje despolarizante de (10mV). (B) Potencial de membrana evocado por pulsos de corriente depolarizante. (C) Derivada del potencial de membrana dV/dt en función del potencial. (D,E) Corrientes post-sinápticas espontáneas.

A.6 Apéndice 6: Propiedades electrofisiológicas, células GABAérgicas

Dist(μm)	Rm(M Ω)	Cm(pF)	Vm(mV)	I _{Na} (pA)	I _K (pA)	PA	EPSCamp	EPSCfreq
10	1136.0	8.3	-50.0	-185.4	178.7	Inm	-10.82	1.78
11	845.3	7.5	-45.0	-165.4	233.3	No	0.0	0.0
12	1504.6	5.1	-39.0	-46.7	350.0	No	0.0	0.0
15	1598.6	5.9	-54.0	-464.5	317.6	Inm	-52	0.15
17	2615.4	7.5	-58.0	-367.7	212.2	Inm	-4.6	0.1
20	579.0	16.5	-64.0	-20.0	23.3	No	-3.61	3.47
21	339.2	6.2	-35.0	-20.7	161.6	No	-7.78	0.72
25	716.6	13.5	-38.0	-114.4	214.5	No	0.0	0.0
26	1879.0	4.6	-43.0	-516.0	53.9	Mad	-6.6	0.2
31	759.1	14.1	-55.0	-1206.2	424.3	Inm	-18.8	0.2
42	1658.0	9.4	-39.0	-148.9	911.4	No	-23.5	2.3
54	633.3	13.6	-61.0	-390.5	193.0	Inm	-6.42	2.4
73	4468.9	6.2	-48.0	-1042.6	63.0	Mad	-9.8	0.1
73	997.9	6.6	-53.0	-473.8	410.8	Inm	—	—
79	1613.7	9.8	-60.0	-254.3	208.9	Inm	-26.3	0.3
81	316.3	8.4	-49.0	-472.1	297.2	Inm	0.0	0.0
83	278.0	28.0	-60.0	-1193.4	170.0	Inm	-23.9	0.2
90	1057.1	11.1	-51.0	-402.6	151.7	Inm	-15.67	2.99
105	874.8	17.2	-65.0	-383.6	199.4	Inm	-1.6	3.3
138	426.1	19.1	-70.0	-935.5	451.0	Mad	-19.41	5.84
155	2826.6	7.8	-55.0	-648.2	150.5	Mad	-4.0	0.4
160	1423.1	14.7	-60.0	-1209.3	928.6	Mad	-14.4	7.3
192	581.9	17.7	-69.0	-1028.0	504.7	Mad	-15.5	4.1

Cuadro A.2: **Propiedades pasivas de la membrana de células gad1b⁺, de la línea transgénica tg(gad1b:GFP).** Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 23 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.2B,C.

Dist(μm)	PAamp	PAumb (mV)	AHP (mV)	APD (ms)	PA _{rec}
10	0	—	0	—	46.7
11	—	—	0	—	0.0
12	—	—	0	—	0.0
15	7.1	-36.7	0	3.21	68.6
17	12	-46.1	0	5.2	5.7
20	0	—	0	—	0.0
21	0	—	-1.6	—	0.0
25	—	—	-2.2	—	0.0
26	26.2	-34.9	-0.1	6.3	1.0
31	17	-35.4	0	3.1	1.0
42	—	—	-5.2	—	0.0
54	10.2	-48.1	—	5.35	30.0
73	48.5	-36.8	—	4.8	2.9
73	7.5	-34.3	-3.6	2.4	1.0
79	40.5	-55.2	—	12.7	1.0
81	7.6	-43.4	—	3.5	1.0
83	33.4	-42.6	0	4.7	1.0
90	8.3	-35.9	-3.8	4.83	4.3
105	11.9	-38.1	-3.0	2.7	17.1
138	13.8	-40.4	0	1.87	12.9
155	19.2	-35.8	0	7.0	1.0
160	26	-39.2	-4.7	2.2	18.6
192	17.2	-38.6	0	1.7	1.0

Cuadro A.3: **Propiedades activas de la membrana de células gad1b^+ , de la línea transgénica $\text{tg}(\text{gad1b:GFP})$.** Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 23 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.3D.

A.7 Apéndice 7: Propiedades electrofisiológicas, células glutamatérgicas

Dist(μm)	Rm(M Ω)	Cm(pF)	Vm(mV)	I _{Na} (pA)	I _K (pA)	PA	EPSCamp	EPSCfreq
7	229.0	10.3	-58.0	-2.6	271.1	No	-5.4	0.1
28	884.2	18.4	-59.0	-611.0	161.7	Mad	-9.6	0.3
37	590.8	29.6	-80.0	-566.8	128.2	Mad	-3.9	0.1
65	185.0	28.5	-70.4	-3113.0	127.0	Mad	–	–
74	172.0	20.4	-72.5	-2154.1	163.7	Mad	–	–
149	602.2	15.4	-69	-610.0	258.6	Mad	-8.15	0.19
186	751.7	11.1	-72	-445.8	189.0	Mad	-9.63	0.55

Cuadro A.4: **Propiedades pasivas de la membrana de células ND1⁺, de la línea transgénica tg(ND1:GCamp6).** Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 7 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.4B,C.

Dist(μm)	PAamp	PAumb (mV)	AHP (mV)	APD (ms)	PA _{freq}
7	–	–	0.0	–	0.0
28	32.7	-33.4	-5.2	7.4	4.3
37	44.3	-34.6	-0.9	5.7	7.1
65	53.2	-26.5	-5.3	2.75	13.3
74	63.6	-33.0	-5.4	1.87	16.7
149	44.4	-36.3	-6.6	5.4	4.3
186	42.0	-34.1	-8.7	4.0	8.6

Cuadro A.5: **Propiedades activas de la membrana de células ND1⁺, de la línea transgénica tg(ND1:GCamp6).** Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 7 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.5D.

Índice de figuras

- 1.1. **Filogenia del proceso de neurogénesis adulta en vertebrados.** Representación esquemática del árbol filogenético de vertebrados y las diferencias encontradas respecto al número de regiones neurogénicas. Puntos rojos: regiones con proliferación/neurogénesis adulta reportada. Figura modificada de Kuhn and Eisch (2014). 5
- 1.2. **Representación esquemática del proceso de eversión y evaginación del tubo neural en vertebrados.** (A) Vista coronal de la región telencefálica del tubo neural compartida por todos los vertebrados. (B,D) Proceso de diferenciación del telencéfalo de peces teleósteos que luego del sufrir una eversión (B) da lugar a dos hemisferios rodeados por una cavidad ventricular (D). (C,E) Proceso de diferenciación telencefálica de mamíferos mediante evaginación (C) del tubo neural que da lugar a dos ventrículos internos (E). (F-G) Corte transversal del telencéfalo que muestra la distribución de regiones proliferativas -naranja- y neurogénicas -verde- en peces teleósteos (F) o mamíferos (G). ZPV: zona periventricular, ZSV: zona sub-ventricular, ZSG: zona sub-granular, BO: bulbo olfatorio, Tel: telencéfalo, TO: tectum óptico, Cb: cerebelo, Ht: hipotálamo, GD: giro dentado. Figura modificada de Kizil et al. (2012); Mueller et al. (2011). 12
- 1.3. **Representación esquemática de la regionalización rostro-caudal del telencéfalo del pez cebra.** (A) Distribución rostro-caudal de las subregiones telencefálicas en cortes coronales. (B) Representación de las alternativas actuales de regionalización del telencéfalo con vista dorsal. Dm: dorso-medial, Dl: dorso-lateral, Dc: dorso central, Dlv: dorso-lateral ventral, Dp: dorso posterior, Da: dorsal anterior. R: rostral, C: caudal. Línea negra punteada: subdivisión entre *pallium* y *sub-pallium*. Figura A modificada de Ganz et al. (2014). 13

