



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Psicologia Generale**

**Corso di laurea in Scienze psicologiche cognitive e psicobiologiche**

**Tesi di Laurea Triennale**

**Studio preliminare sul ruolo della lateralizzazione visiva in  
un compito di apprendimento discriminativo**

**Does visual lateralization affect discriminative learning process?**

***Relatore***

**Prof. Marco Dadda**

***Laureanda: Camilla Faccioli***

***Matricola: 2011016***

Anno Accademico 2022-2023



# Indice

<b>1. Abstract</b> .....	5
<b>2. Introduzione</b> .....	7
2.1. Principi che regolano la sperimentazione animale .....	7
2.2. L'impiego degli animali nella ricerca.....	9
2.3. Pesci come modelli sperimentali nella ricerca cognitiva.....	12
2.4. Lo zebrafish come candidato ideale nella ricerca.....	13
2.5. Evoluzione del concetto di lateralizzazione cerebrale .....	14
2.6. La lateralizzazione emisferica .....	18
2.7. Effetti della lateralizzazione cerebrale in performance cognitive .....	20
<b>3. Biologia della specie</b> .....	22
<b>4. Materiali e metodi</b> .....	24
4.1. Soggetti sperimentali.....	24
4.2. Apparato sperimentale .....	25
<b>5. Procedura e stimoli sperimentali</b> .....	26
5.1. Fase di abituação in gruppo .....	28
5.2. Fase di gruppo con stimoli .....	29
5.3. Fase di test individuale.....	29
<b>6. Risultati</b> .....	30
<b>7. Discussione</b> .....	31
<b>8. Bibliografia</b> .....	35
<b>Ringraziamenti</b> .....	41



## 1. Abstract

Lo scopo dell'esperimento è stato quello di indagare i possibili effetti della specializzazione emisferica sull'apprendimento di compiti di discriminazione in larve di *Danio Rerio* (comunemente nota come zebrafish) a 6 dpf (*days post fertilization*).

La procedura sperimentale si basava sull'utilizzo di un paradigma di condizionamento operante, che consisteva nell'apprendimento dell'associazione fra il rinforzo (ricompensa alimentare) e lo stimolo in corrispondenza del quale veniva somministrato, che rimaneva invariato attraverso tutte le fasi dell'esperimento. Gli stimoli erano di tipo visivo, caratterizzati da una figura di riempimento di colore rosso o verde, posti alle estremità opposta dei diversi apparati sperimentali.

La procedura sperimentale, si estendeva per un periodo di 9 giorni ed era suddivisa in 3 fasi: fase di abituazione di gruppo e fase di gruppo con stimoli, svolte nella stessa struttura sperimentale, e fase di test individuale, che prevedeva l'introduzione di un nuovo apparato.

La fase di abituazione di gruppo ha permesso ai soggetti di adattarsi all'apparato sperimentale a forma di clessidra (diviso in due compartimenti grazie a un pannello con foro centrale), che è rimasto invariato anche per la fase successiva.

Nella seconda fase, di gruppo con stimoli, si concentrava la prima fase di addestramento, che prevedeva 2 prove al giorno. Infine, si passava alla fase di test individuale, sulla quale poi è stata poi svolta l'analisi delle videoregistrazioni.

Le larve venivano inserite individualmente in vaschette rettangolari, anch'esse

divise in due scompartimenti da un pannello con foro. I soggetti venivano osservati per 2 prove giornaliere.

Ho eseguito il lavoro di analisi dei primi 60 minuti del primo giorno di test individuale, quantificando la performance di 12 soggetti in 2 modalità: la prima calcolando il totale del tempo trascorso nel settore dello stimolo rinforzato e la seconda calcolando gli episodi in cui il soggetto era orientato con l'occhio destro o con l'occhio sinistro verso lo stimolo rinforzato. L'analisi della preferenza visiva è stata condotta campionando ogni 15 secondi la posizione del soggetto rispetto allo stimolo, indipendentemente dal settore in cui il soggetto si trovava.

Pur riconoscendo i limiti della ricerca condotta, i risultati ottenuti non hanno evidenziato alcun segno significativo di lateralizzazione visiva, ma hanno messo in evidenza una performance diversa legata al colore rinforzato: i soggetti rinforzati sullo stimolo rosso tendono a utilizzare l'occhio destro rispetto ai soggetti rinforzati sul verde.

## 2. Introduzione

### 2.1. Principi che regolano la sperimentazione animale

L'impiego della sperimentazione animale nella ricerca cognitiva risulta fondamentale per una sempre migliore comprensione dello sviluppo dei processi cognitivi umani. L'uso del modello animale come semplificazione del modello umano è reso possibile dalle analoghe caratteristiche anatomiche, fisiologiche e comportamentali riconosciute fra i due modelli; inoltre, il modello animale, al di là delle analogie, risulta meno complesso a livello strutturale e quindi ideale. La ricerca condotta su soggetti animali è pressoché inevitabile nelle circostanze in cui, per ragioni etiche, l'uomo non possa essere scelto come modello sperimentale e posto in determinate condizioni, che però si dimostrano necessarie al fine di comprendere i meccanismi che si stanno indagando.

Quando si ricorre all'uso di animali come soggetti sperimentali, i ricercatori sono obbligati dalla legislazione europea, dedicata alla protezione degli animali impiegati nella sperimentazione scientifica, a rispettare il "principio delle 3 R" introdotto da Russell e Burch nel manuale *The principles of humane experimental technique* (Russel & Burch,1959). Secondo questo principio una ricerca dovrebbe far riferimento a tre importanti concetti: rimpiazzare (*replacement*), ridurre (*reduction*) e rifinire (*refinement*); questi concetti condurrebbero il ricercatore inizialmente ad adoperarsi per rimpiazzare, o sostituire, il modello animale, successivamente per ridurre il numero di individui coinvolti nel procedimento sperimentale, e infine per rifinire, o migliorare, le condizioni a cui sono sottoposti i modelli animali.

Il concetto di *replacement* definisce l'obbligo per il ricercatore di analizzare le possibilità di sostituire il modello animale con modelli alternativi. Russel e Burch introdussero i concetti di rimpiazzo parziale (*relative replacement*) e rimpiazzo completo (*absolute replacement*); nel primo caso risultava comunque necessaria la presenza degli animali, benché fosse probabile non venissero esposti a nessun tipo di sofferenza durante l'esperimento, nel secondo caso, la presenza degli animali non è necessaria in nessuna fase dell'esperimento, ma vengono sostituiti per esempio da simulazioni computerizzate, organoidi, organismi geneticamente modificati e piante.

Il concetto di *reduction* riguarda la riduzione del numero di soggetti utilizzati in una procedura sperimentale, tale comunque da poter garantire un numero di osservazioni sufficienti per dei risultati attendibili e precisi. Si articola in tre possibili livelli di *reduction*: intrasperimentale, sovrasperimentale ed extrasperimentale.

Si parla dunque di una riduzione a livello intrasperimentale, quando effettuata nel singolo esperimento. Questo può avvenire tramite la definizione di obiettivi chiari, pre-screening tramite programmi computerizzati o modelli in vitro, studi pilota, e analisi retrospettive, che partendo dai dati di esperimenti precedenti siano funzionali per individuare il numero corretto di animali sufficienti per l'attendibilità dei dati (senza rischiare di usarne più del necessario) (de Boo & Hendriksen, 2005).

A livello sovrasperimentale la riduzione si riferisce a un cambiamento nel modo di fare ricerca, concentrandosi sulle condizioni e impostazioni in cui vengono



eseguiti gli esperimenti; mira a ridurre il numero di animali coinvolti intervenendo sul contesto in cui si svolgono gli esperimenti. Questo è reso possibile tramite training degli sperimentatori ad un uso più moderato di soggetti sperimentali, ad una riduzione delle eccedenze di allevamento, che se non vendute vengono uccise, ad una rivalutazione delle specifiche caratteristiche richieste agli animali da laboratorio (determinata età, sesso, peso) ed infine ad un riutilizzo di animali e studi longitudinali (de Boo & Hendriksen, 2005).

