

**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas



**TESIS DE LICENCIATURA**

***ROL de la ACTIVIDAD  
ELÉCTRICA en el  
ESTABLECIMIENTO de las  
PROYECCIONES AXONALES  
CENTRALES de las  
NEURONAS AFERENTES de  
la LÍNEA LATERAL de PEZ  
CEBRA.***

Autor: Matías Rodríguez.

Directora: Paola Viviana Plazas.

Directora Asistente: Lucía Salatino.

Lugar de Trabajo: Instituto de Farmacología, FMED, UBA.

*Dedicado con amor a mi sobrina, Bruna, por la luz que trae al hogar; a mis entrenadores, Clau y Abel, por su amor y generosidad, y a mi abuelo Fito, quien siempre vivirá en mi memoria por su alegría y vitalidad.*

# AGRADECIMIENTOS

*Agradezco al laboratorio que me formó como persona y como profesional. A la calidad humana, las charlas, y la compañía. A mi directora Pao, por su buen balance entre firmeza y amabilidad. A Lu por toda la ayuda que me dio, al tiempo y la dedicación que se tomó para formarme dentro del laboratorio. A Maru por ser tan divertida, por su carisma y sus ganas de compartir. A Vale por su simpatía y su ejemplo viajero. A Jime por su optimismo y buena predisposición de siempre. A Sabi por su bondad y su calidez.*

*Agradezco a mis amigos de la facu, a lo divertido dentro de lo cotidiano, a su compañía, a la fortaleza de grupo que nos hizo disfrutar y llegar al final del trayecto.*

*Agradezco a mis amigos de embriología por el cuatrimestre hermoso que pasamos, a las charlas, los chismes y las risas. A relajarse y disfrutar de la vida universitaria.*

*Agradezco a mi universidad y facultad, a haber tenido acceso a la mejor educación del país, de manera totalmente gratuita. A las becas de intercambio que recibí y que me permitieron conocer el mundo. A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Università degli Studi di Torino por su cálido recibimiento.*

*Agradezco a todas las personas de alguna manera se cruzaron en mi camino de estudiante y me ayudaron durante estos años. A Fabrizio Mazza, il mio amico italiano, por su padrinazgo. A Komeil y María por su cálida amistad y compañía, por ser tan divertidos. Al Profe Gethse por su calidez mexicana, por tomarse el tiempo de enseñarme su cultura. A Emma por contagiarme de su locura, y a todos los amigos internacionales que hice en Italia y México.*

*Agradezco a mis compañeros antárticos, en particular, a los Sergios Ezequieles y nuestras legendarias aventuras en el continente blanco.*

*Agradezco a los Ñandúes, la mejor agrupación atlética que existe, por ser mi segunda casa. A Clau y Abel, mis segundos padres. A Hernán, mi segundo hermano. A las enseñanzas que trascendieron más allá del deporte.*

*Agradezco puntualmente a Juan Krapovickas, a Ángeles Carrera, a Hernán Kucher, por ser mis amigos, mis consejeros y referentes.*

*Agradezco a mis amigos del secundario, los empsis, por ser mi motor durante todos estos años. A su compañía, su ayuda, a crecer y experimentar juntos desde hace más de 14 años.*

*Estoy profundamente agradecido a mi familia, no hay manera de describir todo lo que me han ayudado en este proceso. Destaco su apoyo incondicional, su cariño, su compromiso, su competencia y sus consejos.*

*Agradezco a Bruna, mi sobrina, por la luz que trae al hogar, por su alegría inagotable y su carisma encantador.*

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE .....	5
ABREVIATURAS .....	8
RESUMEN .....	10
TÍTULO Y RESUMEN EN INGLÉS .....	11
TITLE .....	11
ABSTRACT .....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. Contexto y relevancia.....	12
2. La línea lateral del pez cebra.....	12
2.1 Anatomía y función de la línea lateral del pez cebra.....	12
2.2 El desarrollo de la LL del pez cebra.....	14
2.3 El funcionamiento de los NMs como órgano sensorial .....	15
2.4. Línea Lateral Posterior (LLP) y Neuronas Aferentes (NAfs) .....	19
2.5. Varicosidades y Arquitectura de la LLP .....	19
3. Actividad eléctrica espontánea (AEE), una perspectiva desde la LL del pez cebra .....	22
3.1. Importancia de la AEE en la formación de circuitos neuronales.....	22
3.2. AEE y su rol en la competencia .....	23
3.3. La LL del pez cebra: un modelo para estudiar la actividad eléctrica en el desarrollo neuronal .....	24
3.4. Manipulación individual y global de la AEE .....	24
3.5. Investigación preliminar: Rol de la actividad eléctrica en las proyecciones axonales .....	25
OBJETIVOS.....	26
HIPÓTESIS .....	26
MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
1. Mantenimiento de peceras.....	27
2. Cruzas .....	27
3. Plásmidos.....	28
4. Microinyecciones de plásmido en embriones.....	28
5. Montaje para la adquisición de imágenes .....	30
6. Adquisición de imágenes en tiempo real (Live imaging) y análisis de la dinámica del crecimiento axonal (Time-lapse imaging) .....	30
7. Análisis de imágenes .....	31

7.1. Evaluación morfométrica de las proyecciones centrales de las NAfs de la línea lateral. ....	31
7.2. Evaluación de la dinámica de crecimiento de la proyección central.....	33
7.3. Determinación de varicosidades .....	34
8. Unidades experimentales y análisis estadístico.....	35
9. Aproximación Experimental .....	36
9.1. Manipulación global de la actividad eléctrica.....	36
9.2. Análisis in vivo del crecimiento axonal y del establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs.....	37
9.3. Estudio <i>in vivo</i> de la dinámica de crecimiento axonal. ....	37
RESULTADOS.....	38
<b>Parte A:</b> Efectos del silenciamiento global de la AEE en el establecimiento y dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL. ....	39
1. Efecto del silenciamiento global de la AEE en el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.....	39
2. Estudio de varicosidades en NAfs silenciadas .....	43
3. Efectos del silenciamiento global de la AEE sobre la dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL. ....	46
<b>Parte B:</b> Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos que regulan el establecimiento y dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.....	51
1. Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos que regulan el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL. ....	52
2. Estudio de varicosidades en NAfs silenciadas .....	57
3. Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos sobre la dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs a 5 dpf de la LL. ..	60
DISCUSIÓN .....	66
<b>Parte 1.</b> Silenciamiento único: Efectos del silenciamiento de la AEE de una NAf individual en un entorno competitivo.....	67
1. El silenciamiento único de NAfs reduce el área de cobertura sobre el cerebro medio y altera la complejidad del árbol axonal.....	67
2. El silenciamiento único provoca deficiencias en la conectividad sináptica.....	69
3. La dinámica de crecimiento y la maduración de los árboles axonales de las NAfs depende de la AEE.....	71
4. El silenciamiento a nivel de célula única exacerba la extensión y retracción, así como la formación y eliminación de ramas.....	72
<b>Parte 2.</b> Silenciamiento global: Efectos de la supresión global de la AEE sobre el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.....	73

1. El silenciamiento global de la AEE no afecta el territorio, ni la complejidad ni la arquitectura del árbol axonal. ....	73
2. La supresión global de la AEE resulta en deficiencias en la conectividad sináptica. .	74
3. La supresión global de la AEE altera la dinámica de crecimiento y la maduración de los árboles axonales. ....	75
<b>Parte 3.</b> Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos que regulan el establecimiento y dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL. ....	77
1. El territorio y la arquitectura del árbol axonal de una NAf dependen de la interacción y la competencia con neuronas vecinas. ....	77
2. La conectividad sináptica depende de la AEE, a través de mecanismos no competitivos. ....	79
3. La motilidad de los árboles axonales está regulada por procesos dependientes de la AEE tanto competitivos como no competitivos. ....	79
CONCLUSIONES .....	82
BIBLIOGRAFÍA .....	83

# ABREVIATURAS

AEE: Actividad Eléctrica Espontánea.

ALL: Anterior Lateral Line

ALLG: Ganglio de la línea lateral anterior.

ANs: Afferent Neurons.

AVs: varicosidades anteriores.

Ca<sup>2+</sup>: Calcio.

CC(s): Célula(s) ciliada(s).

dpf: Días Post Fecundación.

FGF: Factores de Crecimiento de Fibroblastos.

HCS: Hair Cells.

hKIR2.1: Canal de potasio humano Kir2.1.

hpf: Horas post fecundación.

K<sup>+</sup>: Potasio.

L: Troncal.

LANs: Neuronas aferentes de la línea lateral.

LCL: Proyección central de la línea lateral.

LL: Línea Lateral.

LLA: Línea lateral anterior.

LLP: Línea Lateral Posterior.

LTD: Depresión a largo plazo.



NAf(s): Neurona(s) aferente(s).

NA<sup>+</sup>: Sodio.

NGR: Neuronas ganglionares de la retina.

NM(s): Neuromasto(s).

pLAN: Neurona aferente de la línea lateral posterior.

PLL: Posterior lateral line.

PLLG: Ganglio aferente de la línea lateral posterior.

pLLP: Primordio de la línea lateral posterior.

PTU: N-feniltiourea.

PVs: Varicosidades posteriores.

SEA: Spontaneus Electrical Activity.

TeNT-Ic: Cadena liviana de la toxina tetánica.

Ter: Terminal.

VAMP: Proteína de membrana asociada a vesículas.

VAMPm: Versión mutante no funcional de la proteína VAMP.

WT: Wild-type.

$\lambda$ : Longitud de onda.

# ROL DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LAS PROYECCIONES AXONALES CENTRALES DE LAS NEURONAS AFERENTES DE LA LÍNEA LATERAL DE PEZ CEBRA.

## RESUMEN

La actividad eléctrica espontánea (AEE) es necesaria para el correcto establecimiento de los sistemas sensoriales. Utilizamos la línea lateral (LL) del pez cebra (*Danio rerio*) para descifrar los mecanismos por los cuales la AEE afecta el ensamblaje de los circuitos sensoriales en desarrollo. La LL permite que los peces y anfibios detecten el movimiento del agua y los cambios de presión, y consiste en grupos de neuromastos que contienen células ciliadas mecanosensoriales (CC) innervadas por neuronas aferentes (NAfs) y eferentes.

Sobre-expresamos canales hKir2.1 para silenciar la AEE en una sola NAF de la LL y examinamos el crecimiento de su árbol axonal en entornos competitivos (neuronas vecinas activas) y no competitivos (supresión global de AEE, neuronas vecinas inactivas). Nuestros resultados indican que silenciar una sola NAF de la LL en un entorno competitivo reduce el área de innervación, altera la complejidad del árbol axonal e incrementa las tasas de formación, eliminación, retracción y extensión de ramas. En contraste, la supresión global de la AEE no afecta el área de innervación, pero conduce a árboles axonales inestables, con tasas aumentadas de retracción y extensión de ramas.

Estos resultados sugieren que la AEE regula la extensión y retracción de ramas independientemente de la actividad en las células vecinas, pero la capacidad de detener la formación y eliminación de ramas, así como de regular el territorio del árbol, es un proceso competitivo dependiente de la actividad. Nuestro estudio proporciona evidencia *in vivo* de que una regla de competencia basada en la actividad regula el crecimiento y la maduración de los árboles axonales de las NAfs durante el desarrollo de la LL.

# TÍTULO Y RESUMEN EN INGLÉS

## TITLE

### **ROLE OF ELECTRICAL ACTIVITY IN THE ESTABLISHMENT OF CENTRAL AXONAL PROJECTIONS OF ZEBRAFISH LATERAL LINE AFFERENT NEURONS.**

## ABSTRACT

Spontaneous electrical activity (SEA) is essential for the proper establishment of sensory systems. We use Zebrafish (*Danio rerio*) lateral line (LL) to decipher the mechanisms by which SEA affects the assembly of developing sensory circuits. The LL allows fishes and amphibians to detect water motion and pressure changes and consists of clusters of neuromasts, which contain mechanosensory hair cells (HC) innervated by afferent (ANs) and efferent neurons.

We over-expressed hKir2.1 channels to silence SEA in single LL ANs and examined axonal arbor growth in competitive (active neighboring neurons) and non-competitive (global suppression of SEA, inactive neighboring neurons) environments. Our results indicate that silencing single LL ANs in a competitive environment reduces innervation area, alters axonal arbor complexity, and increases branch formation, elimination, retraction, and extension rates. In contrast, global suppression of SEA does not affect the innervation area but leads to unstable axonal arbors, with increased branch retraction and extension rates.

These results suggest that SEA regulates branch extension and retraction regardless of activity in neighboring cells, but the ability to arrest branch formation and elimination, and to regulate arbor territory, is an activity-dependent competitive process. Our study provides in vivo evidence that an activity-based competition rule regulates axonal arbor growth and maturation of developing LL ANs.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Contexto y relevancia

Una de las preguntas centrales en el campo de las neurociencias es entender cómo se forman los circuitos neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso. Si bien hay numerosas pruebas que sugieren el papel crucial de los programas genéticos en este proceso, aún no está claro cómo la actividad eléctrica puede influir en la estructura y la función de los circuitos neuronales en desarrollo (Zhang y Poo, 2001).

El establecimiento de los circuitos neuronales encargados de procesar la información sensorial es dependiente de la actividad eléctrica espontánea (AEE) o independiente de la experiencia, la cual se genera dentro de los mismos órganos sensoriales (Huberman et al., 2008). Tanto en los sistemas visual como somatosensorial en desarrollo, se observan ráfagas de potenciales de acción intercaladas con períodos de quiescencia, presentes en grupos de neuronas que comparten campos receptivos (Meister et al., 1991; Khazipov et al., 2004). Patrones similares de actividad se han identificado en el sistema auditivo antes del inicio de la audición (Lippe, 1994; Sonntag et al., 2009; Jones et al., 2007). Esta actividad independiente del sonido se origina en la cóclea (Lippe, 1994; Jones et al., 2007; Tritsch et al., 2007), y desempeña un papel crucial en la supervivencia y maduración de las neuronas auditivas (Mostafapour et al., 2000; Glueckert et al., 2003), así como en el desarrollo de las sinapsis aferentes (Erazo-Fischer et al., 2007; McKay y Oleskevich, 2007), y el refinamiento de los mapas tonotópicos (Kandler et al., 2009).

## 2. La línea lateral del pez cebra

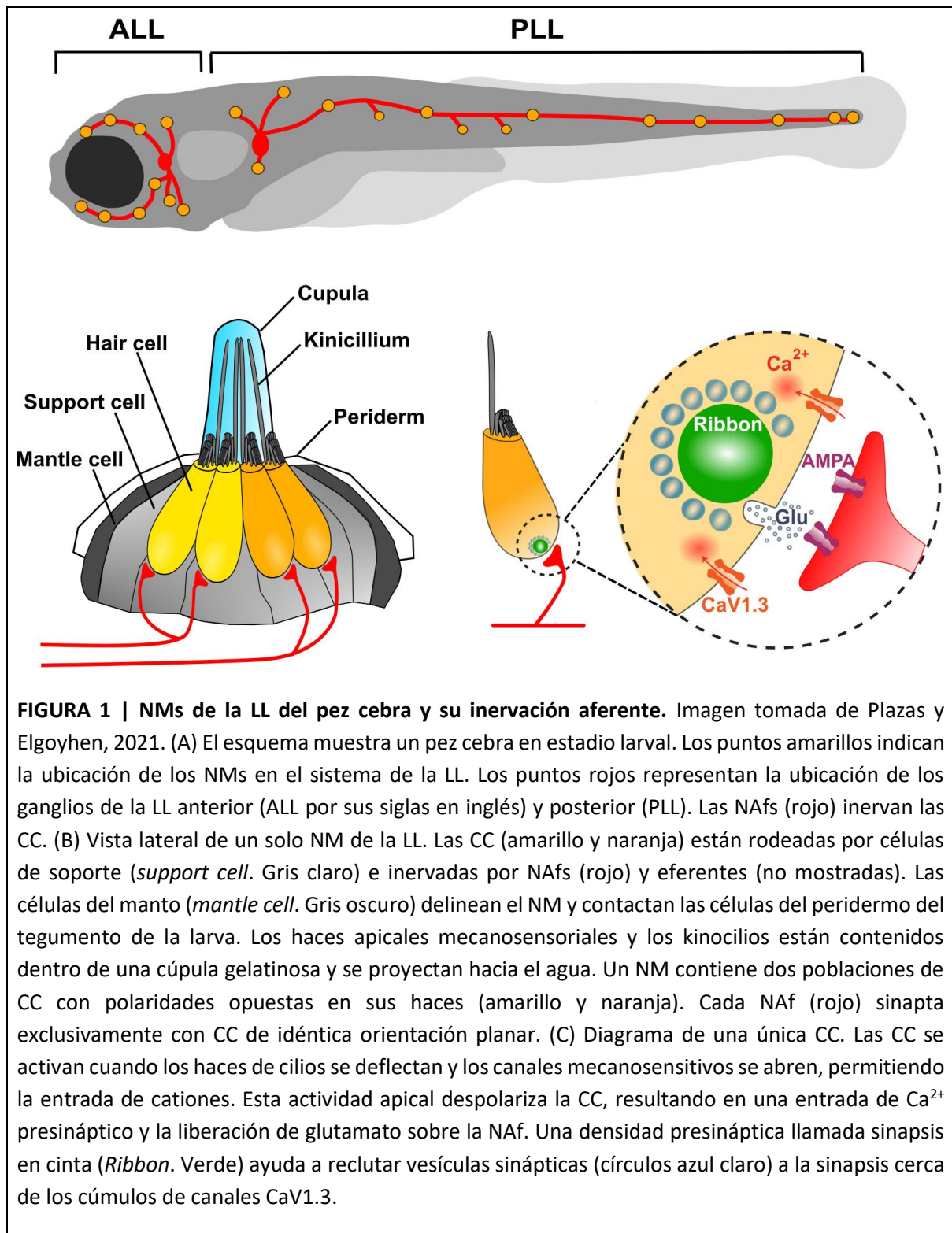
### 2.1 Anatomía y función de la línea lateral del pez cebra

La línea lateral (LL) es el órgano sensorial que detecta los movimientos del agua y los cambios de presión relativos al cuerpo del animal en peces y anfibios siendo crucial para las respuestas de escape, evitar obstáculos y la reotaxis (Montgomery et al., 2000). Está compuesta por una serie de agrupaciones celulares llamadas neuromastos (NMs), que incluyen células ciliadas (CC) mecanosensitivas inervadas por neuronas aferentes (NAfs) y eferentes, y están rodeadas por células no sensoriales de soporte (Fig. 1) (Metcalf et al., 1985; Raible y Kruse, 2000; Gompel et al., 2001). Las NAfs de la LL son bipolares. Sus axones centrales proyectan hacia el núcleo octavolateral medial en el cerebro medio, donde se integra la información sensorial, y sus axones periféricos inervan los NMs. Las CC de la LL comparten características estructurales, funcionales y moleculares con las CC del oído

interno de mamíferos (Whitfield, 2002). Por esta razón, la LL ha sido ampliamente utilizada para el estudio de las bases genéticas de la audición y el equilibrio (Nicolson, 2005). El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un modelo animal de elección para el estudio del desarrollo de vertebrados. Una de sus mayores ventajas es la transparencia de sus embriones y larvas, lo que permite realizar estudios de imágenes a nivel de célula única *in vivo* y en un organismo intacto. Además, se han desarrollado técnicas eficientes de transgénesis y existen numerosas líneas transgénicas disponibles con expresión de genes reporteros en tejidos específicos.