1.4.	Esquema de la composición celular de la zona proliferativa y las etapas de diferenciación neuronal en el pez cebra. En el <i>pallium</i> del pez cebra adulto se pueden encontrar CMNs en distintos estadios. Por un lado se encuentra el reservorio de células madre latentes que permanecen inactivas hasta que cambian su patrón de expresión génica o reciben señales extracelulares. Al activarse pueden pasar a ser progenitores activos de reserva y entran en un <i>loop</i> de activación que les permite autorrenovarse. Por otro lado, las CMNs activas pueden comenzar una vía de diferenciación pasando a ser células operacionales que dan lugar a nuevas neuronas. Imagen modificada de Liu et al. (2021).	16
1.5.	Esquema del ciclo celular y de quiescencia. Panel izquierdo: Ciclo celular general con fases G1, S, G2 y M. Durante el ciclo celular, las proteínas involucradas en la transcripción, traducción, replicación y reparación del ADN (mcm, PCNA y Ki67) están sobreexpresadas pero en distintos momentos (fases de expresión en rojo). Las células pueden entrar en estado de reposo o quiescencia en G1 y la decisión de entrada se toma en el punto R. Panel derecho: Ciclo de quiescencia específico de CMN. Los genes involucrados en la comunicación célula-célula, la adhesión celular y la señalización celular se sobre expresan. En estado de quiescencia expresan p21, p27, p57 y p130. Luego las células pueden experimentar un estado de “pre-activada” que precede a la activación propiamente dicha y donde expresan <i>ascl1</i> , que se mantendrá durante la activación y el proceso de diferenciación. Imagen modificada de Labusch et al. (2020).	17
3.1.	Diagrama general del experimento de caracterización de la neurogénesis (A) Panel izquierdo: Diseño experimental. Se marcó células progenitoras de individuos de 9 meses de edad mediante inyección de EdU. Los peces fueron sacrificados a distintos tiempos: 4, 8, 16, 32 y 64 dpi en la línea <i>wtAB</i> y 8, 32 y 64 dpi en la línea <i>tg(gad1b:GFP)</i> . Panel derecho: vista esquemática sagital del cerebro del pez cebra indicando la posición de los cortes coronales estudiados. (B) Esquema de las regiones rostro-caudales del telencéfalo del pez cebra según el Atlas (panel superior, modificado de Wulliman et al. (2012)) y según el presente trabajo (panel inferior). mpf: meses post fertilización, Dm: dorso-medial, Dl: dorso-lateral, R: rostral, M: medial, C: caudal.	37
3.2.	Cohorte de células marcadas con EdU. (A) Diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y tratamiento del tejido. (B) Imágenes representativas de cortes coronales rostro-caudales a 4 y 64 dpi de la región Dm (panel izquierdo, naranja) y Dl (panel derecho, azul). Los tejidos fueron tratados con reacción de <i>click</i> para revelado de EdU (ver Capítulo 2, Sección 2.4). Línea punteada: borde del tejido. Barra de escala, 40 μ m.	38
3.3.	Distribución espacial de células EdU⁺ a 4dpi. (A) n° de células EdU ⁺ /mm ² a lo largo del eje rostro-caudal en la región Dm (naranja) y Dl (azul) del <i>pallium</i> . Test de Friedman, comparaciones múltiples de Dun's, Dm: F=12.25, p_{V-RvsM} =0.012, p_{V-RvsC} =0.002. Dl: F=9.75, p_{V-RvsC} =0.049. $n_{4dpi}=8$ * $p<0.05$ ** $p<0.01$. (B) Modelo propuesto. Cortes coronales rostro-caudales con distinta distribución de células marcadas para las regiones Dm y Dl. R: rostral, M: medial, C: caudal.	39

- 3.4. **Posición de la cohorte de células EdU⁺ en las subdivisiones paliales Dm y Dl en secciones coronales del *pallium*.** (A,C) Distancia de la célula a la ZPV (μm) en función del tiempo. (B,D) Frecuencia relativa acumulada en función de la distancia a la ZPV. Test de Kolmogorov-Smirnov con corrección por comparaciones múltiples de Bonferroni, comparaciones: 4dpi vs 8/16/32/64 dpi. Dm-R: Test_{4vs32}=0.50; Test_{4vs64}=0.70; n_{4dpi}=81; n_{8dpi}=55; n_{16dpi}=36; n_{32dpi}=36; n_{64dpi}=42. Dm-M: Test_{4vs32}=0.46; Test_{4vs64}=0.61; n_{4dpi}=63; n_{8dpi}=56; n_{16dpi}=31; n_{32dpi}=23; n_{64dpi}=30. Dm-C: n_{4dpi}=71; n_{8dpi}=30; n_{16dpi}=38; n_{32dpi}=27; n_{64dpi}=33. Dl-R: Test_{4vs32}=0.51; n_{4dpi}=64; n_{8dpi}=38; n_{16dpi}=40; n_{32dpi}=27; n_{64dpi}=31. Dl-M: Test_{4vs64}=0.49; n_{4dpi}=46; n_{8dpi}=39; n_{16dpi}=36; n_{32dpi}=30; n_{64dpi}=35. Dl-C: Test_{4vs64}=0.50; n_{4dpi}=116; n_{8dpi}=74; n_{16dpi}=46; n_{32dpi}=37; n_{64dpi}=61. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. R: rostral, M: medial, C: caudal. 41
- 3.5. **Curso temporal de supervivencia de la cohorte de células EdU⁺.** (A) Diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y posterior tratamiento del tejido. (B,C) n° de células EdU⁺ a lo largo del eje rostro-caudal en la región Dm (B) y Dl (C) del *pallium*. Test de Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's. Dm-R: St=10.84, p_v=0.028; p_{4vs64}=0.033. Dl-C: St=9.94, p_v=0.041; p_{4vs32}=0.011, p_{4vs64}=0.019; n_{4dpi}=8; n_{8dpi}=4; n_{16dpi}=4; n_{32dpi}=5; n_{64dpi}=6. *p<0.05. R: rostral, M: medial, C: caudal. 43
- 3.6. **Morfología nuclear de células EdU⁺ a 4dpi.** (A) Imágen de corte coronal medial del telencéfalo del pez cebra. Núcleos EdU⁺ teñidos por reacción de *click* (rojo) y núcleos teñidos con tinción de DAPI (azul). Barra de escala: 100 μm . (B) Magnificación de la región Dm del *pallium* indicada en A con recuadro blanco punteado. Barra de escala: 20 μm . (C,C') magnificación de núcleos normales (C) y aparentemente segmentados (C') señalados en B con recuadro blanco punteado. Barra de escala: 10 μm . Línea punteada amarilla: delimitación del núcleo. 44
- 3.7. **CMNs mitóticas en la región Dm del *pallium*.** (A) Panel superior: diseño experimental. Diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dm rostral (izquierda) y caudal (derecha) del *pallium* a 4 y 32 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección para PCNA. Línea punteada: borde del tejido. Flechas blancas y recuadro punteado: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μm ; ampliación 10 μm . (B,C) Curso temporal de CMNs mitóticas en la region Dm del *pallium*, evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺PCNA⁺. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: Dm-R: St=9.65, p_v=0.047, p_{4vs64}=0.009. Dm-C: St=11.72, p_v=0.02, p_{4vs64}=0.005. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. Dm-R: p_v=0.003. Dm-C: p_{4vs8}=0.001, p_{4vs32}=0.012, p_{4vs64}=0.0001. n_{4dpi}=8, n_{8dpi}=4, n_{16dpi}=4, n_{32dpi}=5, n_{64dpi}=6. *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,001. 46

- 3.8. **CMNs mitóticas en la región Dl del *pallium*.** (A) Panel superior: diseño experimental. Diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dl rostral (izquierda) y caudal (derecha) del *pallium* a 4 y 32 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección para PCNA. Línea punteada: borde del tejido. Flechas blancas y recuadro punteado: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μm ; ampliación 10 μm . (B,C) Curso temporal de CMNs mitóticas en la región Dl del *pallium*. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU+PCNA⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: Dl-R: St=11.32, $p_v=0.023$, $p_{4vs64}=0.016$. Dl-C: St=15.15, $p_v=0.004$, $p_{4vs16}=0.023$, $p_{4vs32}=0.028$, $p_{4vs64}=0.018$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. Dl-R: $p_{4vs32}=0.004$, $p_{4vs64}=0.001$. Dl-C: $p_{4vs16}=0.001$, $p_{4vs32}=0.004$, $p_{4vs64}=0.002$. $n_{4dpi}=8$, $n_{8dpi}=4$, $n_{16dpi}=4$, $n_{32dpi}=5$, $n_{64dpi}=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$ 48
- 3.9. **Neurogénesis adulta: Vías alternativas de diferenciación de CMNs** (A) Regulación del proceso de diferenciación a neurona glutamatérgica (panel izquierdo) y GABAérgica (panel derecho). (B) Distintas alternativas de división/diferenciación de la población operativa de CMNs. ND1/2: NeuroD1/2; NGN2: neurogenina2; tbr1/2: *T brain 1*; vglut1/2: transportador de glutamato vesicular; mash1: *Achaete-scute homolog 1*; N: neurona. 51
- 3.10. **Destino glutamatérgico de la cohorte de CMNs marcada con EdU en la región Dm.** (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dm rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 4 y 64 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección de ND1. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μm ; ampliación 10 μm . (B,C) Curso temporal de adquisición de destino glutamatérgico de CMNs marcadas. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU+ND1⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn's. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. $n_{4dpi}=4$; $n_{16dpi}=4$; $n_{64dpi}=5$ 52