Segue infine il concetto di riduzione extrasperimentale riferita a concetti che non sono direttamente collegati alla sperimentazione animale. Fa riferimento a buone pratiche di laboratorio (*Good Laboratory Practice*) e buone pratiche di fabbricazione (*Good Manufacturing Practice*), funzionali all'ottenimento di dati affidabili e precisi, e a garantisce la qualità, sicurezza ed efficienza. Segue poi la necessità di conformare le linee guida e le interpretazioni dei dati, così da permettere la condivisione dei risultati, la necessità di nuove strategie di ricerca e di testing (de Boo & Hendriksen, 2005).

Segue infine il concetto di *rifine*, che indica la riduzione a un minimo possibile del disagio imposto agli animali usati nella sperimentazione.

## **2.2. L'impiego degli animali nella ricerca**

Il modello animale, anche tramite tecniche invasive, ha permesso di indagare come si modifica il cervello a seguito di lesioni osservando le modalità di recupero e potendo individuare corretti protocolli riabilitativi. Inoltre, gli esperimenti su modelli animali hanno permesso approfondimenti significativi nello studio dei meccanismi sottostanti i processi mnestici umani. Un esempio ne è la distinzione

della memoria implicita in memoria associativa e non associativa. La memoria associativa fra un comportamento e una risposta è il concetto chiave del condizionamento operante, inizialmente presentato da Edward Lee Thorndike alla fine del diciannovesimo secolo. Venne successivamente ripreso dal comportamentista Burrhus Skinner negli anni '30 e infine negli anni '70 dallo psicologo Richard Herrnstein.

Thorndike, concentrandosi sul comportamento per prove ed errori, introdusse il concetto di condizionamento strumentale. Nel 1905, volendo indagare la capacità di problem solving di un gatto rinchiuso all'interno di una gabbia (*problem box*) al di fuori della quale era posto del cibo, Thorndike consolidò la sua teoria. La gabbia poteva essere aperta dall'interno dal gatto, che inizialmente metteva in atto dei comportamenti alla cieca per cercare di uscire. Quando infine, premendo una leva, riusciva nel suo intento, e veniva re-rinchiuso per una seconda prova, non metteva più in atto i comportamenti che precedentemente non avevano prodotto nessun effetto desiderato, ma anzi il tempo impiegato per uscire dalla gabbia diminuiva significativamente. Dunque, venne presentata la legge dell'effetto, che sostiene che il comportamento seguito da conseguenze positive/desiderate sarà più probabilmente ripetuto rispetto a un comportamento seguito da conseguenze negative.

Un importante approfondimento delle teorie di Thorndike è costituito dagli esperimenti di Skinner che, riprendendo quest'ultimo concetto di legge dell'effetto, introduce il concetto di rinforzo. L'apparato sperimentale era composto da una *Skinner box*, una gabbia all'interno della quale era possibile osservare il comportamento di un topo. La gabbia era provvista di una leva che,

se premuta rilasciava del cibo. Il topo che all'inizio preme casualmente la leva, ottenendo la ricompensa alimentare, apprenderà nel corso delle prove la connessione fra risposta e conseguenza; questo viene definito rinforzo: processo per cui uno stimolo aumenta la probabilità di mettere in atto un comportamento che ha comportato delle conseguenze positive (Skinner, 1932).

Un ulteriore esempio venne proposto da Richard Herrnstein che, seguendo le orme di Skinner, nel 1979 scelse come soggetti sperimentali i piccioni. I piccioni venivano addestrati con un pattern di condizionamento operante: una volta all'interno di una gabbia trovavano un tasto che, se premuto, erogava un granello di cibo. Questo avveniva solo se il tasto veniva premuto quando sullo schermo, presente all'interno della gabbia, appariva l'immagine di un albero, o in varianti dell'esperimento, immagini dell'acqua o di figure femminili. Dopo 5 giorni di addestramento si registrava come i piccioni schiacciassero il tasto solo in corrispondenza dell'immagine dell'albero (in tutto erano state presentate 40 immagini di alberi e 40 immagini neutre); al termine di questo esperimento Herrnstein testò il comportamento dei suoi soggetti davanti a immagini di alberi che non erano state presentate in fase di addestramento, dimostrando come avvenisse un comportamento di generalizzazione davanti a stimoli nuovi appartenenti alla stessa categoria di quelli di addestramento (Herrnstein, 1976). Gli esperimenti condotti allo stesso modo da John Cerella nel 1979 dimostrarono come i piccioni fossero in grado di discriminare: venivano mostrate ai soggetti immagini di foglie di quercia bianca in associazione a una ricompensa alimentare, dimostrando come in seguito acquisissero la capacità di discriminarle da tutti gli altri tipi di foglie (Cerella, 1979).

### **2.3. Pesci come modelli sperimentali nella ricerca cognitiva**

L'etologia ha messo in evidenza come molti comportamenti che si pensava fossero propri di alcune determinate specie di animali, siano in realtà possibili anche nei pesci.

Sono numerosi gli esperimenti che indagano la memoria spaziale nei pesci; una specie usata come soggetto sperimentale è quella di *Gobius soporator*, esemplare di mare appartenente alla famiglia *Gobiidae*. Questi esemplari durante la bassa marea rimangono nelle pozze d'acqua che si creano naturalmente per l'abbassamento del livello del mare (Aronson, 1951). È stato analizzato come però possano saltare da una pozza d'acqua ad un'altra limitrofa, che fino al momento del salto non era visibile. Si spostano da una piscina all'altra sia nel caso in cui quella attuale si stia prosciugando sia nel caso in cui vengano disturbati dallo sperimentatore. Si è dunque dimostrato che, quando il pesce nuota in alta marea acquisisce una mappa mentale della topografia che lo circonda, individuando le potenziali piscine in caso di bassa marea (Aronson, 1951). I pesci soggetti sperimentali degli studi di Aronson dimostravano inoltre di ricordare le posizioni delle pozze d'acqua per 40 giorni anche senza ulteriore esperienza di alta marea (Aronson, 1951). I pesci sono dunque in grado di creare rappresentazioni dello spazio circostante e mantenerle in memoria a lungo termine.

Oltre alle abilità spaziali e di memoria a lungo termine sono state recentemente indagate le abilità numeriche nei pesci, in particolar modo di 54 esemplari adulti femmina di *Gambusia helbrooki*. Ai soggetti venivano proposti stimoli che potevano riguardare quantità differenti di cibo oppure quantità differenti nella

numerosità di un branco. Dunque, si è dimostrato che i pesci, in seguito a una fase di addestramento, sono in grado di discriminare due gruppi in base alla numerosità (Dadda et al., 2009), e successivamente che questa abilità rimane intatta anche per ridotte differenze numeriche (Agrillo, Miletto Petrazzini & Bisazza, 2017).

#### **2.4. Lo zebrafish come candidato ideale nella ricerca**

Come già trattato nei paragrafi precedenti, i pesci hanno molte somiglianze con l'essere umano, il che li rende candidati ideali per l'indagine delle funzioni umane fin dai primi giorni di vita.

Un esempio lampante sono le larve di zebrafish, che a 7 giorni dalla fecondazione hanno circa 100.000 neuroni (Feierstein, Portugues & Orger, 2015); la velocità di sviluppo, sia a livello corticale che anatomico generale (Perathoner, Cordero-Maldonado & Crawford, 2016), unita alla trasparenza del corpo (Fetcho & O'Malley, 1995) li rende dei soggetti sperimentali esemplari per l'analisi dell'attività di gruppi di neuroni, di capacità di apprendimento associativo, non associativo e di memoria (Roberts, Bill & Glanzman, 2013).