La LL se divide en dos ramas principales: la LL anterior (LLA) y la posterior (LLP). La unidad funcional de la LL es una estructura llamada NM (Fig. 1). Los NMs maduros tienen una morfología circular y están compuestos por 15-20 CC mecanosensoriales ubicadas en el centro, rodeadas por células no sensoriales de soporte y nodrizas. Las CC responden a la deflexión de sus cilias por el movimiento del agua. Estas cilias presentan un kinocilio único de mayor tamaño (con un arreglo de microtúbulos 9+2) junto con numerosas estereocilias, proyecciones de actina. Las cilias están protegidas por una cúpula formada por una sustancia gelatinosa de proteínas y polisacáridos, que se cree que es secretada por otro tipo celular no ciliado del NM, las células de la envoltura (*mantle cells*), y que desempeña una función protectora (Kindt et al., 2012).

Los NMs pueden encontrarse ubicados externamente, cerca de las escamas, o más internamente, en una especie de canal interno bajo la epidermis. Estas variaciones en la disposición espacial de los NMs confieren al sistema sensorial capacidades mecanorreceptoras diversas. Por un lado, los NMs más expuestos al medio externo poseen un amplio rango de detección de movimiento, determinado por el tamaño y la forma de sus microvellosidades. Por otro lado, la estructura en forma de canal permite que los NMs se ubiquen en un sistema de red que facilita una detección más sofisticada del movimiento, como, por ejemplo, la detección de presiones diferenciales. Se postula que esta disposición de los NMs podría estar asociada con la detección de movimientos sutiles que podrían ser provocados por presas intentando evadir a un depredador (Bleckmann y Zelick, 2009).



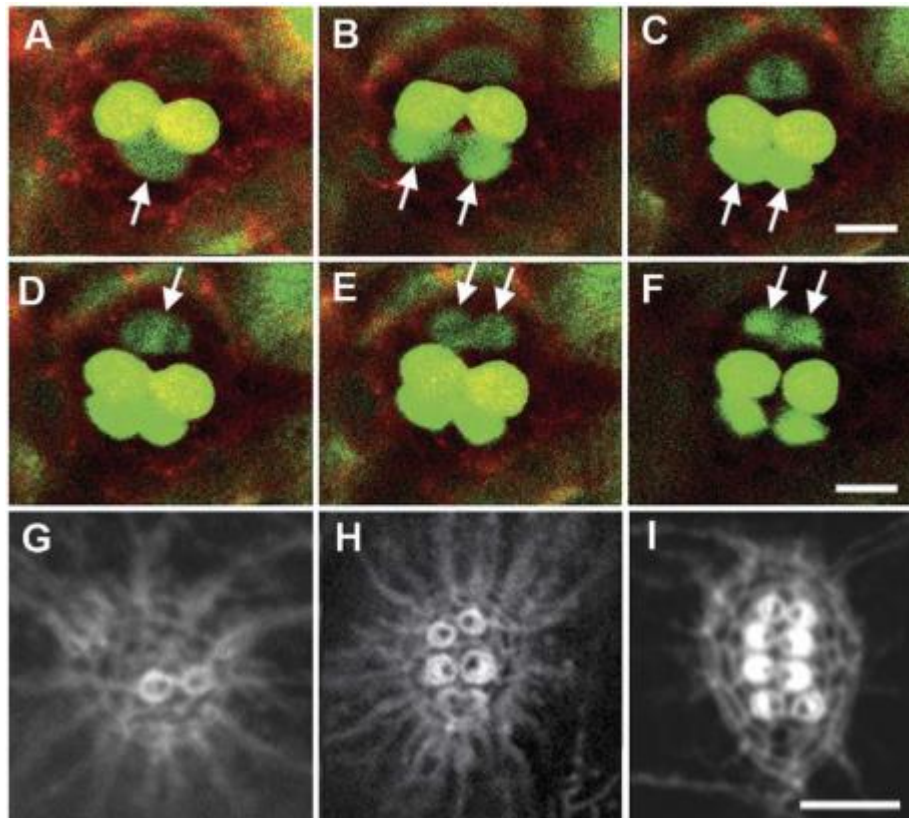
## 2.2 El desarrollo de la LL del pez cebra

La LLP se origina como una placoda, es decir, un engrosamiento epidérmico, que se encuentra justo detrás de la vesícula ótica y se divide entre las 18-20 horas posteriores a la fertilización (hpf). Esto da lugar a un pequeño grupo de aproximadamente 20 células que se

diferenciarán en neuronas sensoriales, y otro grupo de alrededor de 100 células que formarán un primordio. A las 20 hpf, este primordio comienza a migrar en dirección caudal y, para las 40 hpf, llega al extremo de la aleta caudal del embrión. Durante esta migración, las neuronas sensoriales extienden sus axones, seguidas por las células gliales, encargadas de mielinizar los axones. Conforme el primordio avanza, deposita grupos de aproximadamente 20 células, llamados proneuromastos, que al cabo de unas pocas horas comienzan a convertirse en NMs funcionales. Una vez que el primer primordio alcanza su destino más caudal, un segundo primordio se origina desde la misma placoda y sigue la misma ruta que el primero. Sin embargo, este segundo primordio es más pequeño y avanza significativamente más lento, tardando casi una semana en llegar al nivel del ano. A medida que avanza, deposita NMs a una menor distancia entre ellos en comparación con los del primer primordio (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007). Para explicar la guía del primordio a lo largo de su recorrido, se ha propuesto la existencia de quimiorreceptores que dirigen al primordio a lo largo de la línea horizontal del mioseptum.

## 2.3 El funcionamiento de los NMs como órgano sensorial

Una característica fundamental de los NMs es la polaridad planar que desarrollan las CC. Después de la deposición del proneuromasto, las células progenitoras comienzan a dividirse, colocándose en posiciones opuestas y desarrollando sus cilios (~40-50) y su único kinocilio. Inicialmente, el kinocilio se encuentra en el centro de la célula, pero durante el proceso de maduración, se desplaza hacia un extremo, adoptando una disposición simétrica respecto a su célula hermana (Fig. 2 y 3). Se ha identificado la presencia de VANG2, una proteína implicada en el establecimiento de la polaridad planar en diversos organismos, incluidas las CC del oído interno de mamíferos. En el contexto específico del pez cebra, se sugiere que esta proteína dirige la posición de los kinocilios para que asuman la configuración mencionada anteriormente; de hecho, cuando esta proteína está mutada, los kinocilios pueden ubicarse en cualquier posición de manera aleatoria (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007).

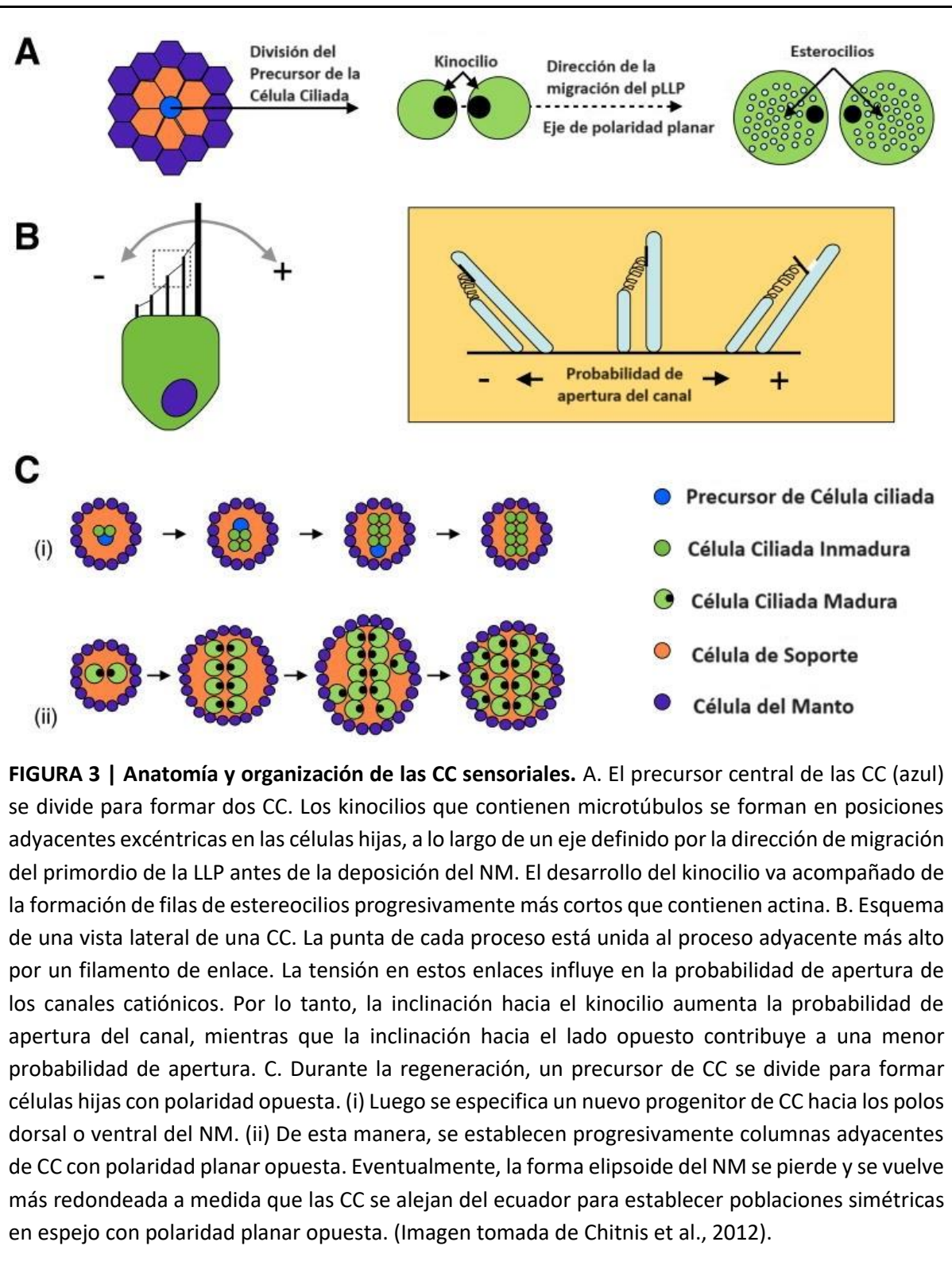


**FIGURA 2 | Simetría especular de las CC durante la regeneración.** (A–F) Células precursoras individuales se dividen para formar dos CC inmaduras. (G) A medida que las CC se diferencian, forman un kinocilio central rodeado por un conjunto de estereocilios ricos en actina (blancos en esta figura, debido a la fluorescencia de rodamina-faloidina). (H) Dentro de cada par de CC, el kinocilio se desplaza hacia la célula hermana, resultando en una polarización simétrica en espejo de las dos células. (I) A medida que nuevas células precursoras aparecen dorsal y ventralmente al primer par, se genera una fila dorso-ventral de pares simétricos. Este patrón simple puede ayudar a que los axones aferentes establezcan conexiones apropiadas, ya que se sabe que, de las Naf que inervan cada NM, unas se conectan a todas las CC de una polaridad y otras se conectan a las CC de la polaridad opuesta (reproducido de López-Schier y Hudspeth, 2006. Imagen tomada de Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007).

Gracias a la producción de CC en espejo, cada NM adquiere una cantidad equivalente de células polarizadas en direcciones opuestas. Se postula que esto podría facilitar la formación de conexiones sinápticas, ya que, se ha observado que una sola Naf contacta únicamente CC de la misma polaridad (Nagiel et al. 2008; Badalà et al., 2007). Por otro lado, a diferencia de los NMs depositados por el primer primordio, que presentan una orientación antero-posterior, aquellos depositados por el segundo primordio muestran una orientación dorso-ventral. De esta manera, la configuración estructural de los NMs permite al pez cebra detectar movimientos del agua sin importar su dirección de origen.



Como ocurre con muchas células sensoriales, las CC muestran una liberación continua de neurotransmisor en reposo (liberación tónica). Cuando el movimiento mecánico se transmite desde el agua al NM, la cúpula se dobla y se desplaza, lo que resulta en la apertura de canales iónicos mecanosensitivos debido a la deflexión del kinocilio y las estereocilias de las CC. Los kinocilios y las estereocilias están dispuestos en forma de escalera y están conectados por tip-links, unos filamentos extracelulares que permiten una flexión coordinada en la misma dirección dentro de una célula ciliada. La intensidad del impulso nervioso será proporcional a la fuerza del estímulo, ya que una mayor flexión conlleva a la apertura de un mayor número de canales iónicos, lo que incrementa la permeabilidad iónica de la CC. En respuesta a un flujo de agua proveniente de una dirección específica, algunas CC experimentarán despolarización mientras que otras se hiperpolarizarán (Fig. 3). Esto ocurre debido a la polaridad contraria que adquieren las CC del NM. Cuando las cilias se desvían en dirección al kinocilio, se produce una despolarización (es decir, una apertura de los canales), mientras que la deflexión en la dirección opuesta conlleva a una hiperpolarización. Como resultado, las células que experimentan despolarización liberan más neurotransmisor, lo que aumenta su tasa de transducción de señal, mientras que las células que experimentan hiperpolarización liberan menos neurotransmisor, lo que disminuye su tasa de transducción de señal.



## 2.4. Línea Lateral Posterior (LLP) y Neuronas Aferentes (NAfs)

Como mencionamos anteriormente, dado que la orientación planar determina la dirección de excitabilidad máxima de las CC, cada NM es sensible a direcciones opuestas del flujo de agua (Faucherre et al., 2009; Haehnel-Taguchi et al., 2014; Nagiel et al., 2008).

La LLP está compuesta principalmente por NMs horizontales, cuyo eje de sensibilidad máxima es paralelo al eje anteroposterior del cuerpo del animal (Pujol-Martí y López-Schier, 2013; Raible y Kruse, 2000). En el estadio larval, la línea lateral anterior (LLA) y la LLP contienen aproximadamente 60 NAfs cada una (Valera et al., 2021). Las NAfs son bipolares y proyectan fibras periféricas hacia las CC y axones o proyecciones centrales que se bifurcan en una rama anterior y otra posterior, arborizándose a lo largo de toda la longitud del cerebro medio ipsilateral (Fig. 4A y 4B).

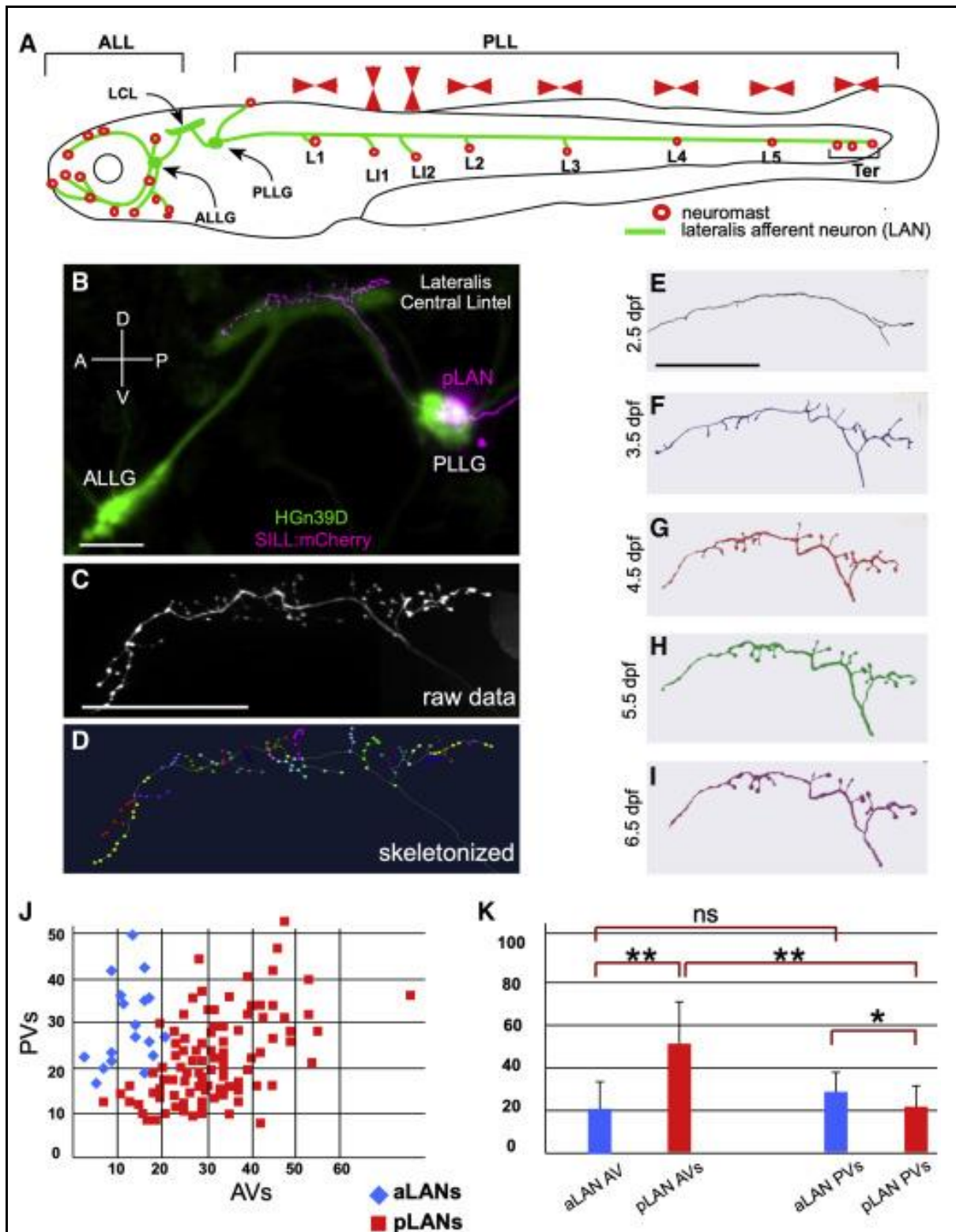
Las proyecciones centrales de las NAfs presentan una organización laminar, que refleja de manera aproximada la distribución espacial de los NMs a través de un arreglo topográfico (somatotópico) (Fig. 4A y 4B) (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007; Pujol-Martí y López-Schier, 2013; Liao y Haehnel, 2012). Normalmente, cada NM es innervado por 4 NAfs (Faucherre et al., 2009; Nagiel et al., 2008; Lozano-Ortega et al., 2018). Como cada NAf establece sinapsis selectivamente con múltiples CC que comparten la misma orientación, las neuronas están sintonizadas con una única dirección de estímulos mecánicos (Lozano-Ortega et al., 2018; Pujol-Martí et al., 2012; Trapani y Nicolson 2010). Las NAfs tienen un campo receptivo pequeño, limitado a la cercanía del NM innervado, captando la hidrodinámica local ipsilateral (Van Netten y McHenry, 2014). Así, la vía aferente transmite en paralelo tanto la dirección como la localización del movimiento del agua (Coombs, S., 2001).

## 2.5. Varicosidades y Arquitectura de la LLP

Las varicosidades son engrosamientos de membrana que se observan en las terminales axonales de las neuronas y están relacionadas con la formación de sinapsis (Edwards et al., 2007; Meyer & Smith, 2006). La medición de varicosidades es útil porque permite inferir la conectividad sináptica y la estructura neuronal a través de técnicas de microscopía de fluorescencia. En el caso de las NAfs de la LL, se ha observado que las varicosidades pueden ser usadas como un proxy para identificar sinapsis, lo que facilita la adquisición de datos en estudios de alta resolución.

Por ejemplo, Valera et al. (2021) analizaron el estadio larval del pez cebra, enfocándose en la innervación aferente de la LLP y la LLA, cada una de las cuales está compuesta por

aproximadamente 60 NAfs. Estas neuronas tienen un campo receptivo limitado a la proximidad inmediata del NM inervado, lo que les permite detectar la hidrodinámica local (Van Netten & McHenry, 2013). En este estudio, Valera et al. (2021), mediante la expresión de proteínas fluorescentes en NAfs individuales y la realización de reconstrucciones tridimensionales de alta resolución de sus proyecciones centrales, describieron la arquitectura de estas NAfs a lo largo del desarrollo. Al seguir su evolución desde los 2 dpf hasta los 7 dpf, observaron que a los 5,5 dpf los árboles axonales centrales ya están estabilizados. Más aún, se reportó la presencia de varicosidades a lo largo de las proyecciones centrales, tanto la rama anterior como la posterior. Para ello, se utilizó la coexpresión de mCherry y Synapsin1-GFP en NAfs de la LL para evaluar la correlación entre las varicosidades terminales y las sinapsis. Se descubrió que el número de varicosidades y ramas terminales se relaciona de manera lineal, y la mayoría de las varicosidades mCherry (+) coincidieron con las señales de Synapsin1-GFP, lo que valida el uso de varicosidades como un indicador confiable de sinapsis. En dicho estudio, se encontró que las NAfs de la LLA tienen árboles axonales centrales más simples en comparación con las de la LLP, lo que se refleja en la cantidad de varicosidades presentes en cada tipo de neurona (Fig. 4J y K).