- 3.11. Destino glutamatérgico de la cohorte de CMNs marcada en la región Dl.** (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y análisis. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dl rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 4 y 64 dpi. Los tejidos fueron tratados por reacción de *click* para revelado de EdU y por inmunodetección de ND1. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto, 40 μm ; ampliación 10 μm . (B,C) Curso temporal de adquisición de destino glutamatérgico de CMNs marcadas. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺ND1⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, Dl-C: $\text{St}_{\text{K-W}}=8.78$, $p_v=0.002$, comparaciones múltiples de Dunn's: $p_{v-4\text{vs}64}=0.006$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. $n_{4\text{dpi}}=4$, $n_{16\text{dpi}}=4$, $n_{64\text{dpi}}=5$. ** $p<0.01$ 53
- 3.12. Marca de gad1b en el tg(gad1b:GFP).** A) Diagrama de un corte coronal de la región Dm del *pallium* rostral del telencéfalo del pez cebra. Recuadro punteado negro: sección fotografiada en B. B) Imagen representativa de marca de gad1b (cian, izquierda), GFP (rojo, medio) y la colocalización de ambos (blanco, derecha). Ambas marcas fueron reveladas por técnicas inmunohistoquímicas. Flecha blanca: células gad1b⁺. Recuadro punteado blanco: sección ampliada. Barra de escala: foto: 10 μm ; ampliación: 5 μm 55
- 3.13. Destino GABAérgico de CMNs marcadas con EdU en la región Dm.** (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y tratamiento del tejido. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dm rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 8 y 64 dpi. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto: 40 μm , ampliación: 10 μm . (B,C) Curso temporal de adquisición de destino GABAérgico de CMNs marcadas, en la región Dm. Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺gad1b⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: Dm-R: $\text{St}=8.73$, $p_v=0.003$, $p_{8\text{vs}64}=0.014$. Dm-M: $\text{St}=6.67$, $p_v=0.02$, $p_{8\text{vs}64}=0.02$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. Dm-R: $p_{8\text{vs}32}=0.032$, $p_{8\text{vs}64}=0.0001$. $n_{8\text{dpi}}=5$, $n_{32\text{dpi}}=3$, $n_{64\text{dpi}}=4$. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ 56
- 3.14. Destino GABAérgico de CMNs marcadas con EdU en la región Dl.** (A) Panel superior: diseño experimental, diagrama temporal de muestreo post-inyección y tratamiento del tejido. Panel inferior: imágenes representativas de cortes coronales de la región Dl rostral (superior) y caudal (inferior) del *pallium* a 8 y 64 dpi. Línea punteada: borde del tejido, flechas blancas: célula seleccionada para observación de la colocalización. Barra de escala: foto: 40 μm , ampliación: 10 μm . (B,C) Curso temporal de adquisición de destino GABAérgico de CMNs marcadas en la región Dl. (B-C) Evolución temporal del n° (B) y % (C) de células EdU⁺gad1b⁺ a lo largo del eje rostro-caudal. Test n° de células: Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: Dl-R: $\text{St}_{\text{K-W}}=7.73$, $p_v=0.009$, $p_{8\text{vs}64}=0.014$. Dl-C: $\text{St}_{\text{K-W}}=8.55$, $p_v=0.02$, $p_{8\text{vs}64}=0.009$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Test % de células: Prueba Z de dos muestras, comparaciones múltiples de Bonferroni. Dl-R: $p_{8\text{vs}64}=0.002$. Dl-C: $p_{8\text{vs}32}=0.0005$, $p_{8\text{vs}64}=0.00001$. *** $p<0,005$, **** $p<0,001$. $n_{8\text{dpi}}=5$, $n_{32\text{dpi}}=3$, $n_{64\text{dpi}}=4$ 57

3.15. Subpoblación de CMNs $\text{EdU}^+\text{gad1b}^+\text{ND1}^+$ a 8dpi, en peces $\text{tg}(\text{gad1b}:\text{GFP})$.

(A) Diagrama de selección de corte coronal de la región Dm del *pallium* del telencéfalo del pez cebra. (B) Imagen representativa de marca a 8dpi de EdU (A,B,C; rojo), gad1b (A',B',C'; verde), ND1 (A'',B'',C''; magenta) y su colocalización (A''',B''',C'''). Las marcas fueron reveladas por reacción de *click* (EdU) y técnicas inmunohistoquímicas (otras). Recuadros punteados en blanco: ampliación. Barra de escala: foto: 10 μm ; ampliación: 5 μm . 58

4.1. Protocolo de registro electrofisiológico. (A) Procedimiento experimental. Izquierda: vista esquemática sagital del cerebro del pez cebra indicando posición de corte del taco de agarosa (superior) para extraer región medial (inferior). Centro: imagen representativa del tejido. Derecha: imagen representativa del registro de *patch-clamp* en una célula de la región Dm medial, d: distancia de la ZPV. (B) Esquema de potencial de acción. La célula se encuentra en su potencial de membrana en reposo (RMP) hasta que se le administra un estímulo eléctrico. Allí se produce un aumento del potencial de membrana que si supera cierto umbral (PA_{umb}) produce la apertura masiva de canales de Na^+ generando una rápida despolarización. Al alcanzar el pico máximo de potencial se cierran los canales de Na^+ y se abren los de K^+ generando la repolarización de la membrana que llegará por debajo del potencial de reposo, generando una hiperpolarización o *after hyperpolarization* (AHP). Los canales de K^+ se cierran y la célula vuelve a su RMP. (C) Diagrama de fases ($\partial V/\partial t$). Las medidas exactas del PA_{umb} , AHP y PA_{ap} se toman del gráfico. (D) Protocolo de *Voltage clamp* del cual se toman las medidas de capacitancia (C_m) y resistencia (R_m) de membrana. (D) Imagen ilustrativa de corrientes excitatorias postsináptica espontánea (sEPSC). 68

4.2. Propiedades pasivas y espontáneas de células gad1b^+ en el *pallium* del pez cebra. (A) Distribución de neuronas registradas en la línea transgénica $\text{tg}(\text{gad1b}:\text{GFP})$ en función de su posición respecto a la ZPV y de su capacidad de disparo de PA. (B) Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades pasivas de la membrana: resistencia de membrana en reposo (R_m), capacitancia de membrana (C_m) y potencial de reposo (V_m). (C) Corrientes de sodio (I_{Na}) y potasio (I_{K}). (D) Amplitud (izquierda) y frecuencia (derecha) de EPSCs. Test I_{Na} y V_m : Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: V_m : s/PA - c/PA, $St=8.93$ y $pv=0.036$. I_{Na} : s/PA - PA_{inm} , $St=8.60$ y $pv=0.0281$ y PA_{inm} - c/PA: $St=15.64$, $pv=0.00001$. $n_{\text{total}}=23$ - $n_{\text{s/PA}}=6$ - $n_{\text{PA inm}}=10$ - $n_{\text{c/PA}}=7$. . . 70

4.3. Propiedades activas de células gad1b^+ en el *pallium* del pez cebra. Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades de disparo de PA de la membrana. (A) Umbral (izquierda, PA_{umb}), amplitud (centro, PA_{amp}) y frecuencia (derecha, PA_{frec}) de disparo de PA. (B) Duración del PA (APD). (C) Amplitud de la *After hyperpolarization* (AHPamp). Test I_{Na} y V_m : Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn's: PA_{amp} : PA_{inm} - PA, $St=7$ y $pv=0.0073$ $n_{\text{total}}=17$ - $n_{\text{PA inm}}=10$ - $n_{\text{PA}}=7$ 71

4.4.	Propiedades pasivas y espontáneas de células ND1⁺ en el <i>pallium</i> del pez cebra. (A) Distribución de neuronas registradas en la línea transgénica tg(NeuroD1:GCaMP6f), en función de su posición respecto a la ZPV y de su capacidad de disparo de PA. (B) Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades pasivas de la membrana: resistencia de membrana en reposo (R_m), capacitancia de membrana (C_m) y potencial de reposo (V_m). (C) Corrientes de sodio (I_{Na}) y potasio (I_K). (D) Amplitud (izquierda) y frecuencia (derecha) de EPSCs. Flecha negra: célula registrada que no presento disparo de PA. Ajuste a regresión lineal simple: no significativos. $n_{s/PA}=1$ - $n_{PA}=6$	73
4.5.	Propiedades activas de células ND1⁺ en el <i>pallium</i> del pez cebra. Distribución espacial (respecto de la ZPV, en μm) de las propiedades de disparo de PA de la membrana. (A) Umbral (izquierda, PAumb), amplitud (centro, PAamp) y frecuencia (derecha, PAfrec) del disparo de PA. (B) Duración del PA (APD). (C) Amplitud de la <i>After hyperpolarization</i> (AHPamp). Regresión lineal AHP: $R^2=0.667$, $P_v=0.0007$. $n_{total,PA}=6$	74
4.6.	Frecuencia de disparos de PA en células GABAérgicas y glutamatérgicas. (A) Número de células registradas ($gad1b^+$ y ND1 ⁺) en función de la posición (próximas a la ZPV -0 a 100- o alejadas <100-) que presentaron uno o múltiples disparos de PA. Proporciones: neuronas maduras:inmaduras. (B-C) Pasos de voltaje depolarizante (10mV) evocan diferente respuesta según fenotipo neuronal y posición en la ZPV: neurona GABAérgica alejada (B) o cercana a la ZPV (B') y neurona glutamatérgica (C). Trazos completos en ApéndiceA.5.	76
5.1.	Protocolo de modulación de las zonas proliferativas del <i>pallium</i> del pez cebra. Los peces fueron expuestos durante un mes a distintos tratamientos luego de haber sido inyectados con EdU (A, panel izquierdo) y luego se procesó el cerebro entero mediante técnicas inmunohistoquímicas para evaluar diferencias en regiones Dm y Dl del <i>pallium</i> (A, panel derecho). Durante el tiempo de tratamiento se los mantuvo en condiciones de ambiente enriquecido (B, B', B''), restricción social (C, C', C'') o en condiciones control (D, D', D''). Dm: dorso-medial, Dl: dorso-lateral.	80
5.2.	Protocolo de ajuste de profundidad de Dm para evitar sesgo de profundidad. Panel superior izquierdo: Se determinó para la región medial del telencéfalo cual era el ancho del mismo (b) y la profundidad de Dm (a) según el Atlas de Wullimann et al. (1996). Panel superior derecho: Con esos datos se midió el ancho de todos los cerebros del experimento y se seleccionó el más ancho de todos. Se determinó la profundidad de Dm para ese cerebro en % y luego se aplicó la misma metodología para determinar la profundidad de todos los telencéfalos (Panel inferior). De esa manera las proyecciones ortogonales y las cuantificaciones 3D abarcaron la misma profundidad de Dm y Dl para todos los individuos muestreados.	82