Il teleosteo zebrafish, nome comune per la specie scientifica *Danio Rerio*, venne usato per la prima volta dal biologo molecolare George Streisinger, che venne poi definito il padre fondatore delle ricerche su questo esemplare. Nel 1981, volendo studiare le modificazioni genetiche, e necessitando come soggetti sperimentali degli individui di dimensione ridotta, dallo sviluppo veloce e riproduzione prolifica, scelse questa specie che trovò poi una sempre maggiore

applicazione in ambito di ricerca. L'impiego dello zebrafish si estende dall'ambito biomedico all'ambito di ricerca cognitiva e neurodegenerativa.

Questa specie ci dimostra ideale negli studi di trapianto di cellule tumorali (Amatruda et al., 2002): una volta trapiantate infatti le linee tumorali nello zebrafish si procede con l'analisi delle caratteristiche migratorie, capacità di formare metastasi e nuovi vasi sanguigni. Infine, questa specie è fondamentale nella branca farmacologica, si comporta da modello grazie al funzionamento precoce (già a 3 giorni dopo la fertilizzazione) della barriera emato-encefalica (Jeong et al., 2008) e alla caratteristica di permeabilità agli agenti chimici che possono essere disciolti nell'acqua permettendo di studiarne in maniera veloce gli effetti (Goldsmith, 2004).

Nella branca della ricerca cognitiva invece si viene impiegata per l'indagine delle funzioni cognitive e del loro declino, se associate a malattie neurodegenerative, come nel caso del morbo di Alzheimer (Caramillo & Echevarria, 2017).

## **2.5. Evoluzione del concetto di lateralizzazione cerebrale**

I primi cenni nella letteratura scientifica di lateralizzazione cerebrale risalgono alla prima metà nell'800, benché questi contributi, scontrandosi con una comunità scientifica non ancora pronta ad accettarli, ricevettero poco credito e rimasero sconosciuti fino alla seconda metà del secolo. Nei primi decenni del XIX secolo è collocabile la teoria del neuro anatomista tedesco Franz Joseph Gall che ipotizzò che le capacità linguistiche dovessero risiedere nei lobi frontali e nell'area adiacente all'occhiaia (Güntürkün, Ströckens & Ocklenburg, 2020) e presunse che fosse sufficiente analizzare la superficie e la forma del cranio per capire la

struttura della corteccia sottostante. Sostenne infatti nella sua teoria organologica, più tardi denominata frenologia (Verardi, 2010), che le aree più sviluppate dovessero presentare protuberanze sulla superficie.

La contro argomentazione più importante alla teoria di Gall è proposta dall'anatomista francese Marie-Jean-Pierre Flourens che condusse esperimenti in cui determinava chirurgicamente una lesione del proencefalo su piccioni e altre specie sperimentali. Al termine dei suoi esperimenti concluse che le lesioni non causavano la perdita di una specifica funzione cerebrale, ma quanto più una lesione aumentava di grandezza tanto più si notavano le conseguenze. La conclusione di Flourens è che gli emisferi non erano del tutto separati e indipendenti, ma che i processi e i meccanismi di funzionamento dovevano essere intrecciati fra l'emisfero destro e il sinistro (Flourens, 1842). Grazie alla successiva conferma anche da parte di altri fisiologi, come François Magendie, la conclusione di unità e connessione fra le varie aree corticali divenne presto un dogma scientifico (Güntürkün et al., 2020). Trovò comunque degli obiettori, fra cui Jean-Baptiste Bouillard, che difendeva l'idea delle sedi frontali del linguaggio (Bouillard, 1825).

Il secondo dogma, altrettanto importante, riguarda la convinzione che gli organismi sani abbiano organi simmetrici. Questa ipotesi fu proposta da Marie François Xavier Bichat, fisiologo francese, che sosteneva la necessità di simmetria fra tutti gli organi cerebrali affinché potessero essere posizionati correttamente; anche le parti irregolari, come il corpo calloso, venivano descritte come simmetricamente posizionate fra gli emisferi (Güntürkün et al., 2020).

Un decennio più tardi il neurologo Marc Dax mise in luce che i cervelli di più di 40 pazienti affetti da disturbi del linguaggio, presentavano lesioni all'emisfero sinistro, o ad entrambi gli emisferi, ma mai esclusivamente al destro (Manning & Thomas-Antérion, 2011). Nel corso del secolo ci si allontanò dall'approccio unitario per avvicinarsi e prediligere gradualmente un approccio connessionista; è in questo nuovo clima favorevole che il neurologo Paul Broca presentò le sue conclusioni: dall'analisi di pazienti afasici, localizzò nella circonvoluzione frontale sinistra la sede della produzione del linguaggio, che, se danneggiata, causa l'afasia di Broca, con sintomo principale l'emissione non fluente del discorso. Pochi anni dopo Carl Wernicke scoprì un'area della corteccia cerebrale, che, insieme a quella di Broca, a cui è anatomicamente connessa, si dimostrò responsabile del linguaggio. Lesioni in questa area possono comportare afasia di Wernicke, riguardante la comprensione del linguaggio, mentre la fluidità linguistica rimane intatta.

Inizialmente, dunque, la produzione del linguaggio e dei movimenti volontari vennero collocati nell'emisfero sinistro, definito dunque dominante; solo più tardi nell'emisfero destro, fino a quel momento definito minore, vennero localizzate le competenze visuo-spaziali, di riconoscimento di volti e di processi emozionali.

Il concetto di dominanza emisferica venne gradualmente sostituito con quello di specializzazione emisferica che solo successivamente venne denominata lateralizzazione emisferica, la cui manifestazione è definita "lateralità". Fino alla seconda metà del ventesimo secolo si parlava di lateralizzazione emisferica esclusivamente in relazione all'uomo, come fenomeno conseguente dell'elevato sviluppo cerebrale, capacità cognitive e comunicative rispetto alle altre specie.



Nel 1971 il neuroscienziato Fernando Nottebohm presentò uno studio in cui dimostrava che fringuelli maschi, con lesione del nervo ipoglosso sinistro manifestavano un'inibizione del canto che non si registrava in caso di pari lesione del nervo destro; fenomeno riscontrato anche in altre specie di uccelli (Nottebohm, 1977).

Il *Gallus gallus*, ovvero il gallo domestico, fu il soggetto sperimentale per studi che indagavano le differenze emisferiche in capacità di apprendimento. Il test di memoria, noto come "pebble floor task" somministrato da Rogers e Anson (1979) a pulcini, prevedeva di analizzare la capacità di apprendimento nel discriminare granelli di cibo dai sassolini incollati al pavimento dell'apparato sperimentale. Il pulcino normale dopo una fase di addestramento apprende a discriminare il cibo dai sassolini. A questo punto Rogers e Anson ricorrevano all'uso della cicloesammide, composto chimico inibitore della sintesi proteica, che causava l'inattivazione dei meccanismi di memoria. Quando questo inibitore interessava il solo emisfero sinistro, o entrambi gli emisferi, la prestazione dei pulcini peggiorava drasticamente, mentre quando interessava esclusivamente l'emisfero destro non presentava alterazioni nella prestazione. Da questo risultato si attribuì all'emisfero sinistro un ruolo più importante nelle capacità di apprendimento (Rogers & Anson, 1979).

Vennero condotti poco più tardi degli studi dal ricercatore Bianki, che avevano come soggetti 53 ratti; venivano addestrati alla differenziazione di figure geometriche, presentate simultaneamente o sequenzialmente. È stato dimostrato che la lateralizzazione dipende, non dal tipo di stimoli utilizzati, ma dal carattere della loro presentazione. Lo sperimentatore ha dunque concluso che

l'emisfero sinistro è specializzato nell'elaborazione di stimoli visivi presentati sequenzialmente, mentre l'emisfero destro è specializzato nell'elaborazione di stimoli presentati simultaneamente (Bianki, 1983).