**FIGURA 4 | La LL en larvas de pez cebra.** (A) Representación esquemática de una larva de pez cebra mostrando los NMs (círculos rojos) de la LLA (ALL por sus siglas en inglés) y LLP (PLL por sus siglas en inglés). Los NMs posteriores están etiquetados (L para troncal y Ter para terminal), y se indica la polarización planar de sus CC (horizontal o vertical) mediante flechas rojas. Las NAFs de la LL (LANs) y la proyección central de la LL (LCL) se muestran en verde. (B) Imagen confocal de una larva transgénica HGn39D (verde) inyectada con Sill (rojo), mostrando el soma neuronal de una NAF de la

LLP (pLAN) dentro del ganglio posterior (PLLG) y su posición dentro de la proyección central (LCL). También se muestra el ganglio anterior (ALLG). (C) Estructura de la proyección central de una NAF individualmente marcada. (D) Esqueletización de la misma proyección mostrada en (C), con las varicosidades terminales marcadas con puntos de colores.

(E–I) Arborizaciones centrales esqueletizadas de la misma NAF durante días consecutivos, desde 2,5 hasta 6,5 días post-fertilización (dpf). En todos los paneles, el anterior está a la izquierda y el dorsal hacia arriba.

(J) Las NAFs de la LLA (aLANs) y de la LLP (pLANs) (respectivamente, diamantes azules y cuadrados rojos) constituyen clases morfológicas distinguibles según el número de varicosidades anteriores y posteriores (respectivamente AVs y PVs).

(K) Gráfico de barras que muestra diferencias significativas entre NAFs de la LLA (aLANs. Azul) y NAFs de la LLP (pLANs. Rojo) para AVs y PVs. Las NAFs de la LLA tienen un número similar de AVs y PVs a lo largo de la proyección central.

Las barras de escala son de 50  $\mu$ m. Imagen tomada de Valera et al., 2021.

### 3. Actividad eléctrica espontánea (AEE), una perspectiva desde la LL del pez cebra

#### 3.1. Importancia de la AEE en la formación de circuitos neuronales

Estudios previos han evidenciado que la AEE desempeña un papel crucial en la configuración de los patrones de conexión en los circuitos en desarrollo (Hanson y Landmesser, 2004; Plazas et al., 2013) y durante los primeros estadios de la sinaptogénesis (Buffelli et al., 2003; Kerschensteiner et al., 2009; Soto et al., 2012). Sin embargo, existen pocas evidencias *in vivo* que demuestran este rol de la AEE.

Específicamente, los circuitos sensoriales se establecen en fases tempranas del desarrollo, siendo característico que esta configuración dependa de la AEE generada dentro de los propios órganos sensoriales (Meister et al., 1991; Kandler et al., 2009; Galli y Maffei, 1988; Torborg y Feller, 2005; Forsythe, 2007). En el oído interno de mamíferos, la AEE se origina por la liberación de glutamato desde las CC, lo que activa los nervios auditivos aferentes (Tritsch et al., 2007), y su presencia antes del inicio de la audición es vital para la supervivencia neuronal en el núcleo coclear y para refinar los mapas tonotópicos en los núcleos auditivos (Friauf y Lohmann, 1999; Kandler, 2004; Leake et al., 2006).

### 3.2. AEE y su rol en la competencia

Estudios previos han demostrado que el crecimiento de los árboles axonales es un proceso altamente dinámico, en el que se balancean la formación y eliminación de ramas, con solo una fracción de las nuevas ramas siendo mantenidas en el árbol maduro (Hua y Smith, 2004). Este equilibrio es crucial para la exploración eficiente en busca de parejas sinápticas apropiadas, un fenómeno que se ha observado tanto en mamíferos como en otros vertebrados, incluyendo al pez cebra. (Shatz y Stryker, 1978; Stryker y Harris, 1986; Antonini, y Stryker, 1993; Yu et al., 2004; Zhao y Reed, 2001; Ruthazer et al., 2003).

El silenciamiento de la actividad eléctrica de neuronas individuales, mediante la expresión exógena del canal rectificador interno de K<sup>+</sup> humano hKir2.1, ha sido una herramienta efectiva para estudiar los efectos de la actividad neuronal en el desarrollo axonal (Burrone et al., 2002). Este enfoque ha permitido desentrañar cómo la inhibición de la actividad de una neurona puede afectar la competencia entre axones vecinos, sugiriendo que la actividad diferencial entre axones puede ser un factor clave en la estabilización y crecimiento de ramas axonales.

Las reglas que subyacen a la segregación de axones en competencia y a la estabilización y refinamiento de los árboles axonales no parecen ser universales en todas las regiones del cerebro ni en todos los tipos de células (Kirkby et al., 2013; Hua et al., 2005). Sin embargo, se sugiere que el neurotransmisor liberado por las vesículas sinápticas juega un papel crucial en este proceso. Este neurotransmisor podría mediar los efectos observados al unirse a receptores expresados por los árboles axonales cercanos o incluso a células auxiliares, las cuales podrían modular el crecimiento de los árboles axonales a través de señales retrógradas. Entre los posibles candidatos para estas señales retrógradas se encuentran las neurotrofinas, el óxido nítrico y el ácido araquidónico (Schmidt et al., 2004; Cogen y Cohen-Cory, 2000; Cohen-Cory y Fraser, 1995).

Este conocimiento es relevante para entender cómo la AEE y los fenómenos dependientes de la actividad afectan el crecimiento y la maduración axonal en sistemas sensoriales como la LLP en el pez cebra, que es el foco de mi tesis.

Sin embargo, se desconoce la contribución de la AEE al establecimiento de la vía aferente. Esto se debe principalmente a que muchos sistemas sensoriales de mamíferos son poco accesibles durante los estadios tempranos del desarrollo, lo que limita el estudio de los eventos celulares y moleculares relacionados con la formación de estos circuitos, *in vivo* y en su contexto natural.

### 3.3. La LL del pez cebra: un modelo para estudiar la actividad eléctrica en el desarrollo neuronal

Estas evidencias indican que la actividad eléctrica desempeña un papel crucial en la estabilización de ramas, la maduración y el refinamiento de circuitos neuronales. Además, que el crecimiento axonal es un proceso dinámico y competitivo. Estos conceptos no solo son aplicables a los mamíferos, sino también al pez cebra. El estudio del sistema mecanosensorial de la LLP del pez cebra nos proporciona un modelo valioso para explorar cómo la AEE y la competencia dependiente de la actividad influyen en el establecimiento, crecimiento y la maduración axonal.

La LLP de peces y anfibios ofrece una oportunidad para abordar estas interrogantes, ya que permite sortear muchos de estos desafíos y proporciona un modelo excelente para investigar el papel de la AEE en el ensamblaje de los circuitos sensoriales en organismos intactos. Al igual que las NAFs del oído interno de mamíferos, las de la LLP exhiben AEE en etapas avanzadas del desarrollo (Trapani y Nicolson, 2011). No obstante, aún se desconoce cómo influye esta AEE en la correcta formación de la vía aferente de la LLP.

### 3.4. Manipulación individual y global de la AEE

En un estudio realizado por Hua et al. (2005), se utilizó la manipulación de la actividad eléctrica a nivel de neuronas individuales y también de manera global para entender su papel en el crecimiento y la competencia entre árboles axonales. Los investigadores llevaron a cabo experimentos en los que suprimieron la actividad eléctrica a nivel de célula única en neuronas ganglionares de la retina (NGRs) de peces cebra, mediante la expresión de hKir2.1. Dicha manipulación mostró una inhibición significativa del crecimiento del árbol axonal. Este efecto fue resultado de la actividad del canal hKir2.1, que suprime la excitabilidad eléctrica neuronal y, como consecuencia, la liberación de neurotransmisores.

Luego, los investigadores estaban interesados en estudiar las reglas de competencia basadas en la actividad en el desarrollo neuronal, para eso, manipularon globalmente la actividad eléctrica. Llevaron a cabo experimentos en los que suprimieron la actividad eléctrica de NGRs de peces cebra mediante inyecciones intraoculares de tetrodotoxina (TTX), un potente bloqueador de los canales de sodio dependientes de voltaje, que impide la generación de potenciales de acción. En este contexto, observaron que el tratamiento con TTX, al bloquear la actividad eléctrica de todas las NGRs, no afectaba la morfología de los axones. Sin embargo, lo más notable fue que este tratamiento restableció el crecimiento de los árboles axonales en células que habían sido previamente inhibidas a nivel individual mediante la



expresión de Kir2.1. Este "rescate" farmacológico sugiere que la inhibición del crecimiento axonal en células aisladas podría deberse a la competencia de axones vecinos, la cual se elimina cuando se suprime la actividad eléctrica de todas las células vecinas mediante TTX. Así, el uso de TTX proporciona una herramienta valiosa para estudiar los efectos de la actividad eléctrica global sobre la competencia y el crecimiento axonal durante el desarrollo del sistema nervioso.

### 3.5. Investigación preliminar: Rol de la actividad eléctrica en las proyecciones axonales

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, y que forman parte de la tesis de doctorado de Salatino, L. (2024) indican que la AEE desempeña un papel fundamental en el desarrollo de las proyecciones axonales centrales de las NAFs de la LLP. Estos hallazgos revelan que la supresión de la AEE en NAFs individuales, a través de la sobreexpresión estocástica del canal de potasio hKir2.1, conduce a un desarrollo anormal de los árboles axonales que se proyectan hacia el cerebro medio, resultando en una reducción del área de inervación a nivel central. Además, los estudios *in vivo* de la dinámica de crecimiento axonal de las NAFs silenciadas y de tipo WT indican que las NAFs silenciadas muestran ramas más móviles y menos consistentes (ramas que no exhiben ningún evento de motilidad y que están presentes del inicio al final durante una hora de registro) que las NAFs WT. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de la AEE a nivel de neurona única retrasa o impide la correcta maduración de los árboles axonales centrales de las NAFs.

# OBJETIVOS

El propósito principal de este proyecto es descubrir *in vivo* nuevos aspectos del papel de la actividad eléctrica espontánea (AEE) en la formación de circuitos sensoriales durante el desarrollo del sistema nervioso, utilizando la inervación aferente de la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra como modelo. En particular, mi tesis de licenciatura se centra en determinar si la AEE regula el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las neuronas aferentes (NAfs) de la LLP a través de mecanismos actividad dependiente competitivos o no competitivos. Para ello, comparamos el desarrollo de los árboles axonales centrales de NAfs que crecieron en un entorno competitivo, con aquellas que lo hicieron en un entorno no competitivo, donde la AEE fue silenciada globalmente con TTX.

# HIPÓTESIS

Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la supresión de la AEE en NAfs únicas conduce a un desarrollo anormal de los árboles axonales que se proyectan hacia el cerebro medio. Para determinar si este fenómeno es resultado de silenciar una sola neurona rodeada de neuronas activas, examinaremos si el silenciamiento global de la AEE también afecta el desarrollo de las proyecciones centrales de las NAfs.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Mantenimiento de peceras

El laboratorio cuenta con un acuario dividido en dos sistemas de peceras independientes, cada uno con un sistema de filtrado de agua incorporado. El agua de las peceras se obtiene a partir de agua de red purificada a través de un sistema de ósmosis inversa. La temperatura del agua oscila entre 25 y 27 °C, mientras que el pH del agua se considera ideal en un rango de 8,4 a 8,6. Cada sistema está equipado con un filtro biológico que evita que los niveles de amonio alcancen niveles tóxicos para los peces. Los niveles de nitritos y nitratos (<0,3 mg/l) y de pH (7,5/8,0) del agua se mantienen estables con un cambio diario de agua del 10% del total del volumen del sistema. La temperatura ambiente se mantiene entre 24 y 26 °C, mientras que el ciclo de luz y oscuridad se ajusta automáticamente, con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, respectivamente. Los peces son alimentados dos veces por día, con una mezcla de alimento seco comercial (60% TetraColor, 40% TetraMin, Tetra Aquarium supplies), una por la mañana y una por la tarde, complementado con una ración de artemia 3 veces por semana. El alimento seco se prepara con distinto grado de molido, según la edad de los individuos y la artemia se prepara fresca todas las semanas a partir de quistes secos, que salen de la criptobiosis una vez colocados en una solución de agua y sales. Para un cuidado extra, los peces conviven con un gasterópodo (*Planorbis corneous*), el cual se alimenta de los restos de comida que caen al fondo, manteniendo un mayor grado de limpieza de las peceras.

## 2. Cruzas

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) se obtienen mediante la cruce natural de individuos WT de la cepa AB. Estos embriones se crían siguiendo protocolos estándar (Westerfield, 2000) a una temperatura de 28°C en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01% azul de metileno, con un pH de 7,2). Su estadio de desarrollo se determina según su morfología externa (Kimmel et al., 1995).

Las cruzas se llevan a cabo por la mañana para aumentar la probabilidad de fecundación de los ovocitos. Después de la puesta, los embriones se recogen en una placa de Petri con medio E3 y se colocan en una incubadora (HeraTHERM, ThermoScientific) a 28°C. A las 24 horas post fertilización (hpf), se eliminan del medio los embriones no fecundados o muertos, que se identifican fácilmente por su aspecto blanco y opaco, y se cambia el medio por E3 con PTU (Fosfotiouracilo 200µM). El PTU inhibe la melanogénesis al bloquear los pasos

dependientes de la tirosina en la síntesis de melanina (Karlsson et al., 2001). Los peces se mantienen en la incubadora hasta los 5 días post-fertilización (dpf). Luego se trasladan al acuario y, después de dos semanas, se incorporan al sistema de peceras.

### 3. Plásmidos

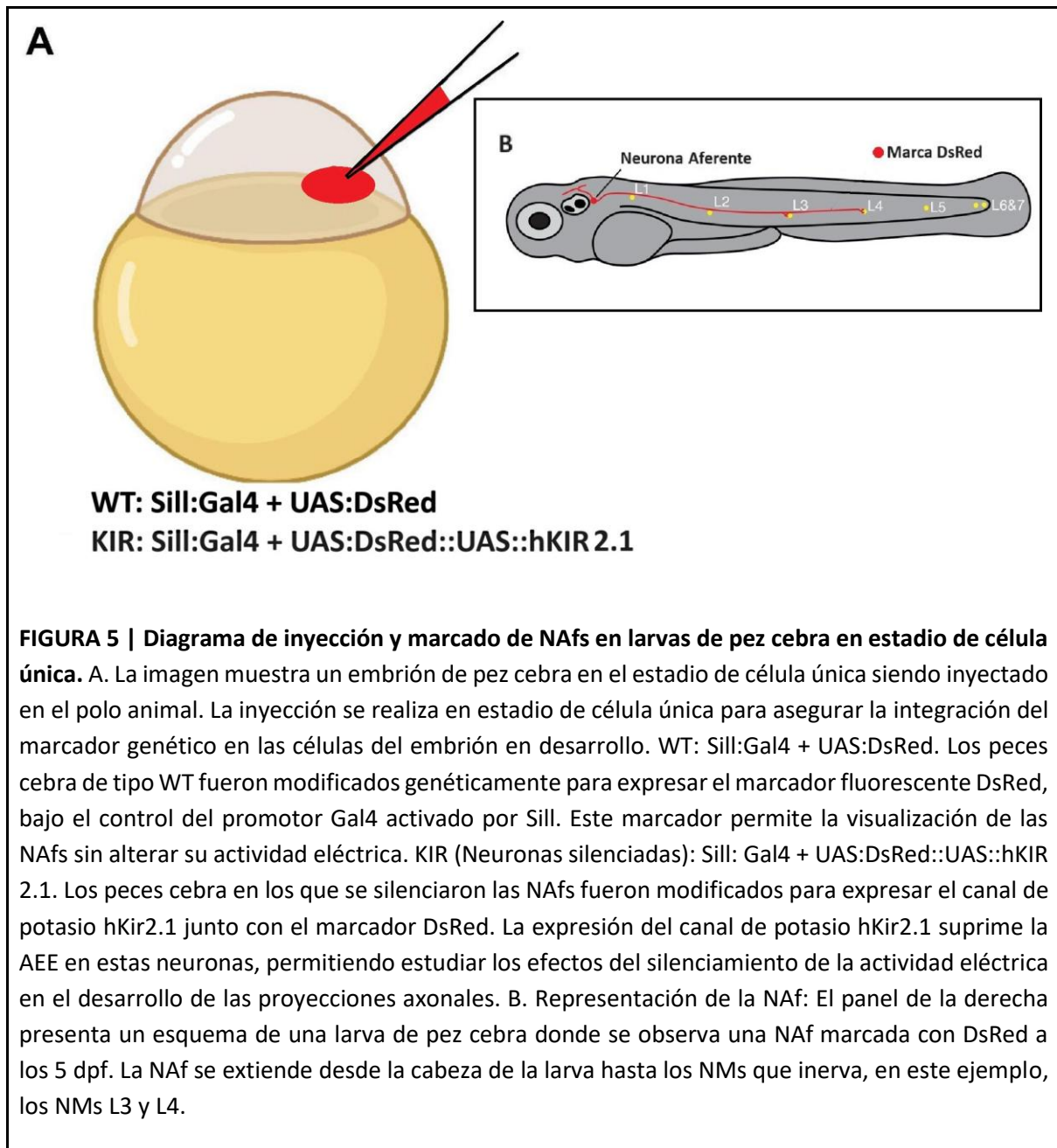
En cuanto al abordaje experimental, llevamos a cabo microinyecciones de ADN plasmídico de diversas construcciones. Para dirigir la expresión génica a las NAFs de la LL, utilizamos la construcción *hsp70:gal4VP16-SILL* (Pujol-Marti et al., 2012). El promotor *Hsp70* es constitutivo y altamente conservado. Esta construcción contiene una secuencia que codifica para la proteína GAL4 fusionada a VP16, un dominio de transactivación derivado del virus del herpes simplex (Sadowski et al., 1988), que actúa como potenciador de la transcripción. El gen *Gal4* codifica para el factor de transcripción GAL4, que reconoce al promotor constitutivo UAS (upstream activation sequence). La especificidad de la expresión se determina mediante la secuencia SILL (sensory innervation of lateral line), una secuencia *enhancer* específico de NAF de la LL (Fauchere, 2009). En todos los tratamientos, se inyectó *hsp70:gal4VP16-SILL* junto con plásmidos que contienen la secuencia UAS.

Para visualizar el fenotipo WT de las NAFs, empleamos la construcción *UAS:DsRed*, que codifica para la proteína fluorescente roja DsRed, permitiéndonos observar la morfología de las proyecciones axonales centrales de estas neuronas. Para silenciar la actividad eléctrica, utilizamos un plásmido que contiene el doble cassette *UAS:DsRed::UAS:hKir2.1*, el cual codifica para la proteína DsRed y el canal de potasio humano hKir2.1.

A los 5 días post-fertilización (dpf), se seleccionan las larvas que expresaban DsRed en NAFs únicas de la LL utilizando una lupa de epifluorescencia (MZ10F, Leica). Las larvas positivas se mantuvieron a 28°C hasta el momento de adquirir las imágenes.

### 4. Microinyecciones de plásmido en embriones

El procedimiento experimental implica microinyecciones de ADN plasmídico en embriones de pez cebra en el estadio de 1 célula, dentro de la primera media hora después de la fecundación (Fig. 5).