- 5.3. **Protocolo de procesamiento y cuantificación de células.** (A) Imágenes representativas de la proyección ortogonal de la marca de EdU (izquierda) y PCNA (derecha) en un hemisferio telencefálico. (B) Ejemplo de marca y cuantificación de EdU con señalización de los parámetros necesarios para el ajuste y subdivisión de regiones. (C) Células EdU luego del procesamiento de alineación del eje de coordenadas. (D) Diagrama de las regiones Dm y Dl con sus respectivas subdivisiones. (E) Ejemplo de subregión analizada, en ese caso es Dm rostral1. $X_{máx}$ y X_{min} : extremos del eje lateral; $Y_{máx}$ y Y_{min} : extremos del eje rostro-caudal; (X_m, Y_m) : posición central del hemisferio; X_c, Y_c : posición de la comisura. 84
- 5.4. **Distribución de CMNs EdU⁺ a 32 dpi en el *pallium* telencefálico en ambiente enriquecido.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis. (B-C') Histograma del eje lateral y rostro-caudal (B-C, panel superior) y *heat map* (B-C, panel inferior). Para su realización se superpusieron las matrices de puntos de las células cuantificadas de todos los individuos de un mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (AE). AE: ambiente enriquecido. R:rostral, M: medial, C:caudal, L: lateral. $n=5$ por tratamiento. 85
- 5.5. **Sobrevida de CMNs EdU⁺ a 32 dpi en las distintas regiones del *pallium* en ambiente enriquecido.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células EdU⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). AE: ambiente enriquecido. $n=5$ por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental. 86
- 5.6. **CMNs mitóticas PCNA⁺ en el *pallium* del pez cebra luego de exposición durante 32 días a ambiente enriquecido.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis de CMNs proliferantes (PCNA⁺). (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal (B-C, panel superior) y *heat map* (B-C, panel inferior). Para su realización se superpusieron las matrices de puntos de las células cuantificadas de todos los individuos de un mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (AE). AE: ambiente enriquecido. R:rostral, M: medial, C:caudal, L: lateral. $n=5$ por tratamiento. 87

- 5.7. **CMNs mitóticas PCNA⁺ en el *pallium* del pez cebra luego de exposición durante 32 días a ambiente enriquecido.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células EdU⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). AE: ambiente enriquecido. $n=5$ por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental. 88
- 5.8. **Sobrevida de CMNs por exposición de 32 días a restricción social.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU, seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis. (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal para el tratamiento (B-C, panel superior) y *heat map* de ambos (B-C, panel inferior). Se superpusieron la totalidad de células cuantificadas para todos los individuos del mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (RS). RS: restricción social. R:rostral, C:caudal. $n=5$ por tratamiento. 90
- 5.9. **Sobrevida de CMNs EdU⁺ con 32 dpi de exposición a restricción social y en las distintas regiones del *pallium*.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células EdU⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). AE: ambiente enriquecido. $n=5$ por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental. 91
- 5.10. **CMNs mitóticas luego de 32 días de exposición a AS.** (A) Diseño experimental, inyección de EdU, seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis del marcador de proliferación PCNA. (B-C) Histograma del eje lateral y rostro-caudal para el tratamiento (B-C, panel superior) y *heat map* de ambos (B-C, panel inferior). Se superpusieron la totalidad de células cuantificadas para todos los individuos del mismo tratamiento. (D) Resultados de la prueba Z de Kolmogorov-smirnov, comparando para cada eje por separado el control (Ctrl) con el tratamiento (RS). RS: restricción social. R:rostral, C:caudal. $n=5$ por tratamiento. 92

5.11. CMNs mitóticas PCNA ⁺ en el <i>pallium</i> del pez cebra luego de exposición durante 32 días a restricción social. (A) Diseño experimental, inyección de EdU seguida de 32 días de exposición al tratamiento y posterior análisis de la proliferación por regiones (20 regiones: 10 correspondientes a Dm y 10 a Dl). (B-C) n° de células PCNA ⁺ en las regiones rostral, rostro-medial, medial, medio-caudal y caudal de Dm lateral (B, panel superior), Dm central (B, panel inferior), Dl central (C, panel superior) y Dl lateral (C, panel inferior). RS: restricción social. <i>n</i> =5 por tratamiento. El análisis estadístico se realizó para los tres tratamientos (ambiente enriquecido, restricción social y control) ya que se utilizó el mismo control para ambos, como se describe en la estrategia experimental.	93
6.1. Resumen de resultados de la caracterización general de la neurogénesis adulta. % de colocalización con EdU a 4 y 64 dpi de los distintos marcadores (gad1b, ND1, PCNA) en las regiones rostral, medial y caudal, tanto para Dm (izquierda) como Dl (derecha). <i>Aclaración:</i> los datos de gad1b corresponden a 8 dpi.	96
6.2. Resumen de resultados obtenidos a partir de registros electrofisiológicos de neuronas del <i>pallium</i> medial. Propiedades que siguieron la tendencia esperada para la hipótesis de distribución espacial y madurez en células GABAérgicas (azul) y glutamatérgicas (naranja).	96
6.3. Resumen de resultados de modulación de la neurogénesis adulta. Efecto de modulación de la neurogénesis adulta por exposición a AE y RS. Tratamientos aplicados y regiones que presentaron diferencias (cuadro gris) respecto del grupo control.	97
A.1. Reacción de <i>click</i> . La molécula de EdU se incorpora al DNA en las posiciones correspondientes a la timidina y, en presencia de una azida unida a molécula fluorescente (con Cu(I) como catalizador y ascorbato de Na) permite el revelado. Figura modificada de Le Droumaguet et al. (2010).	101
A.2. Curva temporal de distribución espacial de la cohorte marcada de CMNs a distintos tiempos. Gradiente de distribución rostro-caudal de células EdU ⁺ en la región Dm (panel superior, naranja) y Dl (panel inferior, azul) a 4, 8, 16, 32 y 64 dpi. R: rostral, M: medial, C: caudal. Test de Friedman, comparaciones múltiples de Dunn's, * <i>p</i> <0.05 ** <i>p</i> <0.01, <i>n</i> _{4dpi} = 8, <i>n</i> _{8dpi} = 4, <i>n</i> _{16dpi} = 4, <i>n</i> _{32dpi} = 5, <i>n</i> _{64dpi} = 6. R: rostral, M: medial, C: caudal.	102