Nonostante risulti più difficile applicare queste tipologie di tecniche ai mammiferi, e in particolar modo all'uomo, è stato possibile ottenere negli anni dei risultati significativi. L'uomo non rappresenta il modello sperimentale ideale per studi di lateralizzazione emisferica a causa delle commessure telencefaliche e a causa del parziale incrocio delle vie visive a livello del chiasma ottico. Tuttavia, apporti fondamentali vennero forniti da studi su pazienti "split brain" e da studi che prevedevano l'inattivazione temporanea di un singolo emisfero tramite iniezione di farmaci anestetici (Wada & Rasmussen, 1960).

## **2.6. La lateralizzazione emisferica**

Con lateralizzazione emisferica si intende la diversa specializzazione dei due emisferi cerebrali, corrispondente a un'organizzazione asimmetrica a livello corticale.

Non solo le funzioni cognitive sono soggette a specializzazione cerebrale, ma anche i processi di motivazione affettiva sembrano determinati dalla lateralità. Con motivazione affettiva si intende la predisposizione ad avvicinarsi o evitare stimoli fisici o sociali. In letteratura si ritrovano diversi studi a sostegno dell'ipotesi che la tendenza all'avvicinamento sarebbe elaborata dall'emisfero sinistro, mentre la tendenza all'allontanamento dall'emisfero destro (Brookshire & Casasanto, 2018). Le persone tendono infatti a usare la mano dominante per un'azione di avvicinamento (come afferrare una palla), e la mano non dominante

per le azioni di evitamento (come un riflesso di protezione se una palla viene lanciata inaspettatamente) (Coren, 1992).

Pochi anni più tardi venne confermata questa teoria in un esperimento che prevedeva di confrontare l'attività neuronale proveniente da entrambi gli emisferi di soggetti mancini e destrimani a riposo. Al termine della registrazione elettrofisiologica i partecipanti compilavano un questionario che misurava la tendenza all'avvicinamento (*Behavioral Activation Scale*); i risultati misero in luce come nei destrimani un alto livello di motivazione all'avvicinamento correlasse con una maggiore attività cerebrale localizzata nell'emisfero sinistro, mentre invece i mancini avessero un alto livello di motivazione all'avvicinamento correlato con una maggiore attività cerebrale localizzata nell'emisfero destro. Si concluse che sia nei destrimani che nei mancini la motivazione all'avvicinamento è lateralizzata allo stesso emisfero che controlla la mano dominante (Brookshire & Casasanto, 2012).

Indagando la lateralizzazione emisferica nei pesci risultano interessanti i dati raccolti in una ricerca condotta sul teleosteo *Girardinus falcatus*, che permise di registrare una correlazione genitori - progenie sia per quando riguarda il grado che la direzione della lateralizzazione (Bisazza, Facchin & Vallortigiana, 2000). La ricerca prevedeva di registrare il comportamento di svolta del pesce posto di fronte a un modello di un predatore (da cui era separato da una barriera con sbarre verticali), che risultò essere lateralizzato a sinistra, poiché veniva preferenzialmente usato l'occhio destro durante la fissazione di uno stimolo rilevante come un predatore. Dopo avere sottoposto gli individui a questo test venne somministrato anche alla progenie registrando risultati analoghi, con

un'alta correlazione e una stima di ereditabilità superiore a 0.5 (Bisazza et al., 2000).

## **2.7. Effetti della lateralizzazione cerebrale in performance cognitive**

Le ricerche condotte sull'uomo riguardano prevalentemente pazienti con lesioni unilaterali, sui quali si è osservata una perdita selettiva di funzioni in relazione alla loro lateralità.

Molti test circa la lateralizzazione derivano da tecniche di mappatura (stimolazione, anestesia locale e registrazione della corteccia) che sono progettati per identificare ed evitare la resezione di aree linguistiche chiave; permettendo di determinare quale sia l'emisfero dominante per la funzione linguistica. Uno degli esperimenti più esplicativi ha messo in evidenza come stimolazione elettrica dell'emisfero sinistro blocchi la produzione del linguaggio, fenomeno che non si registra quando la stimolazione elettrica riguarda l'emisfero destro (Penfield & Jasper, 1954).

Una tecnica correlata è il Wada Test, procedura che prevede un'iniezione intra carotidea di amilobarbitone di sodio al fine di individuare le aree responsabili del linguaggio. L'anestesia transitoria si verifica nell'emisfero emilaterale all'iniezione. I risultati hanno messo in evidenza come, quando l'iniezione riguardava la carotide destra, si registrasse un'influenza sul canto del soggetto (che si presentava monotono), mentre invece le capacità di linguaggio rimanessero intatte. Quando invece l'iniezione riguardava la carotide sinistra, veniva bloccato il linguaggio, mentre il canto rimaneva preservato (Gordon & Bogen, 1974); a sostegno della teoria di lateralizzazione di abilità linguistiche.

I pazienti “split-brain”, in cui si esegue una resezione chirurgica del corpo calloso (callosotomia) come cura di una grave intrattabile epilessia (Sperry, 1984), sono partecipanti ideali per esperimenti che si prefiggono di analizzare la lateralizzazione delle funzioni cognitive. Questa resezione compromette le funzioni della commessura, come la condivisione fra i due emisferi di informazioni percettive, mnemoniche e cognitive (Bogen, 1965).

Test meno invasivi possono essere utilizzati per valutare asimmetrie funzionali in soggetti normali, non sottoposti a interventi chirurgici. In genere, questi includono stimoli uditivi o visivi presentati in modo asimmetrico. Gli esperimenti di ascolto dicotico mettono in evidenza come il materiale verbale sia più facilmente analizzabile se presentato all'orecchio destro (processato quindi dall'emisfero sinistro). Il materiale musicale, al contrario, viene analizzato in modo più efficace se presentato all'orecchio sinistro (processato dall'emisfero destro) (Deutsch, 1985). Venne inoltre dimostrato che presentando coppie di cifre simultaneamente ai partecipanti tramite auricolari ricordassero meglio la cifra presentata all'orecchio destro, a conferma dell'elaborazione degli stimoli uditivi a carico dell'emisfero sinistro (Kimura, 1961).

Sono largamente più presenti in letteratura, studi che hanno come soggetti sperimentali altre specie animali, come i ratti, che riportavano abilità esplorative diverse in base alla sede della lesione (Denenberg et al., 1978). Lo studio della lateralizzazione emisferica in animali con gli occhi posti lateralmente, come nel caso dei pesci, è possibile tramite l'analisi del comportamento. La presenza di lateralizzazione emisferica può dunque essere indagata tramite mera

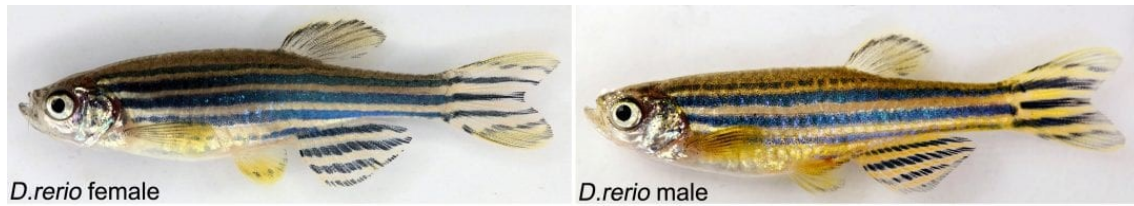
osservazione del comportamento del soggetto, senza ricorrere a tecniche invasive.

Nonostante si presentino differenze di lateralizzazione tra specie diverse, se ne possono registrare anche a livello individuale, legate a fattori ereditari, di genere e ambientali (Bisazza & Brown, 2011).

### **3. Biologia della specie**

Il *Danio Rerio* (Hamilton, 1822) è piccolo pesce di acqua dolce, appartenente alla famiglia dei Ciprinidi. Questa specie, caratterizzata da corpo fusiforme, e da dimensioni ridotte che nell'adulto non superano i 40 millimetri di lunghezza (Spence et al., 2008), si contraddistingue per il suo aspetto che le conferisce il nome con cui è comunemente nota, zebrafish. La livrea è infatti caratterizzata da cinque a sette strisce longitudinali, di colore blu oltremare, alternate ad altrettante strisce bianche. Queste striature si sviluppano dall'opercolo fino alla pinna caudale (Barman, 1991), estendendosi anche alla pinna anale (Spence et al., 2008).