Las inyecciones se llevan a cabo con precisión para minimizar el daño al embrión y maximizar la viabilidad. Las condiciones ideales de concentración y volumen de inyección se fundamentan en protocolos previamente desarrollados en el laboratorio, donde se estableció una concentración óptima de 10 ng/μl para cada construcción en la solución de inyección final.

Se utilizó un microinyector WPI PV830, conectado a un extremo a un tubo de nitrógeno que ejerce una presión positiva controlada, y en el otro extremo a un micromanipulador (Narishige MN-153) que sostiene una pipeta de vidrio cargada con la solución a inyectar. Antes de cada inyección, se rompió la punta de la pipeta con una pinza y se dispensó líquido

en una gota de aceite mineral sobre un vidrio de calibración graduado con una resolución espacial de 0,01 mm bajo una lupa (EZ4, Leica). La calibración de la gota de inyección se realizó en base a una curva de calibración de volumen de líquido conocido en función del diámetro de la gota. El volumen óptimo de inyección fue de 1,5 nl en todos los casos, lo que resultó en una masa de aproximadamente 15 pg para cada plásmido inyectado.

Las microinyecciones se llevaron a cabo en el estadio embrionario de 1 célula, los embriones fecundados se dispusieron en una placa de Petri previamente preparada, la cual consta de un lecho de agarosa al 3% que forma canales de 1 mm de ancho. Los embriones se alinearon en estos canales para facilitar la inyección.

Después de la inyección, los embriones se mantuvieron en medio E3 a 28°C. Pasadas 24 horas desde la inyección, se eliminaron los embriones muertos y los restantes se mantuvieron en medio E3 con PTU a 28°C hasta el día de la adquisición de imágenes.

## 5. Montaje para la adquisición de imágenes

Para adquirir las imágenes en el microscopio confocal, el día de adquisición, se preparan las larvas de 5 dpf. Para eso, primero se anestesiaron con metasulfonato de tricaína al 0,02% (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) en solución E3. Luego, se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% y se dispusieron sobre un cubreobjetos con el saco vitelino hacia arriba. La tricaína se utiliza para bloquear los canales de sodio voltaje-dependientes, inhibiendo la generación de potenciales de acción a nivel global. Una vez que la agarosa se solidifica, el cubreobjetos con las larvas se colocó en una cámara de registro, con las larvas orientadas dorsalmente. Posteriormente, se retiró la tricaína y se tomaron las imágenes en medio E3 para reducir cualquier posible interferencia con la actividad eléctrica del sistema en estudio.

## 6. Adquisición de imágenes en tiempo real (Live imaging) y análisis de la dinámica del crecimiento axonal (Time-lapse imaging)

Para investigar *in vivo* la morfología de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL, se tomaron imágenes de resolución de 512 x 512 píxeles utilizando un microscopio confocal (TCS SPE, Leica) equipado con un objetivo de inmersión en agua de 40X y N.A. = 0.8. La configuración de adquisición se estableció mediante el software LAS X (Leica Application Suite X), utilizando una profundidad de intensidad de fluorescencia de 8 bits en el

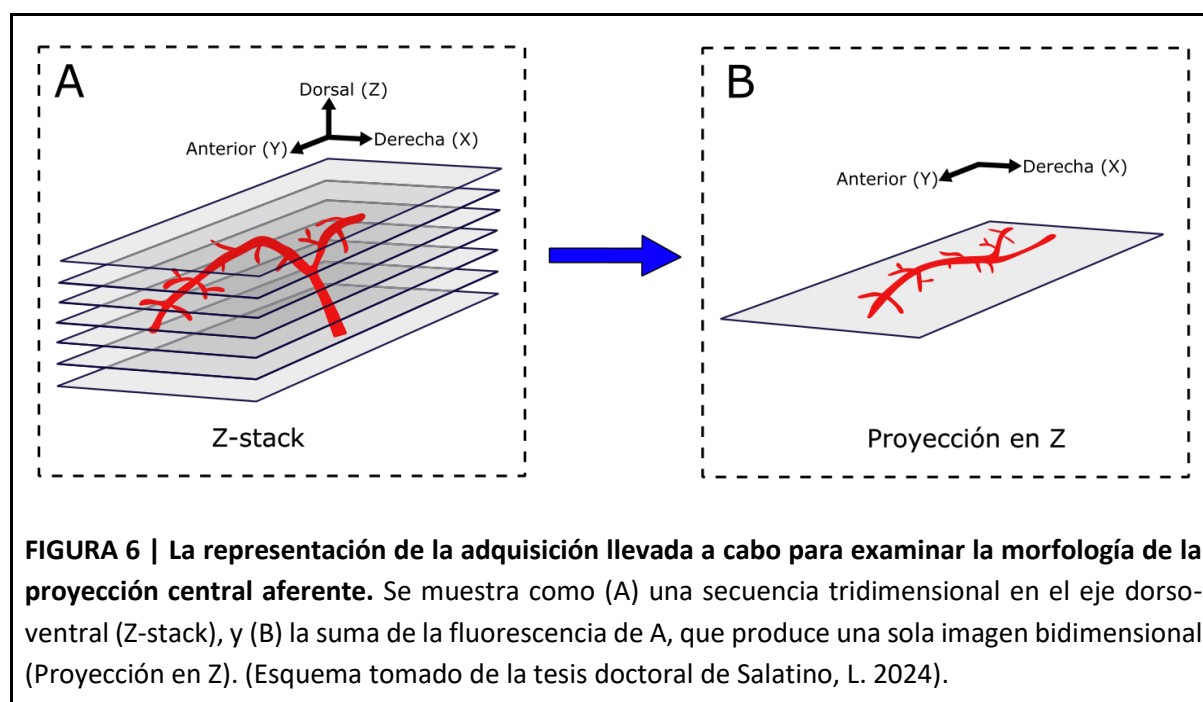
eje XYZ. Se iluminó la cabeza de la larva desde su lado dorsal con un láser de longitud de onda ( $\lambda$ ) de 532 nm y se tomaron imágenes seriadas cada 2  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje dorsoventral de la proyección central, con detección de un espectro de emisión entre  $\lambda = 560$  y  $\lambda = 600$  nm.

Para estudiar la dinámica de crecimiento de la proyección axonal central *in vivo*, se realizó un seguimiento temporal de la neurona en estudio mediante imágenes periódicas cada 5 minutos durante 1 hora de registro (*Time-lapse imaging*). Se adquirió una serie de imágenes cada 2  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje dorsoventral de la proyección central.

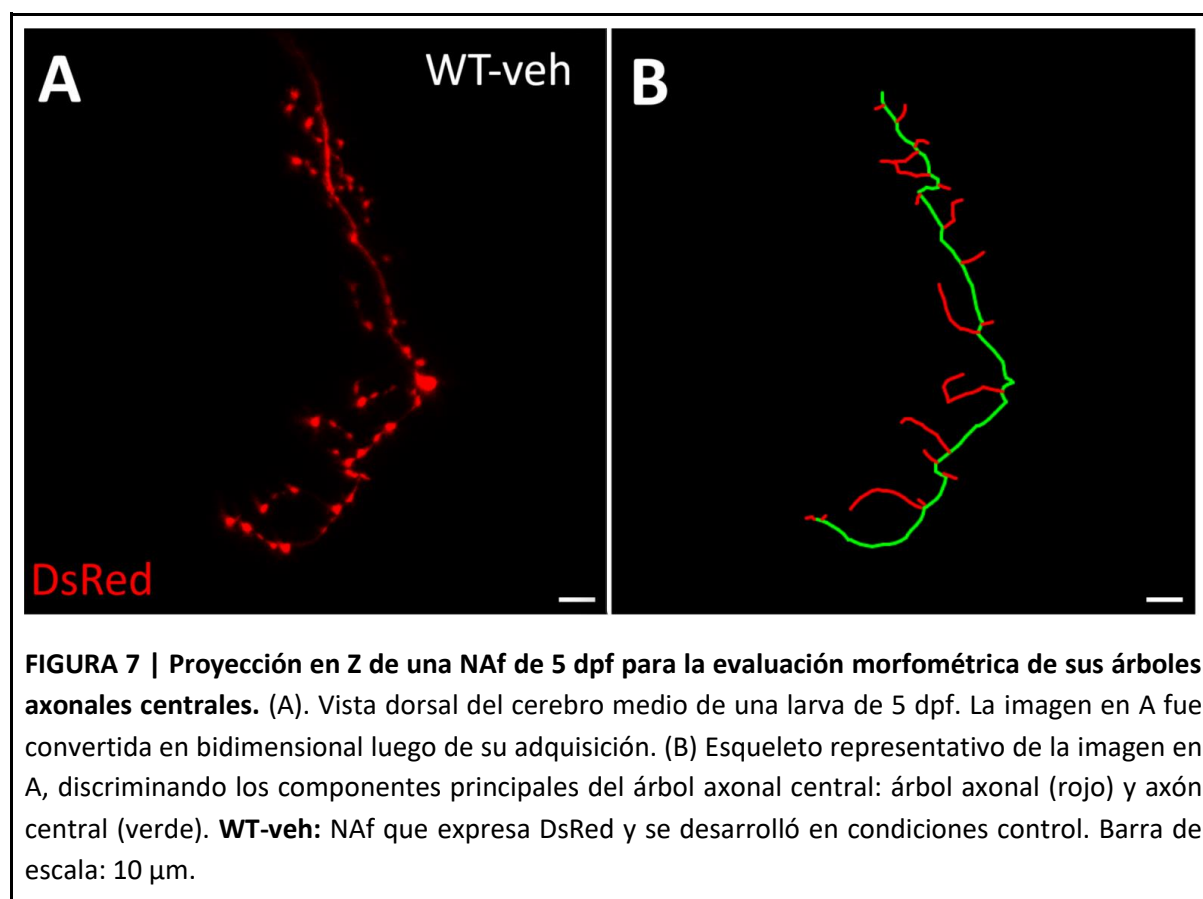
## 7. Análisis de imágenes

### 7.1. Evaluación morfométrica de las proyecciones centrales de las NAfs de la línea lateral.

Se empleó el software ImageJ en su versión distribuida FIJI (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012) para procesar las imágenes de fluorescencia. Se llevó a cabo una proyección en el eje dorso-ventral, fusionando los valores de fluorescencia de cada píxel de todas las imágenes consecutivas en una única imagen bidimensional, como se ilustra en la Fig. 6.



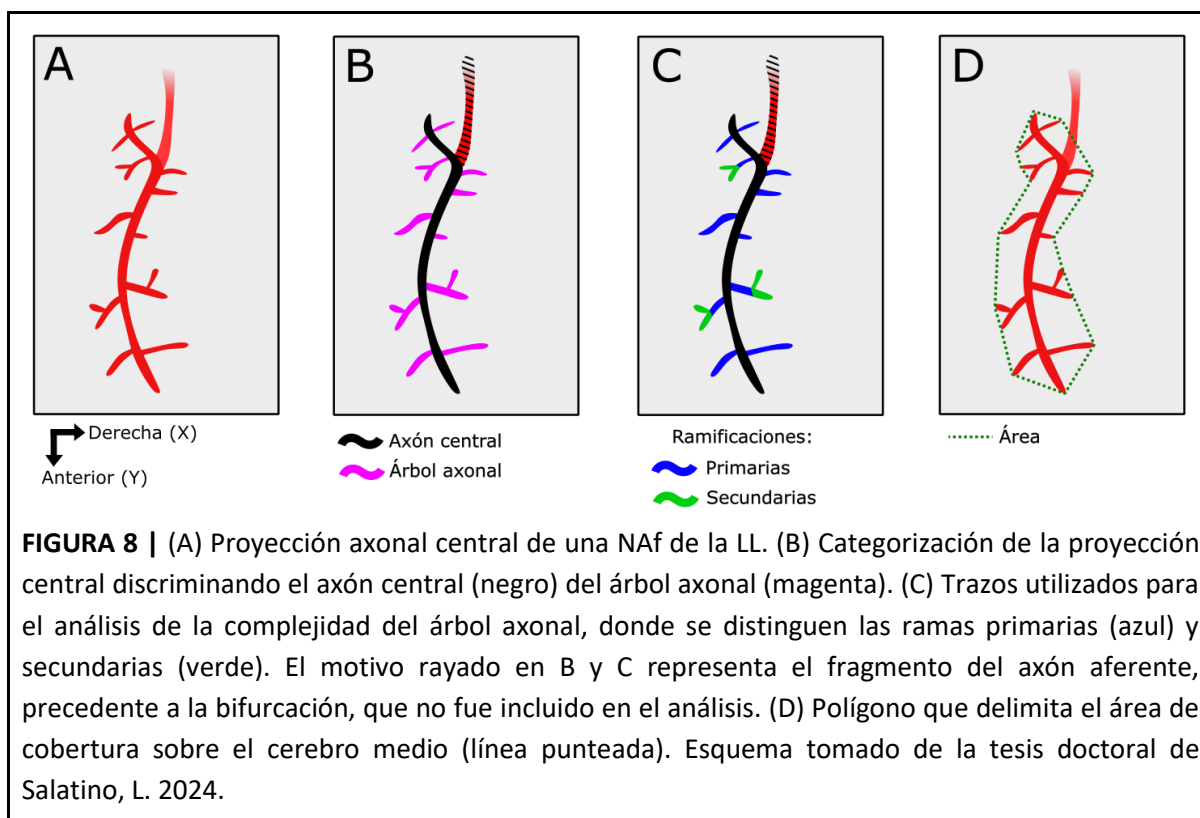
Se llevó a cabo un trazado semiautomático de la fluorescencia utilizando el *plugin* NeuronJ (Meijering et al., 2004) a partir de la proyección en Z para obtener un esbozo representativo del esqueleto neuronal (Fig. 6B y 7).



Se procedió a distinguir el axón central del árbol axonal, y estos grupos se analizaron por separado. El axón central se extiende desde el ganglio aferente y, una vez en el cerebro medio, se divide en dos ramas: una anterior (o larga) y otra posterior (o corta). El tramo intermedio entre el ganglio y su bifurcación no se examinó en este estudio. Los trazados del árbol axonal se realizaron de forma individual (un trazado para cada rama), comenzando desde el axón central y finalizando donde la línea de fluorescencia visualizada se interrumpe o se bifurca, marcando así las ramas de manera individual.

En primer lugar, se determinó el área de cobertura sobre el cerebro medio. Para ello se unió con líneas rectas los extremos de cada rama del árbol axonal y se midió el área de la figura emergente (Fig. 8).





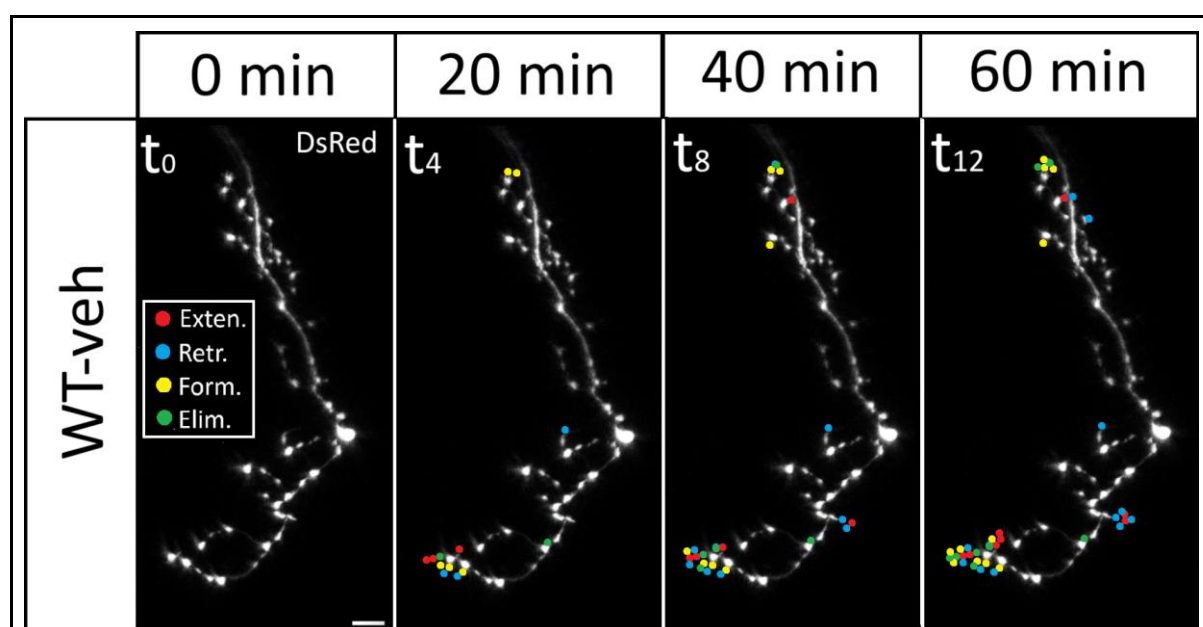
## 7.2. Evaluación de la dinámica de crecimiento de la proyección central

Aprovechando las capacidades del *plugin* NeuronJ, que permite ajustar el esqueleto neuronal después de su creación, optamos por utilizarlo también para investigar la dinámica de crecimiento de la proyección central. El seguimiento temporal de cada Naf implicó la adquisición de 13 series de imágenes, como se mencionó anteriormente, tomadas cada 5 minutos durante 1 hora. El trazado del esqueleto completo se realizó una sola vez en la primera imagen bidimensional de la proyección axonal central correspondiente al inicio de la adquisición ( $t_0$ ). En los tiempos posteriores ( $t_1$  a  $t_{12}$ ), cada imagen adquirida se utilizó para ajustar el esqueleto de la adquisición anterior, hasta completar todas las imágenes. Las modificaciones en las proyecciones axonales centrales se determinaron superponiendo el trazado de  $t_n$  sobre la imagen  $t_{n+1}$ . Se detectaron movimientos de extensión y retracción de las ramas, así como formaciones y eliminaciones de ramas (Fig. 9).

Toda la información recopilada se registró en hojas de cálculo de Microsoft Excel. Se calcularon los siguientes parámetros: motilidad total del árbol axonal (calculada como la suma de las distancias recorridas por la punta de cada rama), tasas de eliminación, formación, extensión y retracción de ramas (calculadas como el número de eventos ocurridos durante 1 hora de registro). Debido a la gran variabilidad en las longitudes de las proyecciones

analizadas, se normaliza cada valor por la longitud del árbol en  $t_0$ . Se calculó la longitud del árbol axonal de la proyección central como la suma de la longitud de todas las ramas del árbol axonal.

Para evaluar la estabilidad de los árboles axonales, se determinó el porcentaje de ramas consistentes: rama que se ve en  $t_0$  y no exhibe ningún evento de motilidad durante la hora de registro.



**FIGURA 9 | Representaciones gráficas eventos de motilidad (Formación, Eliminación, Crecimiento y Retracción).** Utilizando las capacidades del *plugin NeuronJ*, que permite ajustar el esqueleto neuronal tras su creación, decidimos emplearlo para investigar la dinámica de crecimiento de las proyecciones centrales. El seguimiento temporal de cada Naf involucró la adquisición de 13 series de imágenes, tomadas cada 5 minutos durante 1 hora, como se mencionó anteriormente. El trazado del esqueleto completo se realizó inicialmente en la primera imagen bidimensional de la proyección axonal central al comienzo de la adquisición ( $t_0$ ). En los tiempos subsiguientes ( $t_1$  a  $t_{12}$ ), cada nueva imagen se utilizó para ajustar el esqueleto basado en la imagen previa, hasta completar todas las imágenes. Las modificaciones en las proyecciones axonales centrales se determinaron superponiendo el trazado de  $t_n$  sobre la imagen  $t_{n+1}$ , detectando movimientos de extensión y retracción de ramas, así como la formación y eliminación de nuevas ramas. **WT-veh:** Naf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 7.3. Determinación de varicosidades

Determinamos, de manera indirecta, el número de contactos sinápticos aferentes a partir de la cuantificación de varicosidades presentes en la proyección axonal central de larvas de 5 dpf (Valera et al., 2021). La identificación de las varicosidades se realizó sobre las proyecciones en Z de cada neurona, identificando los engrosamientos de la membrana

(puntos donde se acumula la proteína DsRed y, por lo tanto, tienen mayor intensidad de fluorescencia). Las adquisiciones donde no se pudo identificar correctamente dichas varicosidades fueron descartadas del análisis. Utilizando los trazos neuronales anteriormente descritos, se discriminaron las varicosidades que se encontraban sobre el axón central, el árbol axonal y la porción terminal (o *tip*) de cada rama. Los valores obtenidos fueron normalizados dividiéndolos por la longitud del trazo de referencia correspondiente.