A.3. Medición de la posición de la cohorte de células EdU⁺. A) Panel superior: vista esquemática sagital del telencéfalo del pez cebra, indicando la posición de la sección coronal rostral (R, a modo de ejemplo). Panel inferior: magnificación de la sección esquemática en estudio, el círculo negro indica el punto de referencia a partir del cual se extienden líneas virtuales radialmente hacia cada una de las células EdU ⁺ . B) Sección representativa de tejido teñido por reacción de <i>click</i> para revelado de EdU en región rostral. Los recuadros indican sucesivas magnificaciones correspondientes a la región Dm (naranja) y Dl (azul). Las flechas representan la distancia medida desde la célula hasta el borde del pallium. ZPV: zona periventricular.	103
A.4. Ajuste del decaimiento de la progenie de células marcadas a una función exponencial. (A) Curso temporal de la sobrevivencia de CMNs marcadas con EdU. (B) Curso temporal de la neurogénesis adulta glutamatérgica. (C) Curso temporal de la proliferación de CMNs. (D) Curso temporal de la neurogénesis adulta GABAérgica. Naranja: Dm, Azul: Dl. Dm-R: región rostral de Dm, Dm-C: región caudal de Dm, Dl-R: región rostral de Dl, Dl-C: región caudal de Dl.	105
A.5. Trazo de neurona GABAérgica madura posicionada a 138 μm de la ZPV. (A) Corrientes post-sinápticas evocadas por pulsos de voltaje despolarizante de (10mV). (B) Potencial de membrana evocado por pulsos de corriente depolarizante. (C) Derivada del potencial de membrana dV/dt en función del potencial. (D, E) Corrientes post-sinápticas espontáneas.	106
A.6. Trazo de neurona GABAérgica inmadura posicionada a 26 μm de la ZPV. (A) Corrientes post-sinápticas evocadas por pulsos de voltaje despolarizante de (10mV). (B) Potencial de membrana evocado por pulsos de corriente depolarizante. (C) Derivada del potencial de membrana dV/dt en función del potencial. (D,E) Corrientes post-sinápticas espontáneas.	107
A.7. Trazo de neurona glutamatérgica inmadura posicionada a 37 μm de la ZPV. (A) Corrientes post-sinápticas evocadas por pulsos de voltaje despolarizante de (10mV). (B) Potencial de membrana evocado por pulsos de corriente depolarizante. (C) Derivada del potencial de membrana dV/dt en función del potencial. (D,E) Corrientes post-sinápticas espontáneas.	108

Índice de cuadros

2.1. Anticuerpos primarios implementados.	28
2.2. Anticuerpos secundarios implementados.	28
2.3. Soluciones de revelado de EdU por reacción de click.	28
3.1. Datos extraídos de la cuantificación de células EdU⁺ en Dm rostral y Dl caudal. Valores promedio del número de células marcadas y cuantificadas en las regiones Dm-rostral y Dl-caudal del <i>pallium</i> a 4 días de la marcación, media $\pm$ SEM y su respectiva tasa de decaimiento en el tiempo. $n_{4dpi} = 8$	43
4.1. Los datos de las neuronas <i>gad1b</i> ⁺ se agruparon por condición de disparo de PA: las células sin PA (sin PA), las que presentaron PA inmaduro (PA inmaduro) y las que disparaban PA maduros (PA maduro). Se muestra el re- sumen de los valores obtenidos de las propiedades de las neuronas en valores de media $\pm$ SEM. El número de células analizadas se indica entre paréntesis. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn's post hoc. (a) * $p < 0,05$; (b) **** $p < 0,0001$. Los datos de cada célula individual pueden observarse en el ApéndiceA.6.	69

4.2. Los datos de las neuronas ND1 ⁺ se agruparon por condición de disparo de PA: la célula sin PA (sin PA) y las que disparaban PA maduros (PA maduro). Se muestra el resumen de los valores obtenidos de las propiedades de las neuronas maduras en valores de media $\pm$ SEM. El número de células analizadas se indica entre paréntesis. Debido a falta de n muestral no se realizaron análisis comparativos entre grupos. Los datos de cada célula individual pueden observarse en el ApéndiceA.7.	72
5.1. Parámetros considerados para la subdivisión de regiones del <i>pallium</i>	83
A.1. Coeficientes de ajuste del decaimiento de la progenie de células marcadas a una función exponencial. EdU solo: tasa de disminución del número de células EdU ⁺ con el tiempo. PCNA-EdU: células mitóticas. ND1-EdU: células glutamatérgicas. gad1b-EdU: células GABAérgicas. Coeficientes: La suma de 'a' y 'b' el número de células por unidad de área que se marcaron a tiempo 0. El coeficiente 'c' es la tasa de decaimiento del número de células con el tiempo. Significancia de los coeficientes: *p<0,05, **p<0,01.	104
A.2. Propiedades pasivas de la membrana de células gad1b⁺, de la línea transgénica tg(gad1b:GFP). Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 23 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.2B,C.	109
A.3. Propiedades activas de la membrana de células gad1b⁺, de la línea transgénica tg(gad1b:GFP). Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 23 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.3D.	110
A.4. Propiedades pasivas de la membrana de células ND1⁺, de la línea transgénica tg(ND1:GCamp6). Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 7 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.4B,C.	111
A.5. Propiedades activas de la membrana de células ND1⁺, de la línea transgénica tg(ND1:GCamp6). Los datos de las neuronas se ordenaron por distancia de la ZPV, corresponden a las 7 neuronas registradas que se encuentran graficados en la Figura 4.5D.	111

Bibliografía

- Aasebø, I. E., Kasture, A. S., Passeggeri, M., and Tashiro, A. (2018). A behavioral task with more opportunities for memory acquisition promotes the survival of new neurons in the adult dentate gyrus. *Scientific Reports*, 8(1):7369.
- Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M., and Bally-Cuif, L. (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, G. D., Deng, W., and Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*.
- Alvarez, D. D., Giacomini, D., Yang, S. M., Trincherro, M. F., Temprana, S. G., Büttner, K. A., Beltramone, N., and Schinder, A. F. (2016). A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells. *Science*, 354(6311):459–465.
- Alvarez-Buylla, A. and Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 22(3):629–634.
- Anacker, C. and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility—linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6):335–346.
- Anacker, C., Luna, V. M., Stevens, G. S., Millette, A., Shores, R., Jimenez, J. C., Chen, B., and Hen, R. (2018). Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature*, 559(7712):98–102.

- Arredondo, S. B., Valenzuela-Bezanilla, D., Mardones, M. D., and Varela-Nallar, L. (2020). Role of wnt signaling in adult hippocampal neurogenesis in health and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8:860.
- Ausas, M. S., Mazzitelli-Fuentes, L., Roman, F. R., Crichigno, S. A., De Vincenti, A. P., and Mongiat, L. A. (2019). Social isolation impairs active avoidance performance and decreases neurogenesis in the dorsomedial telencephalon of rainbow trout. *Physiology & behavior*, 198:1–10.
- Barbosa, J. S., Sanchez-Gonzalez, R., Di Giaimo, R., Baumgart, E. V., Theis, F. J., Götz, M., and Ninkovic, J. (2015). Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain. *Science*, 348(6236):789–793.
- Bartoszek, E. M., Ostenrath, A. M., Jetty, S. K., Serneels, B., Mutlu, A. K., Chau, K. T. P., and Yaksi, E. (2021). Ongoing habenular activity is driven by forebrain networks and modulated by olfactory stimuli. *Current Biology*, 31(17):3861–3874.
- Beckervordersandforth, R., Ebert, B., Schäffner, I., Moss, J., Fiebig, C., Shin, J., Moore, D. L., Ghosh, L., Trinchero, M. F., Stockburger, C., et al. (2017). Role of mitochondrial metabolism in the control of early lineage progression and aging phenotypes in adult hippocampal neurogenesis. *Neuron*, 93(3):560–573.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., and Kuhn, H. G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 291(1):17–20.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407):31–39.
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell stem cell*, 22(4):589–599.
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G.-l., and Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7):1142–1155.
- Bonfanti, L. (2013). The (real) neurogenic/gliogenic potential of the postnatal and adult brain parenchyma. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Bonfanti, L. and Peretto, P. (2011). Adult neurogenesis in mammals—a theme with many variations. *European Journal of Neuroscience*, 34(6):930–950.
- Boulanger-Weill, J., Candat, V., Jouary, A., Romano, S. A., Pérez-Schuster, V., and Sumbre, G. (2017). Functional interactions between newborn and mature neurons leading to integration into established neuronal circuits. *Current Biology*, 27(12):1707–1720.

- Boutin, C., Hardt, O., De Chevigny, A., Coré, N., Goebbels, S., Seidenfaden, R., Bosio, A., and Cremer, H. (2010). Neurod1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3):1201–1206.
- Brenet, A., Hassan-Abdi, R., Somkhit, J., Yanicostas, C., and Soussi-Yanicostas, N. (2019). Defective excitatory/inhibitory synaptic balance and increased neuron apoptosis in a zebrafish model of dravet syndrome. *Cells*, 8(10):1199.
- Brill, M. S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R. D., Ozen, I., Yang, R., Lepier, A., Gascón, S., Erdelyi, F., Szabo, G., et al. (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature neuroscience*, 12(12):1524–1533.
- Broglio, C., Rodríguez, F., Gómez, A., Arias, J., and Salas, C. (2010). Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behavioural brain research*, 210(2):191–201.
- Burke, S. N. and Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in neurosciences*, 33(3):153–161.
- Cameron, H. A. and McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of comparative neurology*, 435(4):406–417.
- Chapouton, P., Skupien, P., Hesl, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N. D., et al. (2010). Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 30(23):7961–7974.
- Chehrehasa, F., Meedeniya, A. C., Dwyer, P., Abrahamsen, G., and Mackay-Sim, A. (2009). Edu, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *Journal of neuroscience methods*, 177(1):122–130.
- Cho, J.-H. and Tsai, M.-J. (2004). The role of beta2/neurod1 in the development of the nervous system. *Molecular neurobiology*, 30:35–47.
- Christian, K. M., Song, H., and Ming, G.-l. (2014). Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Annual review of neuroscience*, 37:243–262.
- Clelland, C., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr, G., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L., Barker, R., Gage, F., et al. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937):210–213.
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H. N., and Stackman, R. W. (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current Biology*, 23(17):1685–1690.
- Cosacak, M. I., Bhattarai, P., and Kizil, C. (2020). Alzheimer’s disease, neural stem cells and neurogenesis: cellular phase at single-cell level. *Neural Regeneration Research*, 15(5):824.