Gli adulti di zebrafish presentano un lieve dimorfismo sessuale, che rendono possibile la differenziazione fra i due sessi. Gli esemplari maschi presentano delle strisce bluastre più marcate sul dorso, un colore tendente al giallastro e una forma più affusolata, mentre le femmine appaiono con colori meno vivaci, leggermente più grandi e con una forma più arrotondata dovuta sia alla presenza di una papilla genitale anteposta alla pinna anale sia alla presenza delle uova (Fig. 1).



*Figura 1: Esempio di Zebrafish adulto femmina e maschio*

<https://www.advancedsciencenews.com/zebrafish-get-stripes/>

L'habitat di questo ciprinide sono le acque calde, poco mobili e poco profonde, come risaie e pozze d'acqua ferma, ma allo stesso modo è stato rinvenuto in ruscelli a corso lento e presso rive di fiumi (Spence et al., 2008). In natura questa specie è diffusa principalmente in zone dal clima temperato, quali India, Bangladesh e Nepal (Spence et al., 2008).

Il ciclo riproduttivo sembra essere correlato alle caratteristiche dell'ambiente in quanto a temperatura e disponibilità di cibo. La fase di riproduzione avviene infatti nel periodo dei monsoni (da giugno ad agosto), periodo in cui le acque si prospettano ideali in termini di riscaldamento e presenza di cibo (Spence et al., 2008).

Si tratta di una specie ovipara in grado di riprodursi frequentemente, la femmina infatti può deporre fino a 700 uova (Spence et al., 2008), con un ritmo di 5-20 deposizioni in intervalli di 1-2 giorni. Le uova hanno un diametro di 0.7 mm e una volta rilasciate dalla femmina si depositano sul substrato. Una volta entrate in contatto con l'acqua le uova si presentano trasparenti, il caso contrario indica la mancanza di seme maschile che causerà l'interruzione dello sviluppo nelle prime fasi di divisione cellulare (Lee et al., 1999). Nelle seguenti 36 ore alla fecondazione si sviluppano i precursori di tutti gli organi principali e la schiusa

avviene dopo 2-3 giorni dalla fertilizzazione (dpf: *days post fertilization*) (Kimmel et al., 1995). Una volta schiuse le uova, le larve misurano circa 3 mm e appaiono semitrasparenti (Kimmel et al., 1995), caratteristica che li rende un modello ideale nell'impiego sperimentale.

Fino a 5-7 settimane dopo la schiusa non è possibile definire il sesso del soggetto se non tramite dissezione, questo perché tutte le gonadi si sviluppano come ovaie; è solo dopo il primo mese che si entra in uno stadio giovanile, in cui avviene il differenziamento (Maack & Segner, 2003). Al terzo mese si può parlare di maturità sessuale, definita in base al raggiungimento di una certa dimensione uniforme per tutti i soggetti (rispettivamente 24.9 mm e 23.1 mm per le femmine e per i maschi) (Laale, 1977).

## **4. Materiali e metodi**

### **4.1. Soggetti sperimentali**

Nell'esperimento sono state utilizzate larve di zebrafish a 10 dpf, senza alcuna distinzione in base al sesso. I soggetti sono stati selezionati da diverse fecondazioni di adulti di tipo wild type, appartenenti al laboratorio di Psicologia Generale di Padova. Dal momento di raccolta uova fino al momento in cui le larve risultavano idonee all'esperimento in termini di dpf, sono state conservate in capsule petri (circa 30 soggetti per capsula) immerse in fish water 1x (0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.5 gr Instant Ocean, 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  deionizzata) e blu di metilene (0.0016gr/l). Le larve sono state mantenute nelle apposite capsule fino a 5 dpf con pulizia quotidiana e ricambio dell'acqua, a temperatura costante di  $28.5 \pm 1$  °C e con un ciclo luce-buio di 14-10 ore.



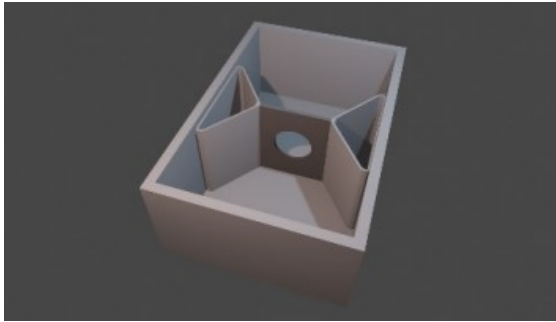
A partire dal quinto dpf, momento in cui le uova si sono schiuse, le larve sono state nutrite due volte al giorno (indicativamente alle 10:30 e alle 15) con cibo commerciale in polvere (dimensione delle particelle di 0.75 mm). Al termine dei nove giorni previsti di esperimento le larve impiegate sono state trasferite in vasche più grandi con altre larve e poi, una volta raggiunta la fase adulta, in acquari più grandi con altri adulti zebrafish (a circa 28 dpf).

#### **4.2. Apparato sperimentale**

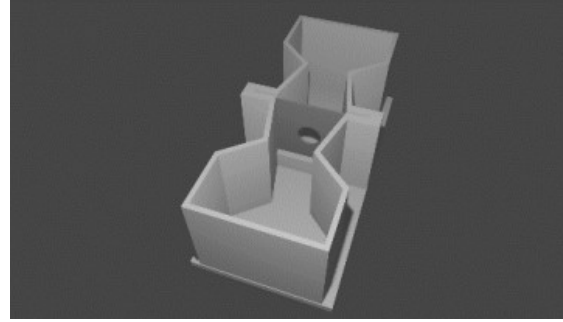
L'esperimento si è composto di due fasi, una di abitudine e di training di gruppo e una individuale, ognuna svolta in appositi apparati sperimentali differenti per dimensione, entrambi ottenuti tramite stampante 3D modellando acido polilattico (PLA) bianco.

La prima fase di familiarizzazione e di training di gruppo ha previsto l'uso di vaschette bianche a forma di clessidra (Fig. 2), di misura 11.5 x 4.5 x 4 cm con un restringimento centrale, in cui poteva essere inserito un pannello in PLA grigio, caratterizzato da un foro di 1.8 cm di diametro, che permetteva alle larve di muoversi fra i due settori creati, pur limitando la diffusione di cibo e minimizzando la percezione olfattiva di questo fra i due compartimenti.

La fase individuale è stata condotta in apparati rettangolari (Fig.3) di minori dimensioni (7 x 4 x 4 cm), che allo stesso modo permettevano l'inserimento di un divisorio in plastica grigio, con foro di 1.4 cm. L'inserimento di questo pannello forato, caratterizzato ai lati da due aperture triangolari che ottimizzano l'adattamento alla forma della vaschetta, consentiva alle larve, come nelle due fasi di gruppo, lo spostamento da un settore all'altro.

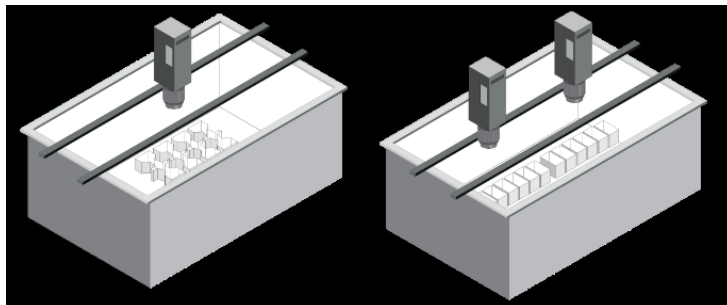


*Figura 2: Apparato sperimentale per fase individuale*



*Figura 3: Apparato sperimentale per fase di familiarizzazione e fase di training di gruppo*

In entrambe le fasi le vaschette sono state riempite con Fish Water 1x fino a un'altezza di 3.5 cm. Durante tutto l'esperimento gli apparati erano illuminati da lampade a LED a 0.72W, a una distanza di circa 27 cm di altezza dalla base, e registrate da videocamere che permettevano la visione intera delle vasche: ognuna riprendeva contemporaneamente fino a 4 gruppi nella fase di abitudine e fino a 6 soggetti nella fase individuale.