## 8. Unidades experimentales y análisis estadístico

Para el análisis de las proyecciones axonales centrales, se registró una neurona por individuo en todos los casos. Para la evaluación morfométrica de las proyecciones centrales se utilizaron los siguientes números de neuronas:  $N_{WT-Veh} = 7$ ,  $N_{WT-TTX} = 10$ ,  $N_{KIR-Veh} = 9$  y  $N_{KIR-TTX} = 8$  neuronas. Para la evaluación de la dinámica de crecimiento de las proyecciones centrales se utilizaron los siguientes números de neuronas:  $N_{WT-Veh} = 7$ ,  $N_{WT-TTX} = 9$ ,  $N_{KIR-Veh} = 9$  y  $N_{KIR-TTX} = 8$  neuronas. Exceptuando para el parámetro extensión que presenta un outlier y se utilizó  $N_{WT-Veh} = 6$ . La determinación de varicosidades se realizó a partir de un  $N_{WT-Veh} = 7$ ,  $N_{WT-TTX} = 9$ ,  $N_{KIR-Veh} = 9$  y  $N_{KIR-TTX} = 8$  neuronas. Exceptuando para varicosidades del axón que presenta un outlier y se utilizó  $N_{WT-Veh} = 6$ .

Para los análisis estadísticos, se emplearon los programas GraphPad 8 y Spyder (Python 3.7) del paquete de distribución Anaconda3. La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilks, analizando cada tratamiento por separado si los grupos tenían  $N > 6$ , o sobre los residuos de los tratamientos en conjunto utilizando un código personalizado escrito en Python con las librerías pandas y numpy (McKinney, 2010; Walt et al., 2011) si al menos un grupo tenía un  $N \leq 6$ . Se realizaron pruebas de varianza con el test de Fisher o el test de Levene. Se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas según los resultados de la normalidad y la varianza: test de T o test de Mann-Whitney para la comparación entre 2 grupos. ANOVA de una vía con test de Tukey *post hoc*, ANOVA de una vía con corrección de Welch y test de Games-Howell *post hoc*, o test de Kruskal-Wallis con test de Dunn *post hoc* para más de 2 grupos. Para la detección de valores atípicos, utilizamos el método ROUT (Regresión y Test de Outliers. De GraphPad Prism) con la configuración predeterminada ( $Q=1\%$ ) para balancear la sensibilidad y especificidad en la detección de outliers (Motulsky & Brown, 2006). La significancia estadística se reportó en todos los casos con un nivel de confianza  $\alpha < 0,05$ .

## 9. Aproximación Experimental

Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la supresión de la AEE en NAFs únicas conduce a un desarrollo anormal de los árboles axonales que se proyectan hacia el cerebro medio. Para determinar si este fenómeno es resultado de silenciar una sola neurona rodeada de neuronas activas, examinaremos si el silenciamiento global de la AEE también afecta el desarrollo de las NAFs.

Con este fin, se procedió a silenciar la AEE exponiendo larvas de pez cebra entre los 2 (LLP inmadura) y los 5 dpf (LLP madura) (Metcalf et al., 1985; Kindt et al., 2012; McHenry et al., 2009), a tetrodotoxina (TTX), un bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje. Estos experimentos nos permitieron determinar si esta manipulación también afecta el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAFs de la LLP. La comparación de las imágenes de embriones cuya AEE fue manipulada de forma global con aquellas obtenidas mediante la manipulación a nivel de célula única arrojan luz sobre esta cuestión.

### 9.1. Manipulación global de la actividad eléctrica.

Para lograr un silenciamiento de la AEE a nivel global, se inyectó una solución de TTX 0,25 mM en el saco vitelino de larvas de 2 dpf. Este procedimiento garantiza un silenciamiento global de la AEE hasta los 5 dpf, sin interferir con el desarrollo normal del animal (Hines et al., 2015). Sin embargo, a 2 dpf una proporción de embriones todavía permanece dentro del corion. En estos casos, muy sutilmente con dos forceps, rompimos el corion sacando el embrión dentro, para evitar cualquier interferencia mecánica a la hora de la inyección de TTX.

Se analizaron las trayectorias axonales y la dinámica de crecimiento axonal de las NAFs únicas en larvas tratadas con TTX o con vehículo entre los 2 y 5 dpf.

Evaluamos el efecto del TTX el día del registro (5 dpf) mediante la observación de respuestas de evasión o escape en los animales al ser estimulados con el contacto de una varilla. Solo incluimos en el estudio a aquellos individuos que no mostraron movimiento inicial al ser tocados, descartando a los que presentaron movimiento previo a la prueba.

## 9.2. Análisis *in vivo* del crecimiento axonal y del establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs.

Se inyectaron las construcciones SILL:Gal4 (Pujol-Marti et al., 2012) y UAS:DsRed (Plazas et al., 2013) en embriones de pez cebra WT recién fecundados. Como resultado, se generaron embriones que expresan DsRed de manera estocástica en NAfs únicas, lo que permitió un análisis estructural minucioso de los árboles axonales que se proyectan hacia el cerebro medio. Embriones de 5 dpf (LLP madura), que previamente fueron tratados con TTX o vehículo, se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión y se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal para estudiar el crecimiento axonal de las NAfs hacia el cerebro medio y el desarrollo de las proyecciones axonales centrales. Se examinaron diversos parámetros, como el área de cobertura de los árboles axonales, la longitud de las ramas individuales, el número de ramas totales, primarias y secundarias de los árboles axonales, utilizando el software ImageJ con el complemento NeuronJ.

## 9.3. Estudio *in vivo* de la dinámica de crecimiento axonal.

Las larvas de 5 dpf que expresaron DsRed de manera estocástica en NAfs únicas y que han sido expuestas previamente a TTX o vehículo se montaron en agarosa al 1% para examinar el crecimiento axonal de las NAfs sobre el cerebro medio a lo largo del tiempo. Se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal cada 5 minutos durante 1 hora. Estas imágenes se analizaron con el software ImageJ para determinar varios parámetros relacionados con la dinámica del crecimiento axonal, como la tasa de formación/eliminación de ramas y la tasa de extensión/retracción de ramas.

# RESULTADOS

El objetivo general de este proyecto es revelar *in vivo* nuevos aspectos del papel que juega la AEE en el ensamblado de circuitos sensoriales durante el desarrollo del SN. Para ello, usamos como modelo la inervación aferente de la LLP del pez cebra. En particular, nuestro enfoque se centra en determinar si la AEE regula el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LLP a través de mecanismos competitivos.

Estudios preliminares realizados en el laboratorio de la Dra. Plazas, y que forman parte de la tesis doctoral de Salatino, L. (2024) revelan que la AEE cumple un rol clave en el desarrollo de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LLP. Dichos resultados muestran que la supresión de la AEE en NAfs únicas, mediante la sobreexpresión estocástica del canal de potasio hKir2.1, genera un desarrollo anómalo de los árboles axonales que proyectan al cerebro medio, provocando una disminución del área de cobertura a nivel central. Más aún, estudios *in vivo* de la dinámica de crecimiento axonal muestran que las NAfs silenciadas exhiben ramas más motiles y menos consistentes (ramas que se ven en  $t_0$  y no exhiben ningún evento de motilidad durante la hora de registro) que las NAfs WT. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de la AEE a nivel de célula única retrasa o impide la correcta maduración de los árboles axonales centrales de las NAfs.

Para determinar si el fenómeno observado es producto de silenciar una única neurona rodeada de neuronas activas, analizamos si el silenciamiento global de la AEE también afecta el desarrollo de las NAfs. Para ello, se silenció la AEE mediante la exposición de larvas de pez cebra entre los 2 (LLP inmadura) y los 5 dpf (LLP madura) (Metcalf et al., 1985; Kindt et al., 2012; McHenry et al., 2009), a tetrodotoxina (TTX), un bloqueante de los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje-dependientes. La comparación de las imágenes de embriones cuya AEE fue manipulada globalmente con los obtenidos con la manipulación a nivel de célula única nos permitió revelar dicho interrogante.

¿Cómo realizamos la manipulación global de la actividad eléctrica?

Con el fin de silenciar la AEE a nivel poblacional, se inyectó una solución de TTX 0,25 mM en el saco vitelino de larvas de 2 dpf. Este tratamiento asegura un silenciamiento global de la AEE hasta los 5 dpf, sin afectar el desarrollo normal del animal (Hines et al., 2015). Se estudiaron las trayectorias axonales y la dinámica de crecimiento axonal de NAfs únicas, de larvas que fueron tratadas con TTX entre los 2 y 5 dpf.

Para el análisis *in vivo* del establecimiento y del crecimiento axonal de las proyecciones axonales centrales de las NAfs se inyectaron las construcciones SILL:Gal4 (Pujol-Marti et al., 2012) y UAS:DsRed (Plazas et al., 2013) en embriones WT recién fecundados. Como resultado, se obtuvieron embriones que expresan estocásticamente DsRed en NAfs únicas,

permitiendo un análisis estructural detallado de los árboles axonales que proyectan al cerebro medio del pez cebra. Para estudiar el rol de la AEE, se silenciaron las NAfs únicas mediante la sobreexpresión del canal de potasio hKIR 2.1. Para ello, se expresaron estocásticamente las construcciones SILL:Gal4 y UAS:DsRed::UAS:hKIR2. Los embriones inyectados con DsRed (Fenotipo WT) o inyectados con hKIR 2.1 (Fenotipo KIR), fueron tratados con TTX o con vehículo (Control) entre los 2 y 5 dpf.

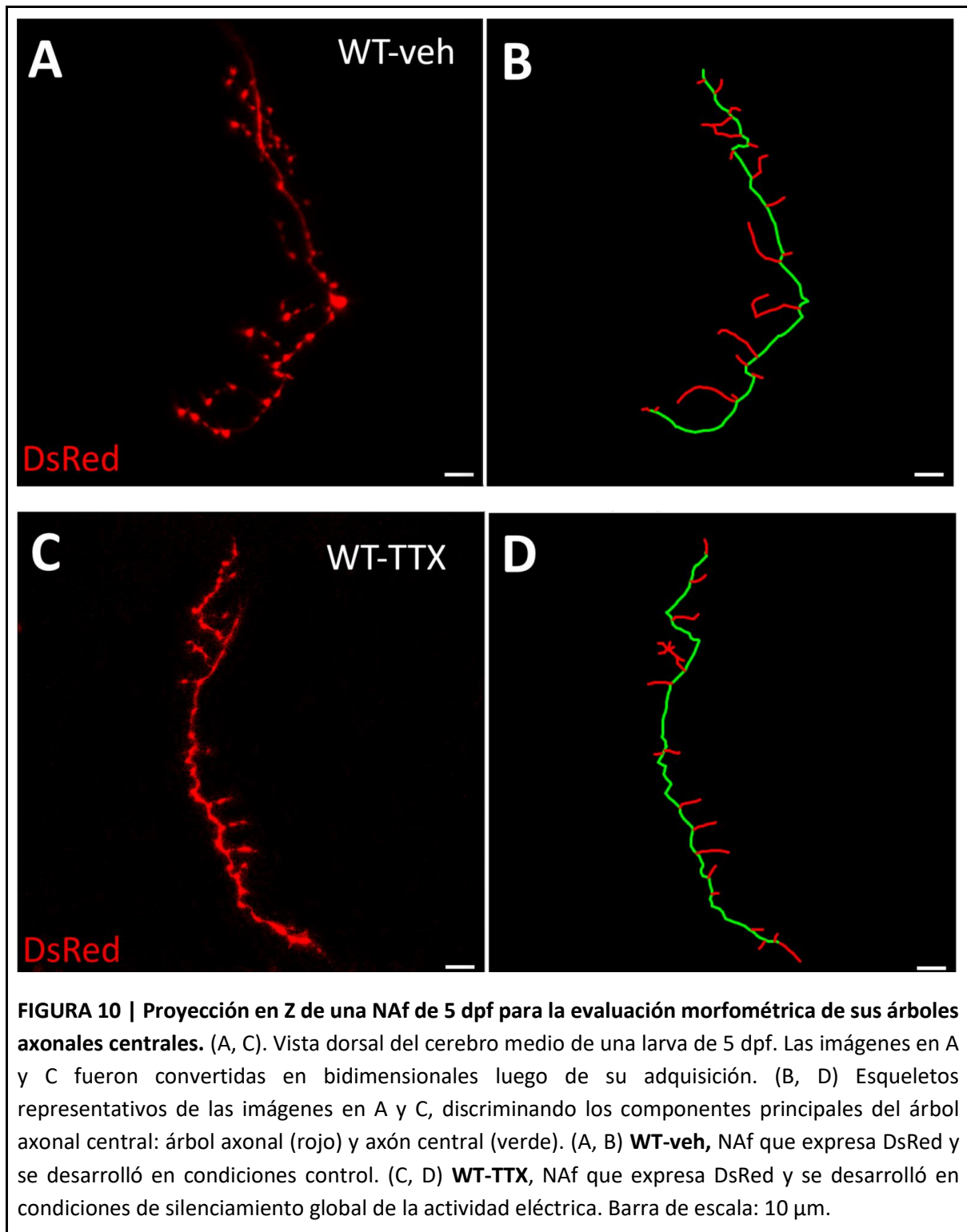
## **Parte A:** Efectos del silenciamiento global de la AEE en el establecimiento y dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.

### 1. Efecto del silenciamiento global de la AEE en el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.

Larvas de 5 dpf (LLP madura), que expresan DsRed en NAfs únicas y que fueron tratadas con TTX (WT-TTX) o vehículo (WT-Veh), se montaron en agarosa 1% de bajo punto de fusión y se tomaron imágenes en un microscopio confocal para analizar el desarrollo de las proyecciones axonales centrales. Se analizaron distintos parámetros como el área de cobertura de los árboles axonales, el número de ramas y la longitud de las ramas individuales, utilizando el software ImageJ con el complemento NeuronJ (Fig. 10).

Todos los registros sobre las NAfs fueron adquiridos en vista dorsal sobre la cabeza del pez tal como muestra la Fig. 6B. Esto nos permitió estudiar la proyección axonal central que inerva áreas superiores de procesamiento en el cerebro medio.

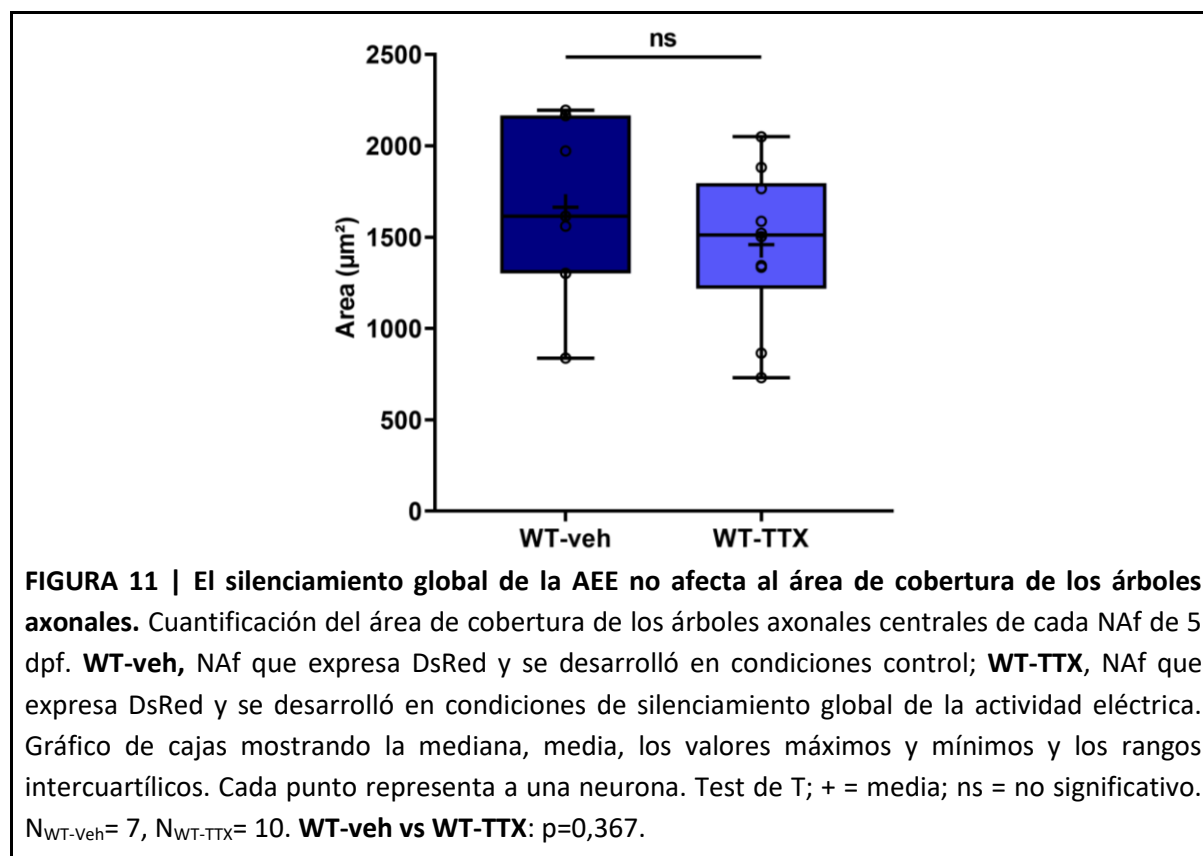
A partir de las proyecciones en Z de las imágenes adquiridas (ver “Materiales y Métodos”), se obtuvieron trazados de las proyecciones centrales de las NAfs para cada tratamiento (Fig. 10 A-B, WT-veh; C-D, WT-TTX).