- Cosacak, M. I., Bhattarai, P., Reinhardt, S., Petzold, A., Dahl, A., Zhang, Y., and Kizil, C. (2019). Single-cell transcriptomics analyses of neural stem cell heterogeneity and contextual plasticity in a zebrafish brain model of amyloid toxicity. *Cell Reports*, 27(4):1307–1318.
- Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., Rumsey, J. M., Hicks, R., Cameron, J., Chen, D., et al. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*, 134(6):1591–1609.
- Deng, W., Aimone, J. B., and Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews neuroscience*, 11(5):339–350.
- Dennis, D. J., Han, S., and Schuurmans, C. (2019). bhlh transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. *Brain research*, 1705:48–65.
- Diotel, N., Lübke, L., Strähle, U., and Rastegar, S. (2020). Common and distinct features of adult neurogenesis and regeneration in the telencephalon of zebrafish and mammals. *Frontiers in neuroscience*, 14:957.
- Dirian, L., Galant, S., Coolen, M., Chen, W., Bedu, S., Houart, C., Bally-Cuif, L., and Foucher, I. (2014). Spatial regionalization and heterochrony in the formation of adult pallial neural stem cells. *Developmental cell*, 30(2):123–136.
- Dray, N., Bedu, S., Vuillemin, N., Alunni, A., Coolen, M., Krecsmarik, M., Supatto, W., Beaurepaire, E., and Bally-Cuif, L. (2015). Large-scale live imaging of adult neural stem cells in their endogenous niche. *Development*, 142(20):3592–3600.
- Dulken, B. W., Leeman, D. S., Boutet, S. C., Hebestreit, K., and Brunet, A. (2017). Single-cell transcriptomic analysis defines heterogeneity and transcriptional dynamics in the adult neural stem cell lineage. *Cell reports*, 18(3):777–790.
- Duman, R. S., Nakagawa, S., and Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*, 25(6):836–844.
- 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., Chung, M., and Castellano, J. F. (2013). Influence of long-term social interaction on chirping behavior, steroid levels and neurogenesis in weakly electric fish. *Journal of Experimental Biology*, 216(13):2434–2441.
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrösy, M. D., Panatier, A., Rodríguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olié, S. H. R., Piazza, P.-V., and Abrous, D. N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology*, 5(8):e214.

- Dupret, D., Revest, J.-M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N., and Piazza, P. V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS one*, 3(4):e1959.
- Durán, E., Ocaña, F. M., Broglio, C., Rodríguez, F., and Salas, C. (2010). Lateral but not medial telencephalic pallium ablation impairs the use of goldfish spatial allocentric strategies in a “hole-board” task. *Behavioural Brain Research*, 214(2):480–487.
- Edelmann, K., Glashauser, L., Sprungala, S., Hesl, B., Fritschle, M., Ninkovic, J., Godinho, L., and Chapouton, P. (2013). Increased radial glia quiescence, decreased reactivation upon injury and unaltered neuroblast behavior underlie decreased neurogenesis in the aging zebrafish telencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 521(13):3099–3115.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11):1313–1317.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5):1072–1083.
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., and Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *Journal of Neuroscience*, 25(44):10074–10086.
- Fanselow, M. S. and Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1):7–19.
- Ferretti, P. (2011). Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution? *European Journal of Neuroscience*, 34(6):951–962.
- Finkel, Z., Esteban, F., Rodriguez, B., Fu, T., Ai, X., and Cai, L. (2021). Diversity of adult neural stem and progenitor cells in physiology and disease. *Cells*, 10(8):2045.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.-L., Anderson, D. J., and Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development*, 14(1):67–80.
- Forsatkar, M. N., Safari, O., and Boiti, C. (2017). Effects of social isolation on growth, stress response, and immunity of zebrafish. *Acta Ethologica*, 20:255–261.
- Forsburg, S. L. (2008). The mcm helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochemical Society Transactions*, 36(1):114–119.
- Fortin, N. J., Agster, K. L., and Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nature neuroscience*, 5(5):458–462.

- Furlan, G., Cuccioli, V., Vuillemin, N., Dirian, L., Muntasell, A. J., Coolen, M., Dray, N., Bedu, S., Houart, C., Beaurepaire, E., et al. (2017). Life-long neurogenic activity of individual neural stem cells and continuous growth establish an outside-in architecture in the teleost pallium. *Current Biology*, 27(21):3288–3301.
- Ganz, J. and 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., and Brand, M. (2012). Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. *Journal of Comparative Neurology*, 520(3):633–655.
- Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., Kaslin, J., and Brand, M. (2014). Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular. *F1000Research*.
- Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., Kaslin, J., and Brand, M. (2015). Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000Research*, 3(308):308.
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.-D., and Lledo, P.-M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4):1823–1828.
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., and DeCoteau, W. E. (1998). Memory for spatial location: role of the hippocampus in mediating spatial pattern separation. *Journal of Neuroscience*, 18(2):804–810.
- Gómez, Y., Vargas, J. P., Portavella, M., and López, J. C. (2006). Spatial learning and goldfish telencephalon nmda receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(3):252–262.
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., and Gage, F. H. (2016). Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell*, 167(4):897–914.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and 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.
- Groneberg, A. H., Marques, J. C., Martins, A. L., Del Corral, R. D., de Polavieja, G. G., and Orger, M. B. (2020). Early-life social experience shapes social avoidance reactions in larval zebrafish. *Current Biology*, 30(20):4009–4021.
- Guillemot, F., Molnár, Z., Tarabykin, V., and Stoykova, A. (2006). Molecular mechanisms of cortical differentiation. *European Journal of Neuroscience*, 23(4):857–868.

- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature neuroscience*, 14(11):1481–1488.
- Heine, V. M., Maslam, S., Joëls, M., and Lucassen, P. J. (2004). Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus–pituitary–adrenal axis activation. *Neurobiology of aging*, 25(3):361–375.
- Hevner, R. F., Hodge, R. D., Daza, R. A., and Englund, C. (2006). Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neuroscience research*, 55(3):223–233.
- Hinsch, K. and Zupanc, G. (2007). Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience*, 146(2):679–696.
- Hodge, R. D., Kahoud, R. J., and Hevner, R. F. (2012). Transcriptional control of glutamatergic differentiation during adult neurogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69:2125–2134.
- Holtmaat, A. and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9):647–658.
- Hsieh, J. (2012). Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes & development*, 26(10):1010–1021.
- Huang, K.-H., Rupprecht, P., Frank, T., Kawakami, K., Bouwmeester, T., and Friedrich, R. W. (2020). A virtual reality system to analyze neural activity and behavior in adult zebrafish. *Nature methods*, 17(3):343–351.
- Hulme, A. J., Maksour, S., Glover, M. S.-C., Miellet, S., and Dottori, M. (2021). Making neurons, made easy: The use of neurogenin-2 in neuronal differentiation. *Stem Cell Reports*.
- Ibi, D., Takuma, K., Koike, H., Mizoguchi, H., Tsuritani, K., Kuwahara, Y., Kamei, H., Nagai, T., Yoneda, Y., Nabeshima, T., et al. (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., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience*, 11(10):1153–1161.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010). Essential roles of notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *Journal of Neuroscience*, 30(9):3489–3498.

- Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H., and Ohshima, T. (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Developmental biology*, 342(1):26–38.
- Jeon, B. S., Kholodilov, N. G., Oo, T. F., Kim, S.-Y., Tomaselli, K. J., Srinivasan, A., Stefanis, L., and Burke, R. E. (1999). Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *Journal of neurochemistry*, 73(1):322–333.
- Jurikova, M., Danihel, L., Polák, Š., and Varga, I. (2016). Ki67, pcna, and mcm proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta histochemica*, 118(5):544–552.
- Kaslin, J., Ganz, J., and 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., and Brand, M. (2009). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *Journal of Neuroscience*, 29(19):6142–6153.
- Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., and Gotoh, Y. (2013). Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature communications*, 4(1):1880.
- Kelman, Z. (1997). Pcn: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6):629–640.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624):493–495.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 18(9):3206–3212.
- Kim, E., Jeong, I., Chung, A.-Y., Kim, S., Kwon, S.-H., Seong, J. Y., and Park, H.-C. (2019). Distribution and neuronal circuit of spexin 1/2 neurons in the zebrafish cns. *Scientific reports*, 9(1):5025.
- Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V., and Brand, M. (2012). Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Developmental neurobiology*, 72(3):429–461.
- Krzisch, M., Temprana, S. G., Mongiat, L. A., Armida, J., Schmutz, V., Virtanen, M. A., Kocher-Braissant, J., Kraftsik, R., Vutsikits, L., Conzelmann, K.-K., et al. (2015). Pre-existing astrocytes form functional perisynaptic processes on neurons generated in the adult hippocampus. *Brain Structure and Function*, 220:2027–2042.
- Kuhn, H. G. and Eisch, A. J. (2014). *Neural stem cells in development, adulthood and disease*. Springer.