*Figura 4: Impianto di videoregistrazione a sinistra delle fasi di gruppo, a destra della fase individuale*

## **5. Procedura e stimoli sperimentali**

Gli stimoli sperimentali utilizzati erano di tipo visivo, caratterizzati da una figura di riempimento di colore rosso o verde; erano stampati su fogli bianchi plastificati resi impermeabili. Questi stimoli nella fase di gruppo e nella fase individuale

venivano posizionati in corrispondenza della parete più piccola rispettivamente delle vaschette a clessidra e delle vaschette rettangolari. La procedura sperimentale si basava sull'utilizzo di un paradigma di condizionamento operante, il cui rinforzo consisteva in una ricompensa alimentare somministrata in corrispondenza dello stimolo rosso o dello stimolo verde, mantenendo invariato in tutte le prove lo stimolo in corrispondenza del quale la larva riceveva il rinforzo. In questo lavoro ho cercato di indagare i possibili effetti della specializzazione emisferica sull'apprendimento di compiti di discriminazione andando ad osservare con quale occhio il soggetto si orientava verso lo stimolo rinforzato limitatamente alla prima ora di osservazione individuale. Questo in relazione al fatto che in letteratura gli effetti sul comportamento della lateralizzazione visiva si manifestano in modo significativo durante i primi minuti di interazione con gli stimoli presenti.

Per il lavoro ho considerato solo la prima ora del primo giorno di osservazione individuale. L'analisi è stata condotta in totale su 12 soggetti, 6 rinforzati in corrispondenza dello stimolo rosso e 6 in corrispondenza dello stimolo verde.

Sono state analizzate le registrazioni raccolte nei 90 minuti successivi all'inserimento degli stimoli, riportando il tempo che il soggetto ha trascorso nel settore con lo stimolo rinforzato (variabile dipendente) e quello che ha trascorso nel settore con lo stimolo non rinforzato, facendo attenzione anche ai passaggi compiuti fra un settore e l'altro. Veniva dunque calcolato un indice che andava da 0 (preferenza completa per il settore non rinforzato) ad 1 (preferenza completa per il settore rinforzato). L'analisi della preferenza visiva è stata condotta campionando ogni 15 secondi la posizione del soggetto rispetto allo stimolo

indipendentemente dal settore in cui il soggetto si trovava. Per far questo è stata stimata la frequenza di utilizzo del campo visivo monoculare destro/sinistro, sulla base dell'angolo del pesce rispetto allo stimolo più vicino. Un indice di utilizzo dell'occhio è stato calcolato come segue:

$$\frac{(\text{frequenza di utilizzo dell'occhio destro})}{(\text{frequenza di utilizzo dell'occhio destro} + \text{frequenza di utilizzo dell'occhio sinistro})}$$

### **5.1. Fase di abitudine in gruppo**

La fase di familiarizzazione in gruppo inizia a 6 dpf (terminando a 7 dpf), quando le larve schiuse sono state spostate dalle petri e in maniera casuale ridistribuite negli apparati a clessidra in soluzione Fish Water. La ridistribuzione prevedeva non più di 30 soggetti a clessidra.

Il primo giorno della fase di familiarizzazione in gruppo i soggetti potevano muoversi all'interno della clessidra liberamente, dal momento che non era ancora stato inserito il pannello divisorio. Dopo 90 minuti dall'inserimento delle larve nelle nuove vaschette si procedeva alla somministrazione del rinforzo (ricompensa alimentare) in questa fase distribuito al centro dell'apparato; lo stesso procedimento si è ripetuto a 6 ore dalla prima somministrazione.

Il secondo giorno di esperimento, a 7 dpf, prevedeva l'inserimento del pannello grigio con foro di 1.8 cm, permettendo ai soggetti di abituarsi all'apparato completo. Venivano mantenute le tempistiche di somministrazione del rinforzo (la prima a 90 minuti dall'inserimento degli stimoli, e la seconda a distanza di 6 ore), ma cambiava la modalità: non era più elargito al centro ma agli estremi delle vaschette dipendentemente dalla condizione sperimentale.

## **5.2. Fase di gruppo con stimoli**

Il terzo giorno, corrispondente a 8 dpf, iniziava la fase di gruppo con stimoli, ovvero il primo giorno di addestramento, caratterizzato da 2 trials al giorno. Venivano inseriti ai lati della vaschetta i due stimoli, caratterizzati dalla figura di riempimento di colore verde o rosso. A 90 minuti dall'inserimento degli stimoli è stato somministrato il rinforzo, quindi circa alle 10: a metà dei gruppi in corrispondenza dello stimolo verde e alla restante metà in corrispondenza dello stimolo rosso. Durante tutto l'esperimento rimane invariato lo stimolo in prossimità del quale ogni gruppo ottiene il rinforzo. Alle 16, dunque a 6 ore dalla prima somministrazione, viene elargito il rinforzo nuovamente in corrispondenza del medesimo stimolo (rosso o verde). La procedura a 8 dpf a due trials si ripete a 9 dpf, mantenendo modalità, tempistiche e stimolo rinforzato.

Approssimativamente l'inserimento degli stimoli avveniva alle 8:30 seguito dall'accensione delle videocamere per 60 minuti; il rinforzo avveniva alle 10 con spegnimento delle videocamere. Dopo un'ora, alle 11, venivano rimossi tutti gli stimoli terminando così il trial 1. Lo stesso procedimento si ripeteva dopo un cambio di vaschette onde evitare eventuali residui di cibo, a distanza di 3:30h.

## **5.3. Fase di test individuale**

La fase individuale prevedeva il trasferimento individuale delle larve in vaschette rettangolari, ognuna divisa dall'apposito divisorio grigio in due compartimenti. Questa fase si articola in 5 giorni di addestramento con stimoli. Nello spostamento delle larve, dalle vaschette a forma di clessidra a quelle rettangolari, si è mantenuto lo stimolo in corrispondenza del quale erano state rinforzate nella

fase di gruppo: una larva che durante la fase di gruppo aveva ottenuto il rinforzo in corrispondenza dello stimolo verde, nella fase individuale otterrà il rinforzo in corrispondenza del medesimo stimolo. Le tempistiche della fase di gruppo vengono mantenute nella fase individuale.

## 6. Risultati

Per analizzare la possibile preferenza d'uso dell'occhio destro è stato utilizzato un t test a campione unico indipendentemente dal rinforzo sul colore rosso o verde. Il test t non ha rivelato alcuna preferenza statisticamente significativa considerando l'intero periodo di osservazione (media  $\pm$  deviazione standard  $0.55 \pm 0.09$ ;  $t(11) = 1.104$ ,  $p = 0.141$ ) (Fig. 5). Un risultato simile si osserva quando la stessa analisi viene effettuata separatamente tra i due gruppi ( $t(5) = 1.477$ ,  $p = 0.109$ ;  $t(5) = 0.914$ ,  $p = 0.910$ ; rispettivamente per i soggetti rinforzati sul rosso e quelli rinforzati sul verde, Fig. 5).