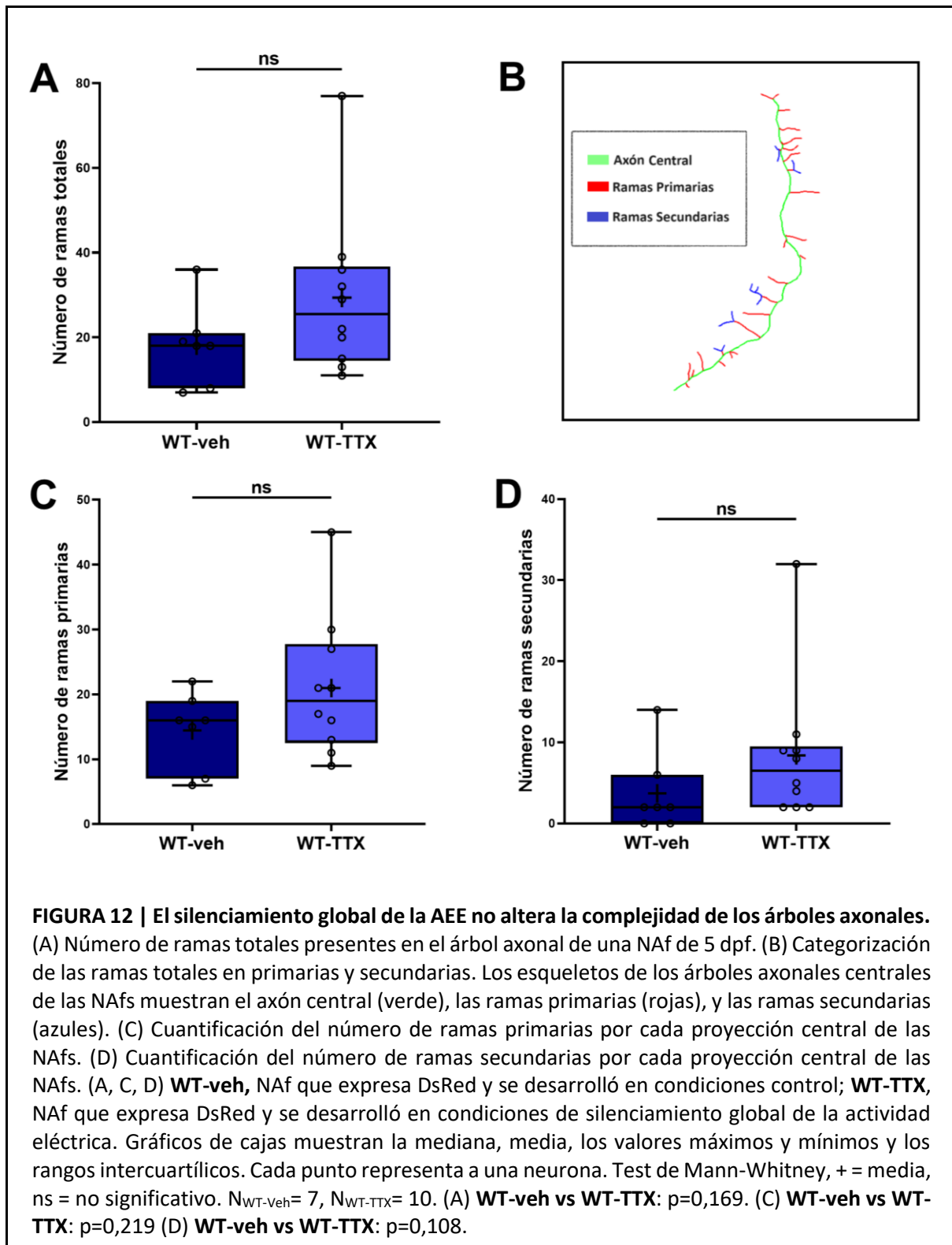
En primer lugar, observamos que para todos los tratamientos las NAFs habían desarrollado proyecciones centrales hacia el cerebro medio del pez. Es decir, que los silenciamientos a nivel individual o global no evitaron que el axón central extienda sus ramas principales.



Analizamos el área de cobertura sobre el cerebro medio y no observamos diferencias significativas entre WT-veh y WT-TTX (Fig. 11. WT-veh: 1615 (863)  $\mu\text{m}^2$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; WT-TTX: 1512 (577)  $\mu\text{m}^2$ ,  $N_{\text{WT-TTX}}=10$ . Test de T,  $p=0,367$ ).

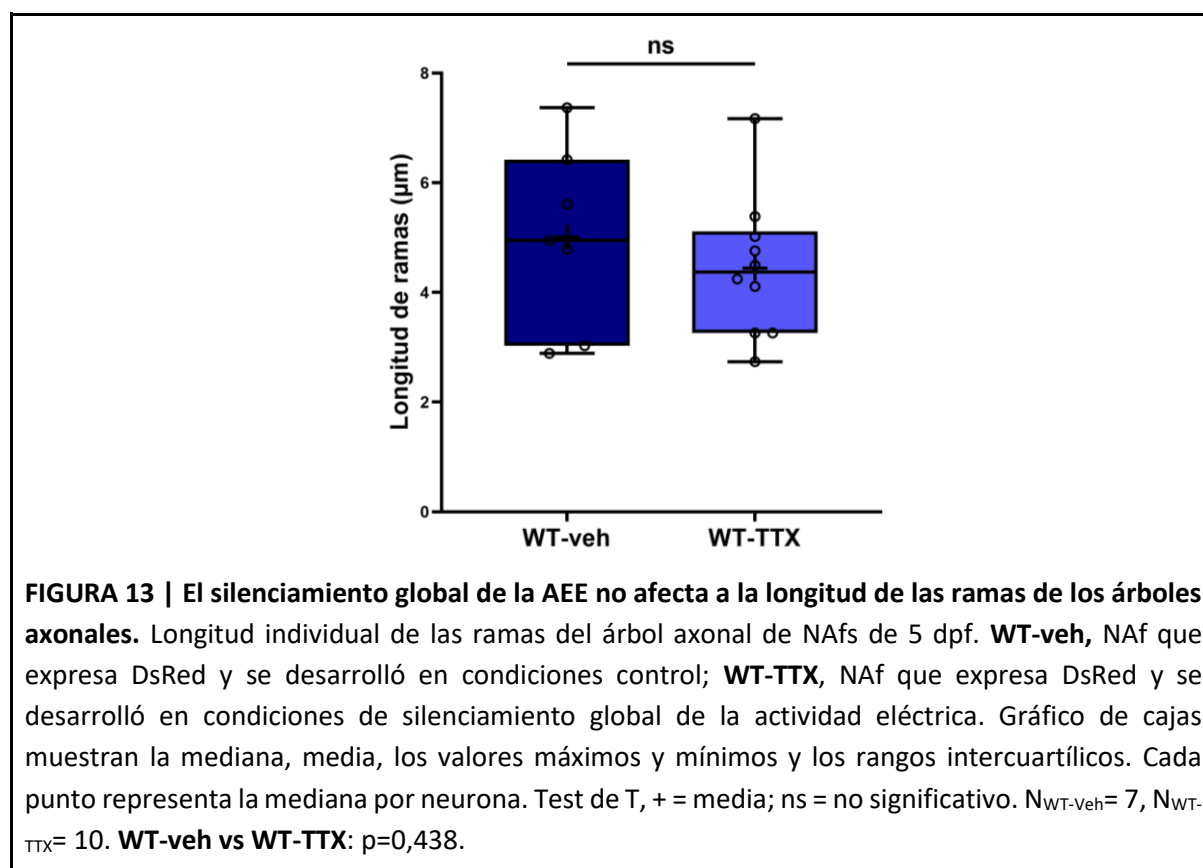


Para determinar si algún otro parámetro relacionado a la complejidad del árbol axonal se vio afectado por el silenciamiento global de la AEE, empezamos por cuantificar el número de ramas presentes en el árbol axonal. No encontramos diferencias significativas entre Nafs WT-veh y WT-TTX al analizar la cantidad de ramas totales (Fig. 12A. WT-veh: 18 (13),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; WT-TTX: 25,5 (22,25),  $N_{\text{WT-TTX}}=10$ . Test de Mann-Whitney,  $p=0,169$ ), ni en el número de ramas primarias (Fig. 12C. WT-veh: 16 (12),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; WT-TTX: 19 (15,25),  $N_{\text{WT-TTX}}=10$ . Test de Mann-Whitney,  $p=0,219$ ), ni en el número de ramas secundarias (Fig. 12D. WT-veh: 2 (6),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; WT-TTX: 6,5 (7,5),  $N_{\text{WT-TTX}}=10$ ; Test de Mann-Whitney,  $p=0,108$ ).



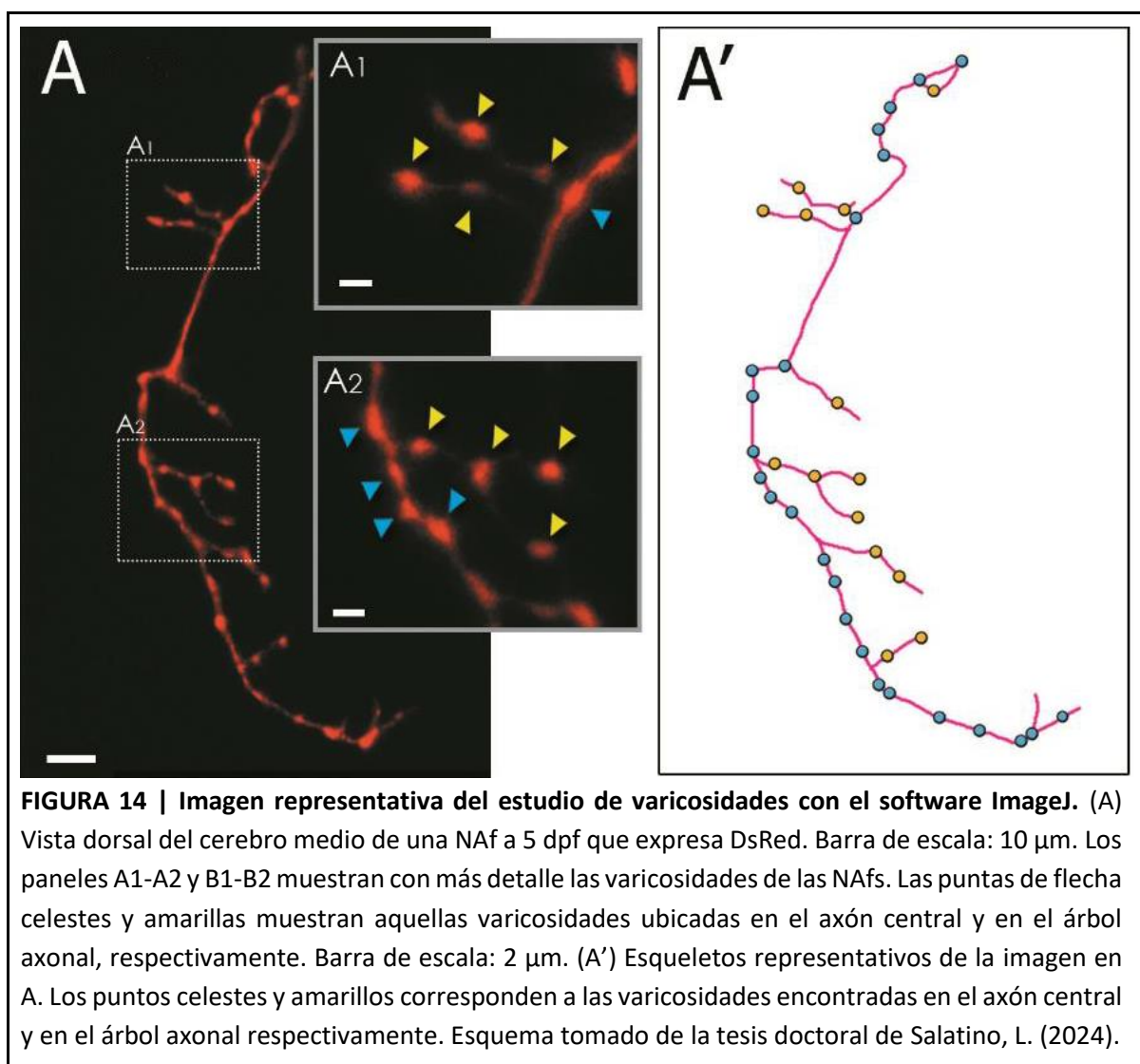
Posteriormente, realizamos mediciones de las longitudes de las ramas del árbol axonal y determinamos un valor de mediana por neurona. No observamos diferencias significativas al comparar las longitudes individuales de las ramas de las Nafs que expresan DsRed en animales cuya AEE fue silenciada globalmente con TTX (WT-TTX) respecto a su control (WT-

veh) (Fig. 13. WT-veh: 4,95 (3,39)  $\mu\text{m}$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; WT-TTX: 4,37 (1,851)  $\mu\text{m}$ ,  $N_{\text{WT-TTX}}=10$ . Test de T,  $p=0,438$ ).

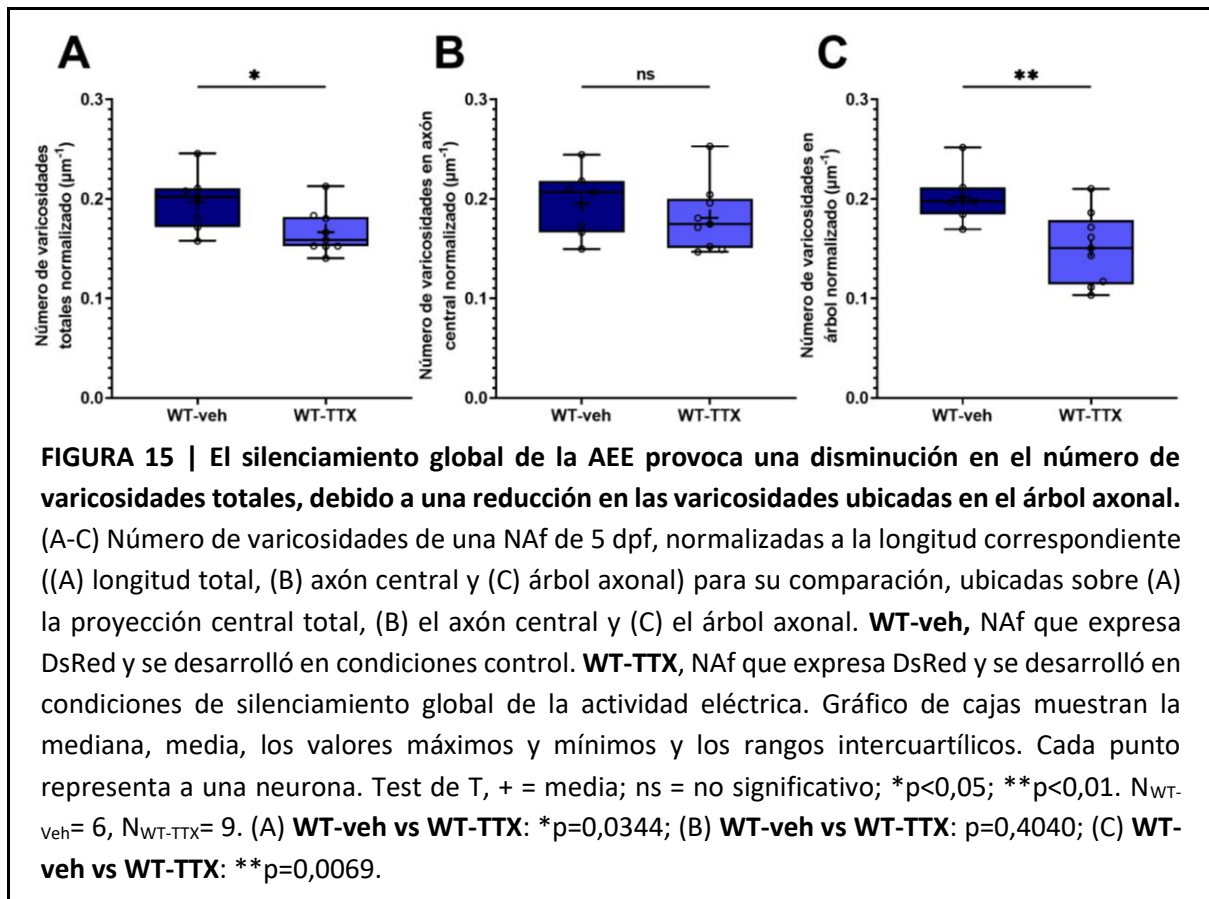


## 2. Estudio de varicosidades en NAfs silenciadas

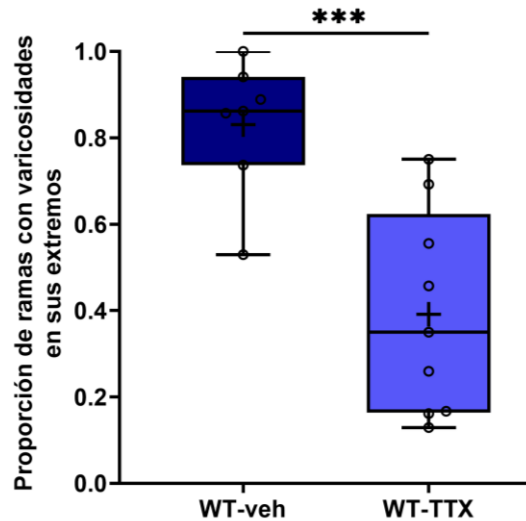
Estudios previos han documentado la presencia de varicosidades en NAfs de la LL (Valera et al., 2021) y en otros sistemas sensoriales (Meyer & Smith, 2006), las cuales se colocan con marcadores presinápticos. Definimos las varicosidades como engrosamientos visibles en la membrana de las neuronas. En los registros obtenidos mediante imágenes en *time-lapse* a 5 dpf, observamos estas varicosidades como acumulaciones de la proteína fluorescente DsRed. Para evaluar si el silenciamiento global de la AEE global afecta la aparición de estos engrosamientos, cuantificamos el número de varicosidades presentes en las proyecciones centrales de NAfs tanto silenciadas globalmente (WT-TTX) como de tipo salvaje (WT-veh), y normalizamos dicho valor a la longitud del árbol axonal. La figura 14 muestra imágenes representativas de las proyecciones centrales de NAfs WT-veh y WT-TTX en una larva de 5 dpf (Figura 14A). Utilizando los esqueletos de estas NAfs, pudimos distinguir entre las varicosidades presentes en el axón central y las que se encuentran en el árbol axonal (Fig. 14A').



Observamos una disminución en el número total de varicosidades en las proyecciones centrales de las NAfs silenciadas globalmente (WT-TTX) en comparación con las de tipo salvaje (WT-Veh) (Fig. 15A. WT-veh: 0,2019 (0,0389),  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 0,1589 (0,0293),  $N_{WT-TTX}=9$ ; Test de T,  $*p=0,0344$ ). Al examinar específicamente las varicosidades del axón central, no se encontraron diferencias significativas entre las NAfs WT-Veh y WT-TTX (Fig. 15B. WT-veh: 0,207 (0,0515),  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 0,1747 (0,0495),  $N_{WT-TTX}=9$ . Test de T,  $p=0,4040$ ). Sin embargo, detectamos una reducción en el número de varicosidades en el árbol axonal de las NAfs WT-TTX en comparación con las NAfs WT-Veh (Fig. 15C. WT-veh: 0,1976 (0,0271),  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 0,1506 (0,0647),  $N_{WT-TTX}=9$ ; Test de T,  $**p=0,0069$ ).



Estudios anteriores han mostrado una correlación entre la presencia de varicosidades en las puntas de las ramas y la estabilidad de dichas ramas (Meyer & Smith, 2006). Cuantificamos la proporción de varicosidades localizadas en los extremos de las ramas del árbol axonal y observamos una disminución de dicho parámetro en los árboles silenciados (Fig. 16. WT-veh: 0,8621 (0,2044),  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 0,35 (0,4599),  $N_{WT-TTX}=9$ ; Test de T, \*\*\*p=0,0008).



**FIGURA 16 | El silenciamiento global de la AEE provoca una disminución en la proporción de ramas axonales con presencia de varicosidades en sus extremos.** Proporción de ramas axonales que presentan varicosidades en sus extremos. ( $n^\circ$  de ramas con varicosidades en sus extremos /  $n^\circ$  total de extremos). **WT-veh**, NAf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. **WT-TTX**, NAf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. Test de T, + = media; ns = no significativo; \*\*\* $p < 0,001$ .  $N_{WT-veh} = 7$ ,  $N_{WT-TTX} = 9$ . **WT-veh vs WT-TTX:** \*\*\* $p = 0,0008$ .