- La Rosa, C., Ghibaudi, M., and Bonfanti, L. (2019). Newly generated and non-newly generated “immature” neurons in the mammalian brain: a possible reservoir of young cells to prevent brain aging and disease? *Journal of clinical medicine*, 8(5):685.
- Labusch, M., Mancini, L., Morizet, D., and 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., Ailani, D., Kotani, Y., Muto, A., Itoh, M., Iwasaki, M., Wada, H., Yaksi, E., et al. (2018). Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish. *BMC biology*, 16:1–18.
- Lam, C. S., März, M., and Strähle, U. (2009). Gfap and nestin reporter lines reveal characteristics of neural progenitors in the adult zebrafish brain. *Developmental Dynamics*, 238(2):475–486.
- Lange, C., Rost, F., Machate, A., Reinhardt, S., Lesche, M., Weber, A., Kuscha, V., Dahl, A., Rulands, S., and Brand, M. (2020). Single cell sequencing of radial glia progeny reveals the diversity of newborn neurons in the adult zebrafish brain. *Development*, 147(1):dev185595.
- Le Droumaguet, C., Wang, C., and Wang, Q. (2010). Fluorogenic click reaction. *Chemical Society Reviews*, 39(4):1233–1239.
- Leasure, J. L. and Decker, L. (2009). Social isolation prevents exercise-induced proliferation of hippocampal progenitor cells in female rats. *Hippocampus*, 19(10):907–912.
- Lee, S. W., Clemenson, G. D., and Gage, F. H. (2012). New neurons in an aged brain. *Behavioural brain research*, 227(2):497–507.
- Li, K., Lee, L. A., Lu, X., and Wang, Q. (2010). Fluorogenic “click” reaction for labeling and detection of dna in proliferating cells. *Biotechniques*, 49(1):525–527.
- Liao, M., Kundap, U., Rosch, R. E., Burrows, D. R., Meyer, M. P., Ouled Amar Bencheikh, B., Cossette, P., and Samarut, É. (2019). Targeted knockout of gaba-a receptor gamma 2 subunit provokes transient light-induced reflex seizures in zebrafish larvae. *Disease models & mechanisms*, 12(11):dmm040782.
- Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A. (2016). The adult ventricular–subventricular zone (v-svz) and olfactory bulb (ob) neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(5):a018820.
- Lindsey, B. W., Darabie, A., and Tropepe, V. (2012). The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 520(10):2275–2316.
- Lindsey, B. W. and Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in neurobiology*, 80(6):281–307.

- Lindsey, B. W. and 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.
- Liu, L., Wu, J., Wang, S., Kun, L., Gao, J., Chen, B., Ye, Y., Wang, F., Tong, F., Jiang, J., et al. (2021). Control the neural stem cell fate with biohybrid piezoelectrical magnetite micromotors. *Nano Letters*, 21(8):3518–3526.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., and Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3):179–193.
- Marcus, R. C., Delaney, C. L., and Easter, S. S. (1999). Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*danio rerio*). *Visual neuroscience*, 16(3):417–424.
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B., and Schinder, A. F. (2012). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*, 335(6073):1238–1242.
- Martín-Durán, J. M. and Hejnal, A. (2021). A developmental perspective on the evolution of the nervous system. *Developmental biology*, 475:181–192.
- Maruska, K., Soares, M. C., Lima-Maximino, M., de Siqueira-Silva, D. H., and Maximino, C. (2019). Social plasticity in the fish brain: Neuroscientific and ethological aspects. *Brain Research*, 1711:156–172.
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., Lam, C. S., Kah, O., Bally-Cuif, L., and Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia*, 58(7):870–888.
- Mazzitelli-Fuentes, L. S., Román, F. R., Elías, J. R. C., Deleglise, E. B., and Mongiat, L. A. (2022). Spatial learning promotes adult neurogenesis in specific regions of the zebrafish pallium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.
- Miller, J. P., Yeh, N., Vidal, A., and Koff, A. (2007). Interweaving the cell cycle machinery with cell differentiation. *Cell cycle*, 6(23):2932–2938.
- Miller, M. W. and Nowakowski, R. (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.
- Ming, G.-l. and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4):687–702.
- Moizeszowicz, J. (2007). Psicofarmacología psicodinámica iv, actualizaciones 2007.
- Mongiat, L. A., Espósito, M. S., Lombardi, G., and Schinder, A. F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PloS one*, 4(4):e5320.

- Mongiat, L. A. and Schinder, A. F. (2011). Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *European Journal of Neuroscience*, 33(6):1055–1061.
- Mongiat, L. A. and Schinder, A. F. (2014). A price to pay for adult neurogenesis. *Science*, 344(6184):594–595.
- Moradi, H. R., Hajali, V., Khaksar, Z., Vafae, F., Forouzanfar, F., and Negah, S. S. (2021). The next step of neurogenesis in the context of alzheimer’s disease. *Molecular Biology Reports*, 48(7):5647–5660.
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with alzheimer’s disease. *Nature medicine*, 25(4):554–560.
- Mueller, T. (2022). The everted amygdala of ray-finned fish: Zebrafish makes a case. *Brain, Behavior and Evolution*, pages 1–15.
- Mueller, T., Dong, Z., Berberoglu, M. A., and Guo, S. (2011). The dorsal pallium in zebrafish, danio rerio (cyprinidae, teleostei). *Brain research*, 1381:95–105.
- Mueller, T., Vernier, P., and Wullimann, M. F. (2006). A phylotypic stage in vertebrate brain development: Gaba cell patterns in zebrafish compared with mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 494(4):620–634.
- Mueller, T. and Wullimann, M. (2015). *Atlas of early zebrafish brain development: a tool for molecular neurogenetics*. Academic Press.
- Mueller, T. and Wullimann, M. F. (2002). Expression domains of neurod (nrd) in the early postembryonic zebrafish brain. *Brain research bulletin*, 57(3-4):377–379.
- Mueller, T. and Wullimann, M. F. (2009). An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain, behavior and evolution*, 74(1):30–42.
- Mueller, T., Wullimann, M. F., and Guo, S. (2008). Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish dlx2a, lhx6, lhx7, tbr2 (eomesa), and gad67 gene expression. *Journal of Comparative Neurology*, 507(2):1245–1257.
- Mugnaini, M. (2023). *Influencia de las neuronas nuevas del giro dentado sobre la formación de memorias espaciales en el hipocampo de ratón*. PhD thesis, Laboratorio de Fisiología y Algoritmos del Cerebro, Laboratorio de
- Niibori, Y., Yu, T.-S., Epp, J. R., Akers, K. G., Josselyn, S. A., and Frankland, P. W. (2012). Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal ca3 region. *Nature communications*, 3(1):1253.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., and Eriksson, P. S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of neurobiology*, 39(4):569–578.

- O'Connor, M. J., Beebe, L. L., Deodato, D., Ball, R. E., Page, A. T., VanLeuven, A. J., Harris, K. T., Park, S., Hariharan, V., Lauderdale, J. D., et al. (2018). Bypassing glutamic acid decarboxylase 1 (*gad1*) induced craniofacial defects with a photoactivatable translation blocker morpholino. *ACS chemical neuroscience*, 10(1):266–278.
- Palmer, T. D., Schwartz, P. H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S. A., and Gage, F. H. (2001). Progenitor cells from human brain after death. *Nature*, 411(6833):42–43.
- Palumbo, M. L., Trincherio, M. F., Zorrilla-Zubilete, M. A., Schinder, A. F., and Genaro, A. M. (2012). Glatiramer acetate reverts stress-induced alterations on adult neurogenesis and behavior. involvement of th1/th2 balance. *Brain, behavior, and immunity*, 26(3):429–438.
- Parker, M. O., Brock, A. J., Walton, R. T., and Brennan, C. H. (2013). The role of zebrafish (*danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function. *Frontiers in neural circuits*, 7:63.
- Pearson, B. and Alvarado, A. S. (2008). Regeneration, stem cells, and the evolution of tumor suppression. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 73, pages 565–572. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Perathoner, S., Cordero-Maldonado, M. L., and Crawford, A. D. (2016). Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior. *Journal of neuroscience research*, 94(6):445–462.
- Pérez-Martín, M., Rivera, P., Blanco, E., Lorefice, C., Decara, J., Pavón, F. J., Serrano, A., Rodríguez de Fonseca, F., and Suárez, J. (2016). Environmental enrichment, age, and *ppar α* interact to regulate proliferation in neurogenic niches. *Frontiers in Neuroscience*, 10:89.
- Piatti, V. C., Davies-Sala, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. A., Trincherio, M. F., and Schinder, A. F. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *Journal of Neuroscience*, 31(21):7715–7728.
- Portavella, M., Salas, C., Vargas, J. P., and Papini, M. R. (2003). Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*carassius auratus*). *Physiology & behavior*, 80(1):49–56.
- Portavella, M., Torres, B., and Salas, C. (2004a). 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., and Papini, M. R. (2004b). Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*carassius auratus*). *Neuroscience Letters*, 362(2):75–78.
- Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., and Lledo, P.-M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *Journal of Neuroscience*, 22(7):2679–2689.