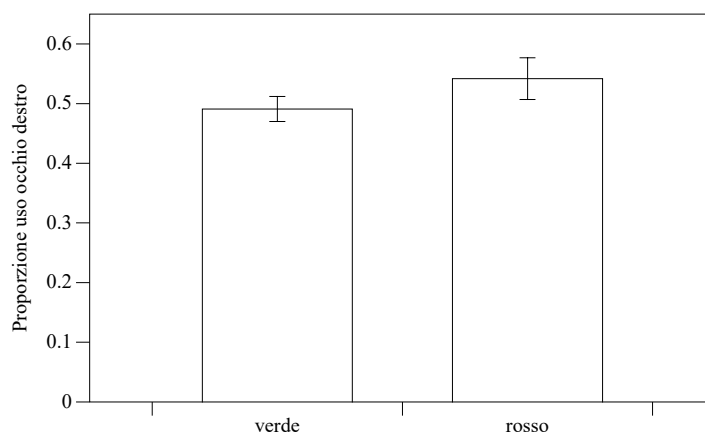


Figura 5: Grafico relative alla preferenza per l'uso dell'occhio destro durante l'intero periodo di osservazione per i due gruppi

Nonostante l'assenza di differenze significative, il confronto tra i due gruppi ha messo in evidenza come l'uso dell'occhio differisca in base al colore rinforzato (t a campioni indipendenti:  $t(10) = 2.003$ ,  $P = 0.041$ ), indicando quindi una maggior tendenza da parte dei soggetti rinforzati sul colore rosso a utilizzare l'occhio destro rispetto ai soggetti rinforzati sul colore verde.

Infine, è stata analizzata la risposta temporale dei soggetti attraverso un'analisi della varianza a misure ripetute con a fattore tra i soggetti il colore rinforzato. L'analisi non ha però evidenziato una variazione temporale nella risposta mostrata nei primi 10 minuti di osservazione ( $F(1,51) = 2.117$ ,  $p = 0.111$ , Fig. 6), legata allo stimolo rinforzato ( $F(1,17) = 0.963$ ,  $p = 0.340$ ), o alla interazione tra stimolo rinforzato e trascorrere dei minuti ( $F(3,54) = 1.259$ ,  $p = 0.298$ )

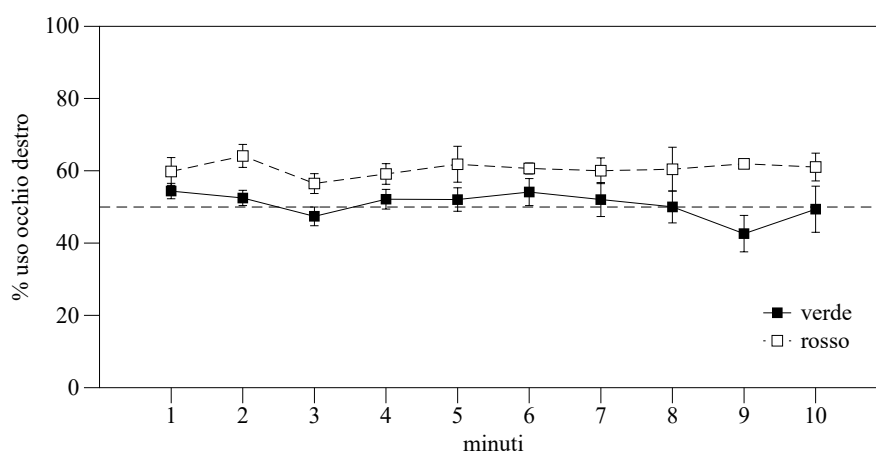


Figura 6: Grafico relative all'andamento temporale per la preferenza d'uso dell'occhio destro in relazione al colore rinforzato

## 7. Discussione

Lo scopo di questo lavoro era quello di indagare per un possibile uso lateralizzato della visione in un compito di apprendimento. La letteratura ha ampiamente

documentato come l'organizzazione del sistema nervoso sia un risultato della spinta evolutiva che porta con sé anche un generale aumento della performance in compiti cognitivi. La lateralizzazione cerebrale si è mantenuta nel corso dell'evoluzione e si è diffusa in vertebrati e invertebrati tanto da far sì che molti scienziati abbiano indagato i benefici ad essa associati. Tra questi benefici troviamo una miglior capacità attentiva e una miglior distribuzione del carico attentivo, che porta i soggetti lateralizzati a svolgere meglio il compito richiesto, rispetto ai soggetti meno fortemente lateralizzati.

Per indagare se anche in un compito di apprendimento vi fossero questi vantaggi è stata adottata una metodologia che è stata recentemente implementata in zebrafish per indagare le loro curve di apprendimento. In sintesi, con la metodologia descritta in questo studio, è stato possibile osservare come l'apprendimento discriminativo in zebrafish venga influenzato dalle condizioni di allevamento e dalla tipologia di stimoli da discriminare. La discriminazione cromatica, in particolare, si è rivelata altamente predittiva con soggetti che in pochi giorni mostravano di aver imparato e di aver mantenuto l'associazione tra lo stimolo rinforzato e il rinforzo stesso. Allo scopo di capire se vi fosse un uso lateralizzato del cervello nell'apprendere la discriminazione cromatica è stata condotta un'analisi dell'occhio rivolto verso lo stimolo rinforzato durante il periodo di osservazione.

I risultati ottenuti però non hanno evidenziato alcun segno significativo di lateralizzazione visiva, ma hanno messo in evidenza una performance diversa legata al colore rinforzato: i soggetti rinforzati sul rosso tendono ad un'ispezione dello stimolo maggiormente lateralizzata rispetto ai soggetti rinforzati sul verde.



Si tratta di un risultato in linea con quanto emerso recentemente relativamente alla preferenza spontanea verso il rosso in una condizione molto simile a quella utilizzata nel presente studio senza però che vi fosse una fase di familiarizzazione con lo stimolo.

In altre parole, possiamo concludere che la preferenza per il colore rosso può aver influito notevolmente sulla misura di lateralizzazione ma sono altri e più evidenti i limiti della ricerca; in primis non si dispone di un quadro di lateralizzazione dei soggetti. Non sappiamo dunque se i pesci osservati siano fortemente o scarsamente lateralizzati e se, in generale, mostrino un pattern lateralizzato nello svolgere i loro compiti quotidianamente. Altri limiti cruciali sono quelli relativi al campionamento degli episodi e alla struttura stessa dell'apparato. Per quanto riguarda il campionamento è evidente che la possibilità di utilizzare una rilevazione continua del comportamento, sarebbe molto più indicativa. D'altra parte, per quanto riguarda la struttura dell'apparato, la coesistenza di entrambi gli stimoli crea un fattore confondente, in quanto la prossimità del soggetto ad un colore non necessariamente coincide con la preferenza per quel colore, dato che simultaneamente anche l'altro stimolo rimane visibile.

Al netto di queste criticità questo studio rappresenta un buon inizio per perfezionare lo studio del ruolo della lateralizzazione cerebrale in compiti di apprendimento in larve di zebrafish.



## 8. Bibliografia

- Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M. E., & Bisazza, A. (2017). Numerical abilities in fish: A methodological review. *Behavioural Processes*, *141*, 161–171.  
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.02.001>
- Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M., & Zon, L. I. (2002). Zebrafish as a cancer model system. In *Cancer cell* (pp. 229–231).
- Aronson, L. R. (Lester R., & Laboratory, L. M. (1951). Orientation and jumping behavior in the gobiid fish *Bathygobius soporator*. *American Museum novitates*; no. 1486. *Digitallibrary.amnh.org*.  
<https://digitallibrary.amnh.org/items/237b7bcb-b348-4726-8e07-e260b8801ebb>
- Barman, R. P. (1991). *A Taxonomic Revision of the Indo-Burmese Species of Danio Hamilton Buchanan (pisces, Cyprinidae)*.
- Bianki, V. L. (1983). *Simultaneous and Sequential Processing of Information by Different Hemispheres in Animals*. *22*(1-2), 1–6.  
<https://doi.org/10.3109/00207459308987380>
- Bisazza, A., & Brown, C. (2011). Lateralization of Cognitive Functions in Fish. *Macquarie University*, 298–319.
- Bisazza, A., Facchin, L., & Vallortigara, G. (2000). Heritability of lateralization in fish: concordance of right–left asymmetry between parents and offspring. *Neuropsychologia*, *38*(7), 907–912.  
[https://doi.org/10.1016/s0028-3932\(00\)00018-x](https://doi.org/10.1016/s0028-3932(00)00018-x)
- Bogen, J. E. (1965). Cerebral Commissurotomy. *JAMA*, *194*(12), 1328.  
<https://doi.org/10.1001/jama.1965.03090250062026>