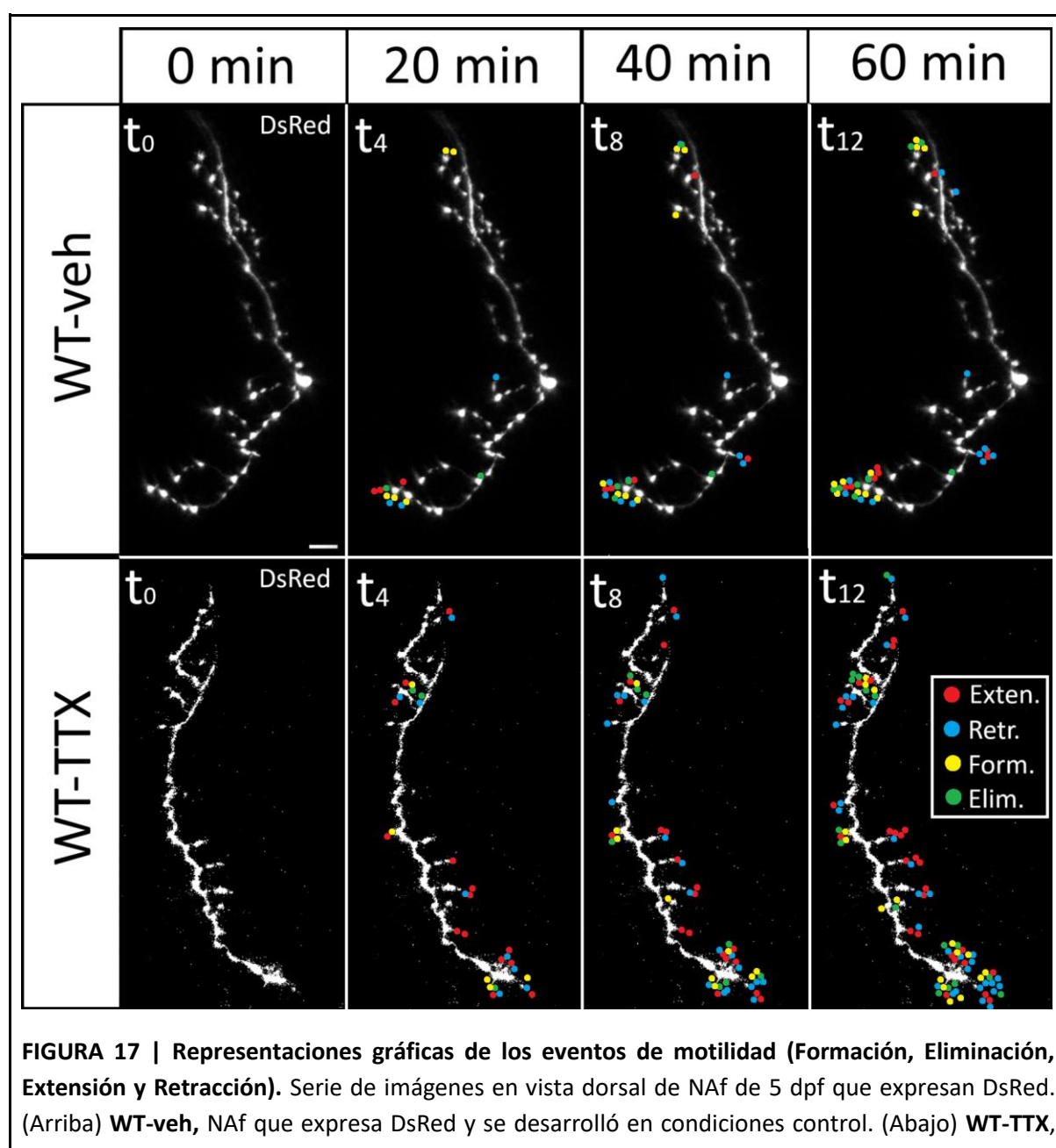
En resumen, observamos una disminución en el número de varicosidades a lo largo del árbol axonal en las NAfs silenciadas globalmente, así como una menor proporción de varicosidades en los extremos de sus ramas.

### 3. Efectos del silenciamiento global de la AEE sobre la dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.

Se analizó el crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs a lo largo del tiempo en larvas de 5 dpf que expresaron estocásticamente DsRed en NAfs únicas, y que fueron tratadas con vehículo (WT-veh) o TTX (WT-TTX) entre los 2 hasta los 5 dpf. Se tomaron imágenes con un microscopio confocal cada 5 minutos durante 1 hora, resultando en la adquisición de una serie de 13 de imágenes por NAf. Se realizaron las proyecciones en Z de las 13 imágenes adquiridas (ver “Materiales y Métodos”) para cada tratamiento, WT-veh, WT-TTX, y se obtuvieron los trazados de las proyecciones centrales de las NAfs. Las modificaciones en las proyecciones axonales centrales se determinaron superponiendo el trazado de  $t_n$  sobre la imagen  $t_{n+1}$ . Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ y se determinaron diferentes parámetros de la dinámica de crecimiento axonal.

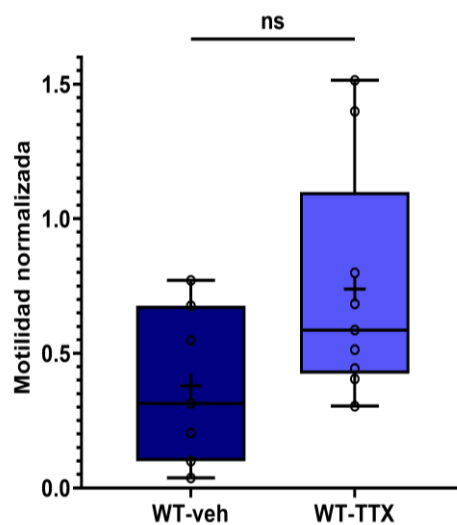
Dado que resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que las NAFs silenciadas individualmente exhiben ramas más mótils y menos consistentes (ramas que se ven en  $t_0$  y no exhiben ningún evento de motilidad durante la hora de registro) que las NAFs WT, procedimos a, en primer lugar, evaluar si el silenciamiento global de la AEE afecta la motilidad de los árboles axonales de las NAFs. Para eso, se detectaron eventos de extensión, retracción, formación y eliminación de ramas (Fig. 17).

Con esos parámetros se procedió a calcular la motilidad total del árbol axonal. Esta se calculó como la suma de las distancias recorridas por la punta de cada rama. Debido a la gran variabilidad en las longitudes de las proyecciones analizadas, normalizamos cada valor por la longitud del árbol axonal en  $t_0$ , obteniendo así el parámetro “Motilidad normalizada”.



NAf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica.  $t_0$ ,  $t_4$ ,  $t_8$  y  $t_{12}$  corresponden a tiempos representativos del registro: 0, 20, 40 y 60 minutos, respectivamente. Los puntos coloreados representan eventos individuales de motilidad: extensión (rojo), retracción (celeste), formación (amarillo) y eliminación (verde). Los eventos detectados se marcaron individualmente en cada foto y se presentan solapados a medida que pasa el tiempo. Aquellas ramas donde no se encontraron eventos de motilidad durante toda la hora de registro, permanecen sin puntos. A  $t_{12}$  se visualizan todos los eventos a lo largo del registro. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

No observamos diferencias significativas en la motilidad normalizada de las NAFs que expresan DsRed en animales cuya AEE fue silenciada globalmente con TTX (WT-TTX) respecto a su control (WT-veh) (Fig. 18. WT-veh: 0,314 (0,578),  $N_{WT-veh}$  = 7; WT-TTX: 0,587 (0,674),  $N_{WT-TTX}$  = 9. Test de T,  $p=0,08$ ).



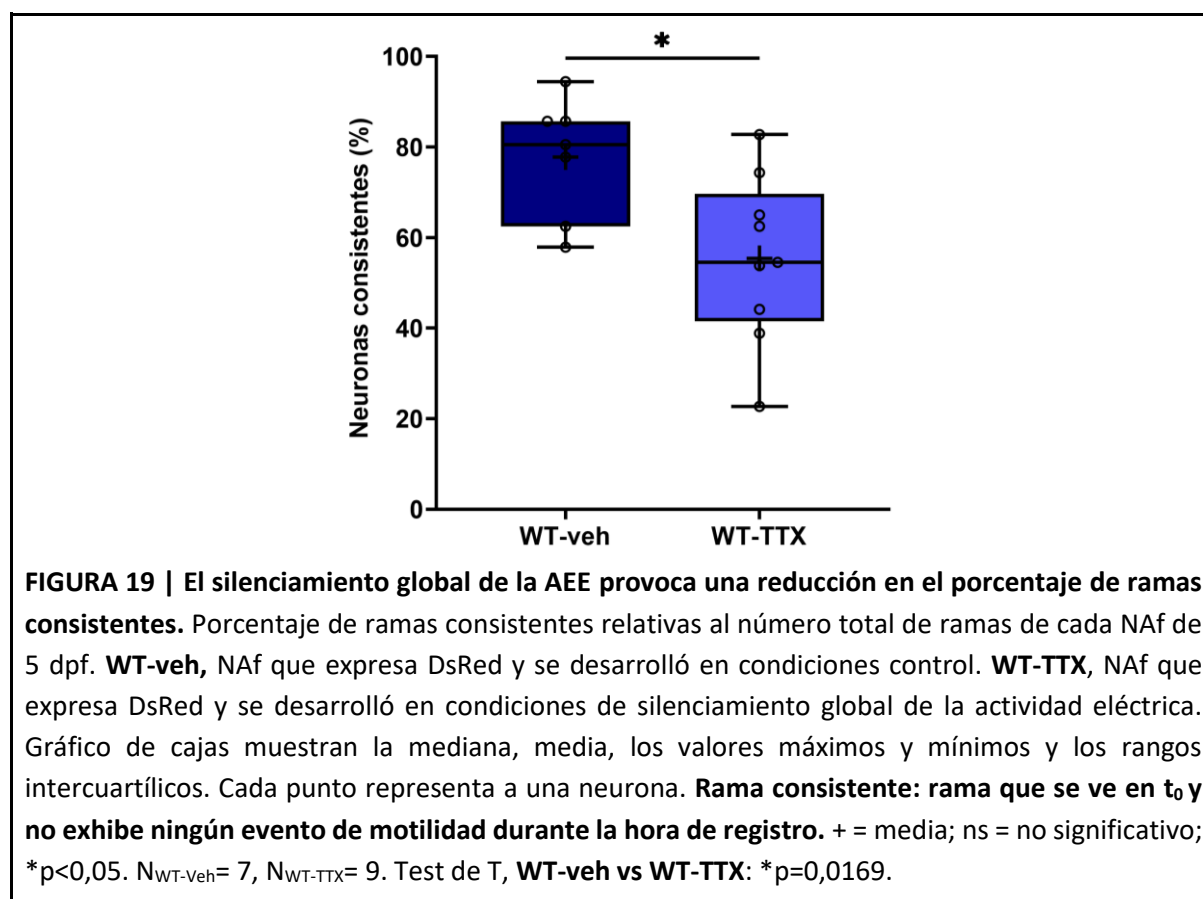
**FIGURA 18 | El silenciamiento global de la AEE no afecta a la motilidad de los árboles axonales.** Motilidad normalizada a la longitud inicial del árbol axonal de cada NAF de 5 dpf. **WT-veh**, NAF que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control; **WT-TTX**, NAF que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. Test de T, + = media; ns = no significativo.  $N_{WT-veh}$  = 7,  $N_{WT-TTX}$  = 9. **WT-veh vs WT-TTX:  $p=0,08$ .**

Para evaluar más en detalle la motilidad de los árboles axonales, utilizamos el siguiente parámetro: Porcentaje de ramas consistentes. Definimos como rama consistente a aquella rama que se ve en  $t_0$  y no exhibe ningún evento de motilidad durante la hora de registro.

Observamos una disminución en el porcentaje de ramas consistentes en las NAFs que expresan DsRed de animales cuya AEE fue silenciada globalmente con TTX (WT-TTX)



respecto a su control (WT-veh) (Fig. 19. WT-veh: 80,56 (23,21) %,  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 54,55 (28,16) %,  $N_{WT-TTX}=9$ . Test de T,  $*p=0,0169$ ).

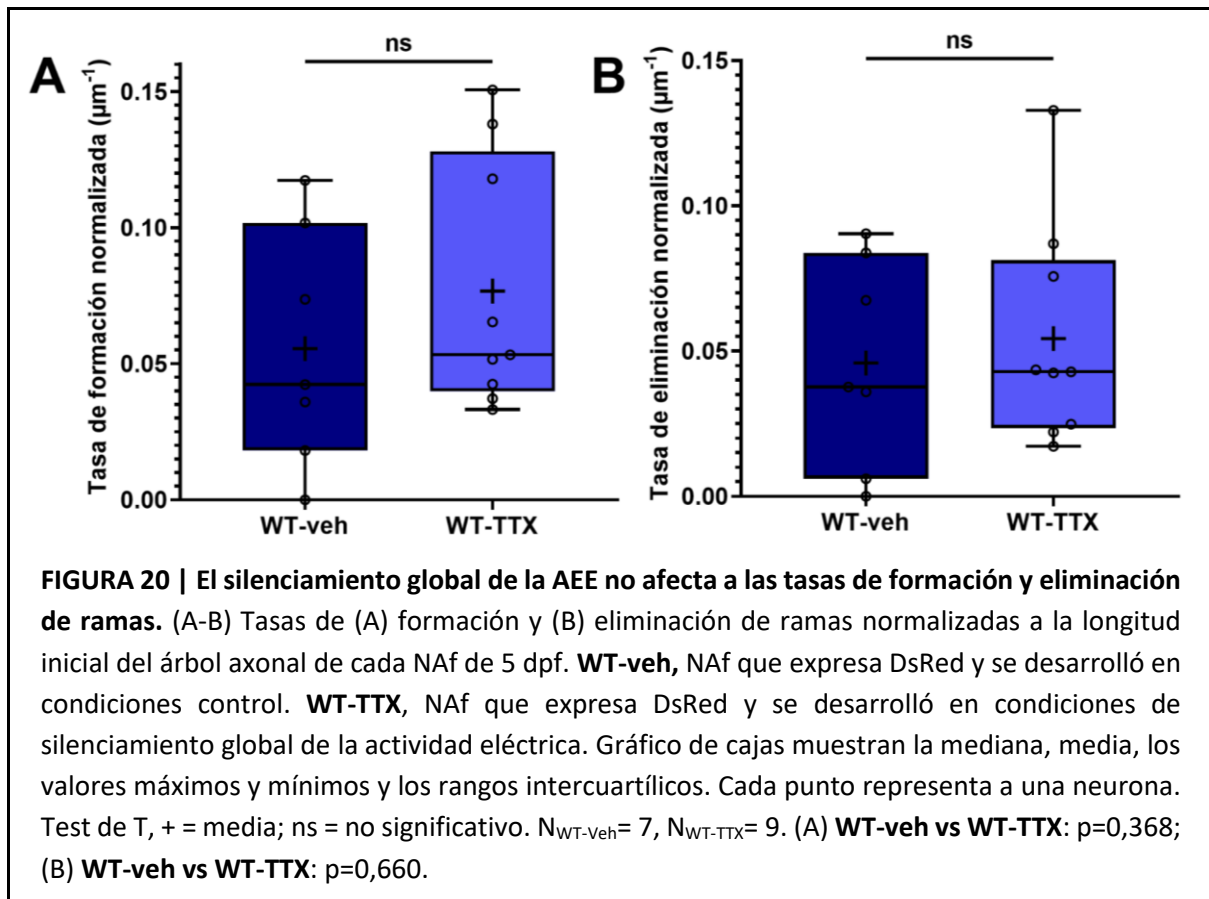


### Análisis de eventos de motilidad

Para observar y analizar en mayor detalle el efecto del silenciamiento global de la AEE en las NAFs sobre la dinámica de crecimiento de los árboles axonales centrales, analizamos por un lado los eventos de formación y eliminación de ramas, y por otro los de extensión y retracción de las mismas.

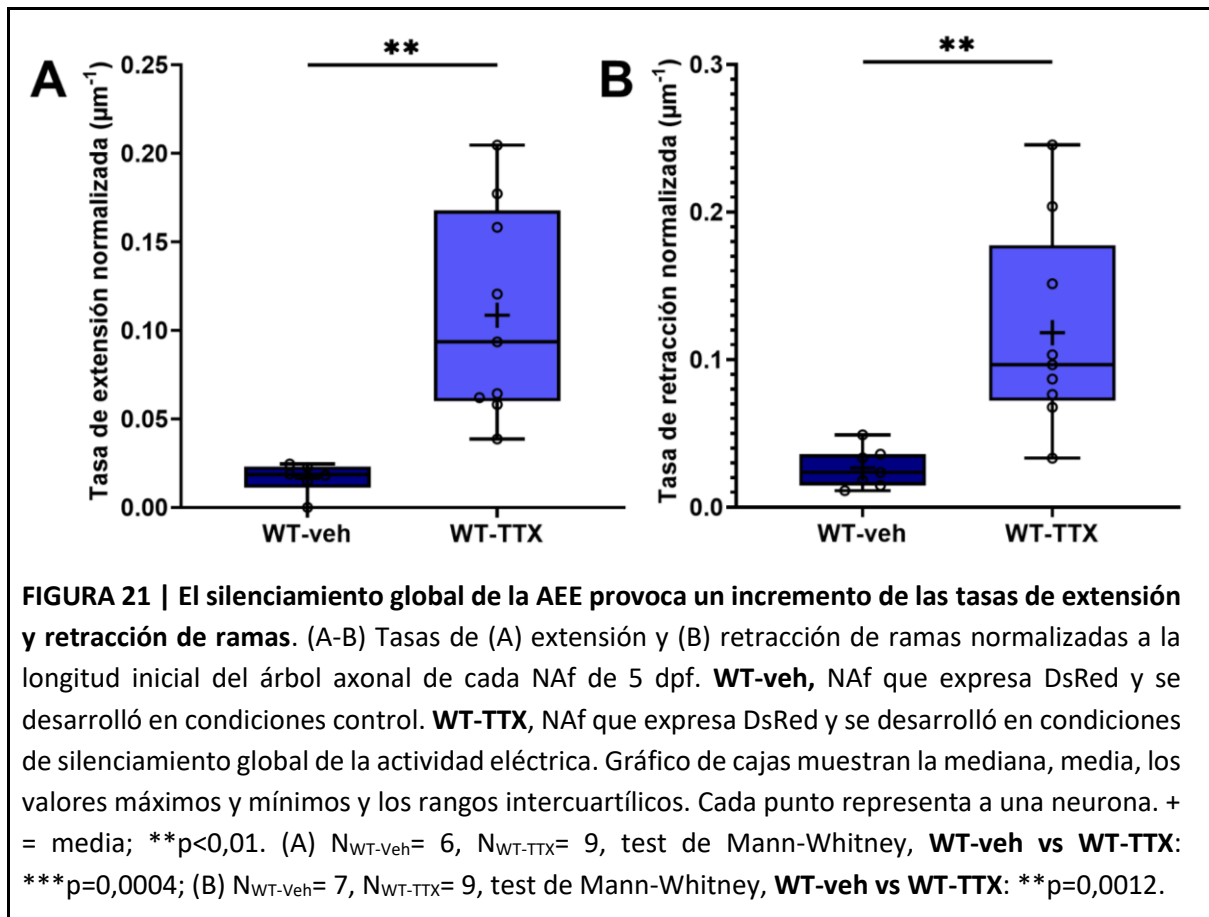
### **Eventos de formación y eliminación**

Para analizar los eventos de formación y eliminación, calculamos las tasas de dichos eventos y las normalizamos a la longitud inicial del árbol axonal. No observamos diferencias significativas en las tasas de formación ni de eliminación en las NAFs silenciadas globalmente con TTX (WT-TTX) respecto a su control (WT-veh) (Fig. 20A. Formación ( $\mu m^{-1}$ ). WT-veh: 0,0424 (0,0836)  $\mu m^{-1}$ ,  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 0,05327 (0,08814)  $\mu m^{-1}$ ,  $N_{WT-TTX}=9$ . Test de T,  $p=0,368$ . Fig. 20B. Eliminación ( $\mu m^{-1}$ ). WT-veh: 0,0376 (0,0778)  $\mu m^{-1}$ ,  $N_{WT-veh}=7$ ; WT-TTX: 0,0429 (0,0579)  $\mu m^{-1}$ ,  $N_{WT-TTX}=9$ . Test de T,  $p=0,660$ ).