- Rothenaigier, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Götz, M., Jagasia, R., and 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.
- Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.-Y., and Brundin, P. (2009). Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while neurod1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PloS one*, 4(3):e4779.
- Roybon, L., Mastracci, T. L., Ribeiro, D., Sussel, L., Brundin, P., and Li, J.-Y. (2010). Gabaergic differentiation induced by mash1 is compromised by the bhlh proteins neurogenin2, neurod1, and neurod2. *Cerebral cortex*, 20(5):1234–1244.
- Rupprecht, P., Prendergast, A., Wyart, C., and Friedrich, R. W. (2016). Remote z-scanning with a macroscopic voice coil motor for fast 3d multiphoton laser scanning microscopy. *Biomedical optics express*, 7(5):1656–1671.
- Satou, C., Kimura, Y., Hirata, H., Suster, M. L., Kawakami, K., and Higashijima, S.-i. (2013). Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development*, 140(18):3927–3931.
- Sauerzweig, S., Baldauf, K., Braun, H., and Reymann, K. G. (2009). Time-dependent segmentation of brdu-signal leads to late detection problems in studies using brdu as cell label or proliferation marker. *Journal of neuroscience methods*, 177(1):149–159.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D. R., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., et al. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46):17501–17506.
- Scharfman, H. E. and Gray, W. P. (2007). Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 48:33–41.
- Schmidt, R., Strähle, U., and Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural development*, 8(1):1–13.
- Schoenfeld, T. J. and Gould, E. (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental neurology*, 233(1):12–21.
- Schuurmans, C. and Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current opinion in neurobiology*, 12(1):26–34.
- Seo, D.-o., Carillo, M. A., Lim, S. C.-H., Tanaka, K. F., and Drew, M. R. (2015). Adult hippocampal neurogenesis modulates fear learning through associative and nonassociative mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 35(32):11330–11345.

- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4):359–378.
- Shams, S., Amlani, S., Buske, C., Chatterjee, D., and Gerlai, R. (2018). Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. *Developmental psychobiology*, 60(1):43–56.
- Sidman, R. L., Miale, I. L., and Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental neurology*, 1(4):322–333.
- Song, J., Sun, J., Moss, J., Wen, Z., Sun, G. J., Hsu, D., Zhong, C., Davoudi, H., Christian, K. M., Toni, N., et al. (2013). Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry–neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nature neuroscience*, 16(12):1728–1730.
- Sørensen, C., Nilsson, G. E., Summers, C. H., and Øverli, Ø. (2012). Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Behavioural brain research*, 227(2):311–318.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., et al. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6):1219–1227.
- Spitzer, N. C. (2017). Neurotransmitter switching in the developing and adult brain. *Annual review of neuroscience*, 40:1–19.
- Sung, P.-S., Lin, P.-Y., Liu, C.-H., Su, H.-C., and Tsai, K.-J. (2020). Neuroinflammation and neurogenesis in alzheimer’s disease and potential therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 21(3):701.
- Sunstrum, J. K. and Inoue, W. (2019). Evaluation of synaptic multiplicity using whole-cell patch-clamp electrophysiology. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (146):e59461.
- Tang, H., Li, Y., Tang, W., Zhu, J., Parker, G. C., and Zhang, J. H. (2023). Endogenous neural stem cell–induced neurogenesis after ischemic stroke: Processes for brain repair and perspectives. *Translational stroke research*, 14(3):297–303.
- Temprana, S. G., Mongiat, L. A., Yang, S. M., Trinchero, M. F., Alvarez, D. D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G. M., and Schinder, A. F. (2015). Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron*, 85(1):116–130.
- Than-Trong, E., Kiani, B., Dray, N., Ortica, S., Simons, B., Rulands, S., Alunni, A., and Bally-Cuif, L. (2020). Lineage hierarchies and stochasticity ensure the long-term maintenance of adult neural stem cells. *Science advances*, 6(18):eaaz5424.

- Than-Trong, E., Ortica-Gatti, S., Mella, S., Nepal, C., Alunni, A., and Bally-Cuif, L. (2018). Neural stem cell quiescence and stemness are molecularly distinct outputs of the notch3 signalling cascade in the vertebrate adult brain. *Development*, 145(10):dev161034.
- Thomas, J. L., Ochocinska, M. J., Hitchcock, P. F., and Thummel, R. (2012). Using the tg (nrd: egfp)/albino zebrafish line to characterize in vivo expression of neurod. *PLoS One*, 7(1):e29128.
- Torigoe, M., Islam, T., Kakinuma, H., Fung, C. C. A., Isomura, T., Shimazaki, H., Aoki, T., Fukai, T., and Okamoto, H. (2021). Zebrafish capable of generating future state prediction error show improved active avoidance behavior in virtual reality. *Nature Communications*, 12(1):5712.
- Trinchero, M. F., Buttner, K. A., Cuevas, J. N. S., Temprana, S. G., Fontanet, P. A., Monzón-Salinas, M. C., Ledda, F., Paratcha, G., and Schinder, A. F. (2017). High plasticity of new granule cells in the aging hippocampus. *Cell reports*, 21(5):1129–1139.
- Trinchero, M. F., Herrero, M., Monzón-Salinas, M. C., and Schinder, A. F. (2019a). Experience-dependent structural plasticity of adult-born neurons in the aging hippocampus. *Frontiers in neuroscience*, 13:739.
- Trinchero, M. F., Herrero, M., and Schinder, A. F. (2019b). Rejuvenating the brain with chronic exercise through adult neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 13:1000.
- Tunbak, H., Vazquez-Prada, M., Ryan, T. M., Kampff, A. R., and Dreosti, E. (2020). Whole-brain mapping of socially isolated zebrafish reveals that lonely fish are not loners. *Elife*, 9:e55863.
- Tuncdemir, S. N., Grosmark, A. D., Chung, H., Luna, V. M., Lacefield, C. O., Losonczy, A., and Hen, R. (2022). Adult born hippocampal granule cells promote pattern separation by bidirectionally modulating the remapping of place and cue cells. *bioRxiv*, pages 2022–12.
- Tutukova, S., Tarabykin, V., and Hernandez-Miranda, L. R. (2021). The role of neurod genes in brain development, function, and disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, page 109.
- Urbán, N., van den Berg, D. L., Forget, A., Andersen, J., Demmers, J. A., Hunt, C., Ayrault, O., and Guillemot, F. (2016). Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein. *Science*, 353(6296):292–295.
- Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., and Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23):13427–13431.
- Van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3):191–198.

- Veena, J., Srikumar, B., Mahati, K., Bhagya, V., Raju, T., and Shankaranarayana Rao, B. (2009). Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *Journal of neuroscience research*, 87(4):831–843.
- von Krogh, K., Sørensen, C., Nilsson, G. E., and Øverli, Ø. (2010). Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, danio rerio, kept in enriched or barren environments. *Physiology & behavior*, 101(1):32–39.
- von Trotha, J. W., Vernier, P., and 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.
- Wulliman, M. F., Rupp, B., and Reichert, H. (2012). *Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas*. Birkhäuser.
- Wullimann, M., Rupp, B., Reichert, H., and Easter Jr, S. S. (1996). Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. *Trends in Neurosciences*, 19(11):525.
- Yu, L., Tucci, V., Kishi, S., and Zhdanova, I. V. (2006). Cognitive aging in zebrafish. *PloS one*, 1(1):e14.
- Yun, S., Reynolds, R. P., Masiulis, I., and Eisch, A. J. (2016). Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis. *Nature medicine*, 22(11):1239–1247.
- Zhang, G., Ferg, M., Lübke, L., Takamiya, M., Beil, T., Gourain, V., Diotel, N., Strähle, U., and Rastegar, S. (2020). Bone morphogenetic protein signaling regulates id1-mediated neural stem cell quiescence in the adult zebrafish brain via a phylogenetically conserved enhancer module. *Stem Cells*, 38(7):875–889.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4):645–660.
- Zupanc, G. K., Hinsch, K., and 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. and 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.