- Bouillard, J.-B. (1825). *Recherches cliniques propres à démontrer que la perte de la parole correspond à la lésion des lobules antérieures du cerveau, et à confirmer l'opinion de M. Gall sur le siège de l'organe du langage articulé* | Max Planck Institute. [Www.mpi.nl](http://www.mpi.nl).  
<https://www.mpi.nl/publications/item2287091/recherches-cliniques-propres-demontrer-que-la-perte-de-la-parole>
- Brookshire, G., & Casasanto, D. (2012). Motivation and motor control: hemispheric specialization for approach motivation reverses with handedness. *PloS One*, 7(4), e36036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036036>
- Brookshire, G., & Casasanto, D. (2018). Approach motivation in human cerebral cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1752), 20170141. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0141>
- Caramillo, E. M., & Echevarria, D. J. (2017). Alzheimer's disease in the zebrafish. *Behavioural Pharmacology*, 28, 179–186.  
<https://doi.org/10.1097/fbp.0000000000000284>
- Cerella, J. (1979). Visual classes and natural categories in the pigeon. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 5(1), 68–77.  
<https://doi.org/10.1037//0096-1523.5.1.68>
- Coren, S. (1992). Handedness, traffic crashes, and defensive reflexes. *American Journal of Public Health*, 82(8), 1176–1177. <https://doi.org/10.2105/ajph.82.8.1176-b>
- Dadda, M., Piffer, L., Agrillo, C., & Bisazza, A. (2009). Spontaneous number representation in mosquitofish. *Cognition*, 112(2), 343–348.  
<https://doi.org/10.1016/j.cognition.2009.05.009>

- de Boo, J., & Hendriksen, C. (2005). Reduction Strategies in Animal Research: A Review of Scientific Approaches at the Intra-experimental, Supra-experimental and Extra-experimental Levels. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33(4), 369–377. <https://doi.org/10.1177/026119290503300404>
- Denenberg, V., Garbanati, J., Sherman, D., Yutzey, D., & Kaplan, R. (1978). Infantile stimulation induces brain lateralization in rats. *Science*, 201(4361), 1150–1152. <https://doi.org/10.1126/science.684436>
- Deutsch, D. (1985). Dichotic Listening to Melodic Patterns and Its Relationship to Hemispheric Specialization of Function. *Music Perception: An Interdisciplinary Journal*, 3(2), 127–154. <https://doi.org/10.2307/40285329>
- Feierstein, C. E., Portugues, R., & Orger, M. B. (2015). Seeing the whole picture: A comprehensive imaging approach to functional mapping of circuits in behaving zebrafish. *Neuroscience*, 296, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.046>
- Fetcho, J. R., & O'Malley, D. M. (1995). Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. *Journal of Neurophysiology*, 73(1), 399–406. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.1.399>
- Flourens, P. (1842). Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés. In *Google Books*. J.-B. Baillière. [https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=b-NiqvJXS4UC&oi=fnd&pg=PR3&dq=flourens+pigeons&ots=GI2DUlcnSM&sig=1\\_GqPzLEOIZxyU9k5ChGCkGcEOA&redir\\_esc=y#v=onepage&q=flourens%20pigeons&f=false](https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=b-NiqvJXS4UC&oi=fnd&pg=PR3&dq=flourens+pigeons&ots=GI2DUlcnSM&sig=1_GqPzLEOIZxyU9k5ChGCkGcEOA&redir_esc=y#v=onepage&q=flourens%20pigeons&f=false)

- Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(5), 504–512.  
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.04.005>
- Gordon, H. W., & Bogen, J. E. (1974). Hemispheric lateralization of singing after intracarotid sodium amylobarbitone. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 37(6), 727–738. <https://doi.org/10.1136/jnnp.37.6.727>
- Güntürkün, O., Ströckens, F., & Ocklenburg, S. (2020). Brain Lateralization: A Comparative Perspective. *Physiological Reviews*, 100(3), 1019–1063.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2019>
- Herrnstein, R. J., Loveland, D. H., & Cable, C. (1976). Natural concepts in pigeons. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(4), 285–302. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.2.4.285>
- Jeong, J.-Y., Kwon, H.-B., Ahn, J.-C., Kang, D., Kwon, S.-H., Park, J. A., & Kim, K.-W. (2008). Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. *Brain Research Bulletin*, 75(5), 619–628.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.043>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kimura, D. (1961). Cerebral dominance and the perception of verbal stimuli. *Canadian Journal of Psychology/Revue Canadienne de Psychologie*, 15(3), 166–171.  
<https://doi.org/10.1037/h0083219>
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in

- fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10(2), 121–173.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x>
- Lee, K. W., Webb, S. E., & Miller, A. L. (1999). A Wave of Free Cytosolic Calcium Traverses Zebrafish Eggs on Activation. *Developmental Biology*, 214(1), 168–180. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9396>
- Maack, G., & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 62(4), 895–906.  
<https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00074.x>
- Manning, L., & Thomas-Antérion, C. (2011). Marc Dax and the discovery of the lateralisation of language in the left cerebral hemisphere. *Revue Neurologique*, 167(12), 868–872. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2010.10.017>
- Nottebohm, F. (1971). Neural lateralization of vocal control in a passerine bird. I. Song. *Journal of Experimental Zoology*, 177(2), 229–261.  
<https://doi.org/10.1002/jez.1401770210>
- Penfield, W., & Jasper, H. (1954). Epilepsy and the functional anatomy of the human brain. In *psycnet.apa.org*. <https://psycnet.apa.org/record/1955-01377-000?utm=>
- Perathoner, S., Cordero-Maldonado, M. L., & 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. <https://doi.org/10.1002/jnr.23712>
- Roberts, A. C., Bill, B. R., & Glanzman, D. L. (2013). Learning and memory in zebrafish larvae. *Frontiers in Neural Circuits*, 7.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00126>

- Rogers, L. J., & Anson, J. M. (1979). *Lateralisation of function in the chicken fore-brain*. *10*(5), 679–686. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(79\)90320-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(79)90320-4)
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Universities Federation For Animal Welfare.
- Skinner, B. (1932). On the rate of formation of a conditioned reflex. *The Journal of General Psychology*, *7*, 274–286.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, *83*(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x>
- Sperry, R. (1984). Consciousness, personal identity and the divided brain. *Neuropsychologia*. <http://people.uncw.edu/puente/sperry/sperrypapers/80s-90s/252-1986.pdf>
- Thorndike, E. L. (1898). Animal Intelligence: An Experimental Study of the Associative Processes in Animals. *Psychological Review: Monograph Supplement*, *2*(4). <https://doi.org/10.1037/h0067373>
- Verardi, D. (2010). L'organo dell'anima. Fisiognomica e fisiologia cerebrale in Franz Joseph Gall. *Psychofenia : Ricerca Ed Analisi Psicologica*, *0*(22), 87–108. <https://doi.org/10.1285/i17201632vXIIIIn22p87>
- Wada, J., & Rasmussen, T. (1960). Intracarotid Injection of Sodium Amytal for the Lateralization of Cerebral Speech Dominance. *Journal of Neurosurgery*, *17*(2), 266–282. <https://doi.org/10.3171/jns.1960.17.2.0266>



## **Ringraziamenti**

Ringrazio il mio relatore, il professor Marco Dadda, per la disponibilità e la professionalità con le quali mi ha guidato in questo percorso.

Ringrazio anche la dott.ssa Gabriela Gjinaj per il prezioso supporto e contributo che mi ha prestato.