### Eventos de extensión y retracción

Para analizar los eventos de extensión y retracción, calculamos las tasas de dichos eventos y las normalizamos a la longitud inicial del árbol axonal. Observamos un aumento de ambas tasas en las Naf que expresan DsRed de animales cuya AEE fue silenciada globalmente con TTX (WT-TTX) respecto a su control (WT-veh) (Fig. 21A. Extensión ( $\mu\text{m}^{-1}$ ). WT-veh:  $0,0185 (0,0120) \mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-veh}} = 6$ ; WT-TTX:  $0,0935 (0,108) \mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-TTX}} = 9$ . Test de Mann-Whitney, \*\*\* $p=0,0004$ . Fig. 21B. Retracción ( $\mu\text{m}^{-1}$ ). WT-veh:  $0,0235 (0,0212) \mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-veh}} = 7$ ; WT-TTX:  $0,0965 (0,105) \mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-TTX}} = 9$ . Test de Mann-Whitney, \*\* $p=0,0012$ ).



En resumen, nuestros resultados muestran que la supresión global de la AEE afecta los fenómenos de extensión y retracción de ramas, como así también la formación de varicosidades. Esto sugiere que la AEE regula dichos fenómenos independientemente de la presencia de actividad eléctrica en las neuronas vecinas.

## **Parte B:** Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos que regulan el establecimiento y dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAFs de la LL.

Para comprender mejor qué fenómenos observados son producto de silenciar una única neurona rodeada de neuronas activas, analizamos la capacidad del silenciamiento global de “rescatar” los fenotipos observados en NAFs silenciadas a nivel de célula única.

Para evaluar el fenotipo WT, se inyectaron las construcciones SILL:Gal4 (Pujol-Marti et al., 2012) y UAS:DsRed (Plazas et al., 2013) en embriones WT recién fecundados, tal como se detalló en la sección anterior. Estos embriones fueron tratados con vehículo (WT-veh) a los 2 dpf en el saco vitelino. Por otro lado, se silenciaron las NAFs únicas mediante la sobreexpresión del canal de potasio hKIR 2.1. Para ello, se expresaron estocásticamente las construcciones SILL:Gal4 y UAS:DsRed::UAS:hKIR2. Estos embriones inyectados con hKIR 2.1, también fueron tratados con TTX (KIR-TTX) o vehículo (KIR-veh) a los 2 dpf en el saco vitelino.

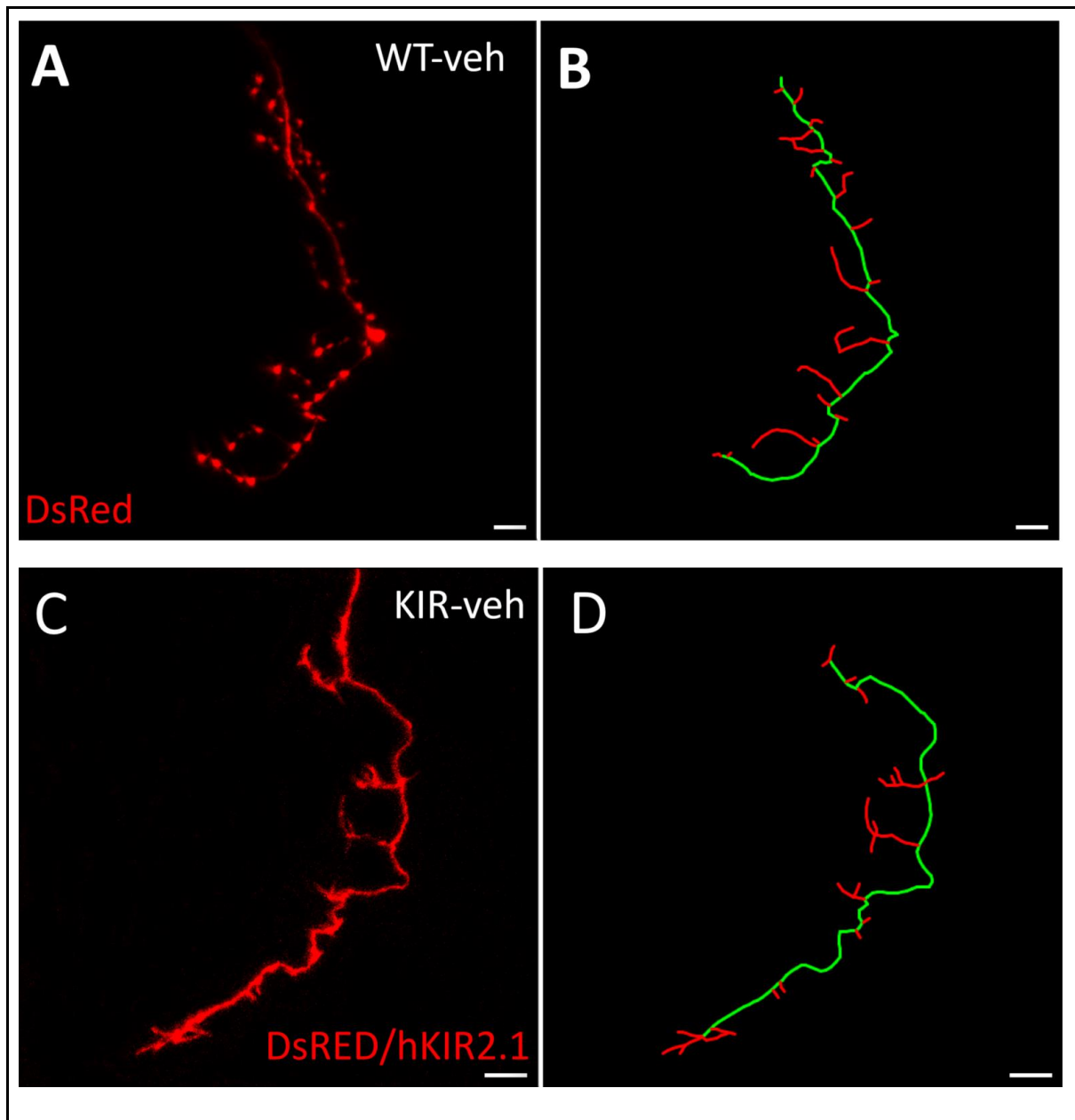
La comparación de las imágenes de embriones cuya AEE fue manipulada globalmente con los manipulados a nivel de célula única revelará cuáles fenómenos actividad dependiente son:

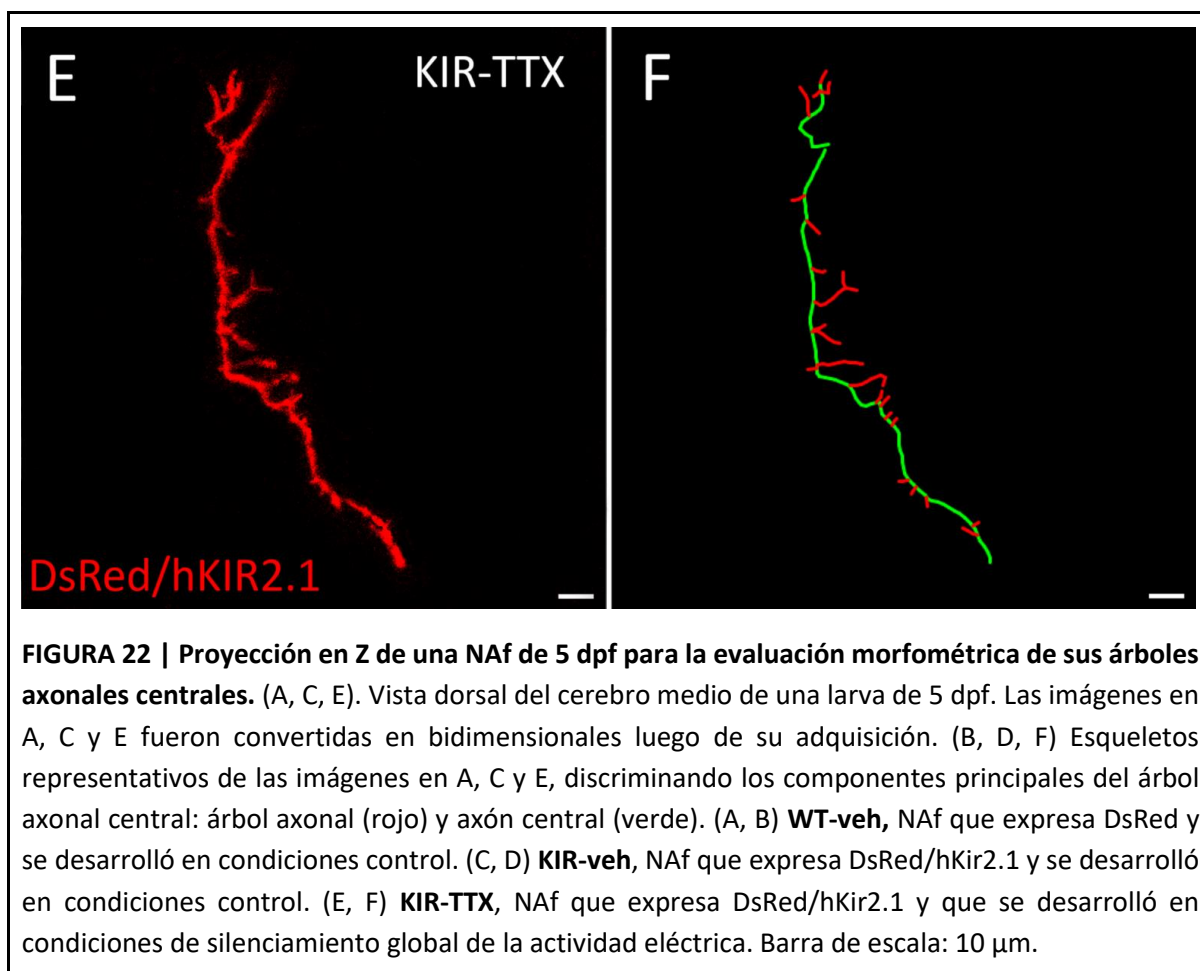
1. Competitivos: Cuando los efectos observados a causa del silenciamiento de la AEE a nivel de célula única, luego, son rescatados por el silenciamiento global de la AEE.
2. No competitivos: Cuando los efectos observados a causa del silenciamiento de la AEE a nivel de célula único, luego, no son rescatados por el silenciamiento global de la AEE.

## 1. Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos que regulan el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAFs de la LL.

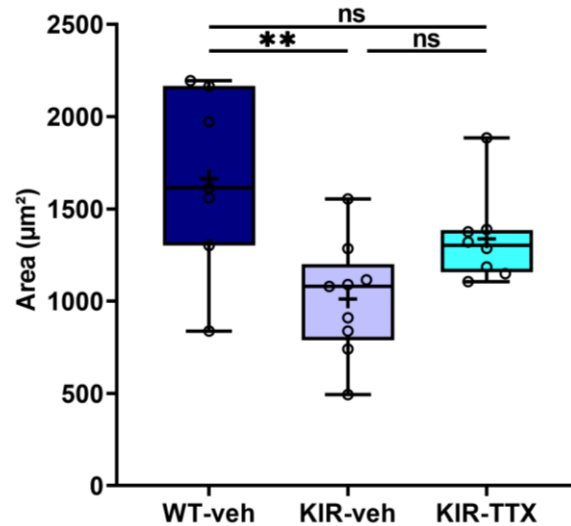
Primero, observamos que, en todos los tratamientos, las NAFs habían desarrollado proyecciones centrales hacia el cerebro medio del pez. Por lo que, ningún tipo de silenciamiento (global o único) o combinación de silenciamiento evitó que el axón central extienda sus ramas principales.

A partir de las proyecciones en Z de las imágenes adquiridas (ver “Materiales y Métodos”), se obtuvieron trazados de las proyecciones centrales de las NAFs para cada tratamiento (Fig. 22 A-B, WT-veh; C-D, KIR-veh; E-F, KIR-TTX).



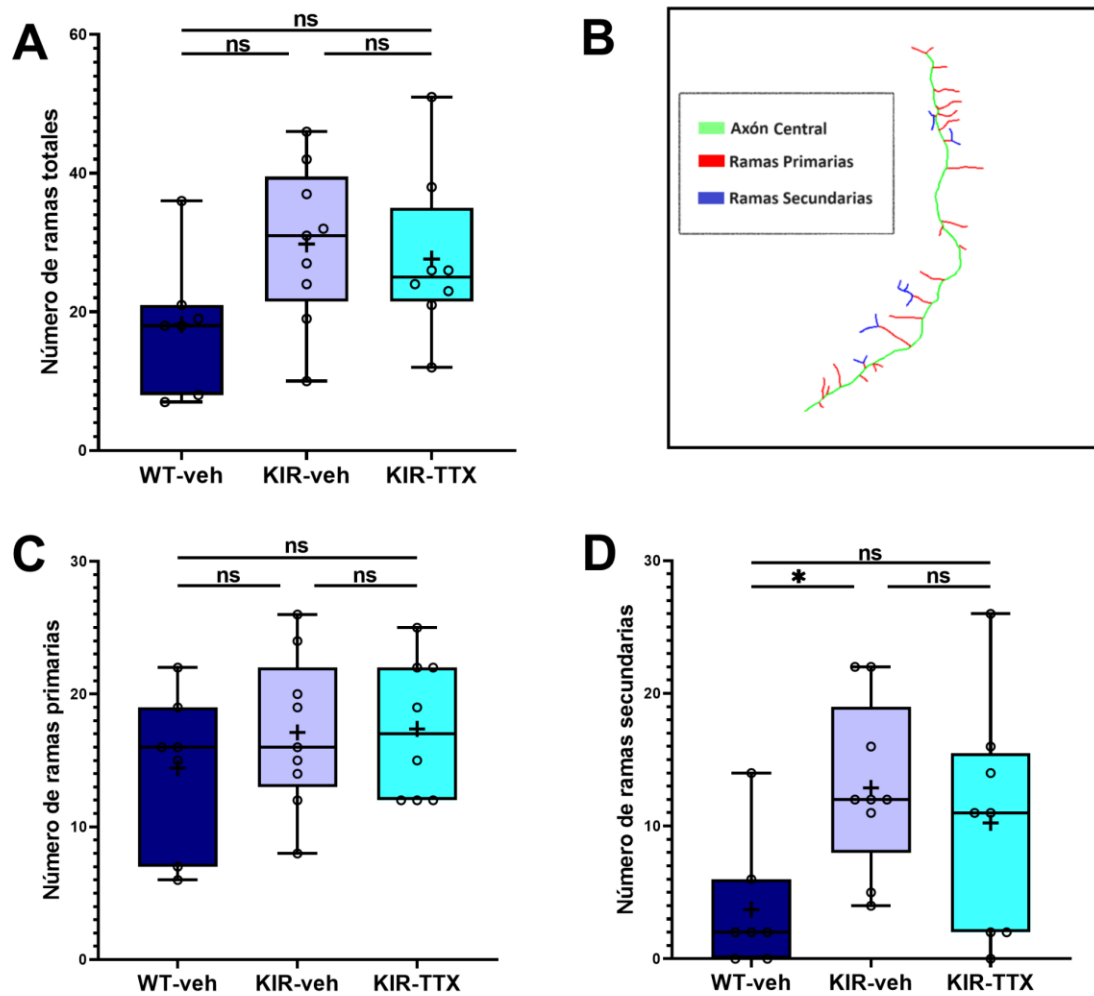


Analizamos el área de cobertura del árbol axonal central sobre el cerebro medio. En concordancia con nuestros resultados preliminares, observamos diferencias significativas al comparar las NAfs WT-veh y KIR-veh. La figura 23 muestra que los árboles axonales de las NAfs KIR-veh presentan una reducción en el área de cobertura respecto a las NAfs WT-veh, mientras que el área de inervación de las NAfs KIR-TTX no presentaron diferencias significativas al compararlas con las NAfs WT-veh o las NAfs KIR-veh (Fig. 23. WT-veh: 1615 (863)  $\mu\text{m}^2$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 1080 (410,9)  $\mu\text{m}^2$ ,  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 1303 (227)  $\mu\text{m}^2$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . ANOVA de una vía,  $**p=0,0057$ . Test de Tukey *post hoc*).



**FIGURA 23 | El silenciamiento global de la AEE rescata parcialmente la reducción del área de cobertura producida por el silenciamiento de la AEE en NAfs únicas.** Cuantificación del área de cobertura de los árboles axonales centrales de cada NAf de 5 dpf. **WT-veh**, NAf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. **KIR-veh**, NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control. **KIR-TTX**, NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y que se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas mostrando la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. + = media; ns = no significativo.  $N_{WT-veh}=7$ ;  $N_{KIR-veh}=9$ ,  $N_{KIR-TTX}=8$ . ANOVA de una vía,  $**p=0,0057$ . Test de Tukey *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**:  $**p=0,0041$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,2008$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,1679$ .

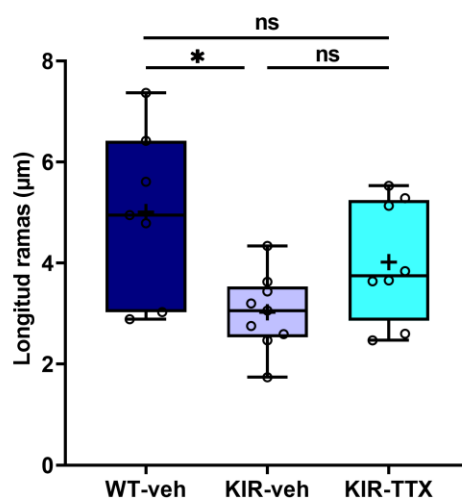
Esta reducción en el área de cobertura sugiere que el silenciamiento único afecta a la complejidad del árbol, la que depende de dos factores: la cantidad de ramas que protruyen del axón central, y la longitud individual de cada una de ellas. Para determinar cuál de estos parámetros fue afectado por el silenciamiento único, empezamos por cuantificar el número de ramas presentes en el árbol axonal. No encontramos diferencias significativas en la cantidad de ramas totales al comparar las NAfs WT-veh, KIR-veh y KIR-TTX (Fig. 24A. WT-veh: 18 (13),  $N_{WT-veh}=7$ ; KIR-veh: 31 (18),  $N_{KIR-veh}=9$ ; KIR-TTX: 25 (13,5),  $N_{KIR-TTX}=8$ . Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,0525$ . Test de Dunn *post hoc*). Tampoco observamos diferencias en el número de ramas primarias (Fig. 24C. WT-veh: 16 (12),  $N_{WT-veh}=7$ ; KIR-veh: 16 (9),  $N_{KIR-veh}=9$ ; KIR-TTX: 17 (10),  $N_{KIR-TTX}=8$ . Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,729$ . Test de Dunn *post hoc*), pero si en el número de ramas secundarias. La figura 24D muestra que, las NAfs KIR-veh presentaron mayor cantidad de ramas secundarias que las NAfs WT-veh, mientras que las NAfs KIR-TTX no presentaron diferencias significativas al compararlas con las NAfs WT-veh o las NAfs KIR-veh (Fig. 24D. WT-veh: 2 (6),  $N_{WT-veh}=7$ ; KIR-veh: 12 (11),  $N_{KIR-veh}=9$ ; KIR-TTX: 11 (13,5),  $N_{KIR-TTX}=8$ . Test de Kruskal-Wallis,  $*p=0,0442$ . Test de Dunn *post hoc*).



**FIGURA 24 | El silenciamiento de la AEE en NAfs únicas provoca un aumento en el número de ramas secundarias. Sin embargo, el silenciamiento global de la AEE rescata parcialmente el efecto producido por el silenciamiento a nivel de NAfs únicas.** (A) Número de ramas totales presentes en el árbol axonal de una NAf de 5 dpf. (B) Categorización de las ramificaciones totales en primarias y secundarias sobre los esqueletos de las proyecciones centrales de las NAfs, mostrando el axón central (verde), del mismo se extienden las ramas primarias (rojas), y las ramas secundarias como bifurcaciones subsiguientes extendiéndose desde las primarias (azul). (C) Cuantificación del número de ramas primarias por cada proyección central de las NAfs. (D) Cuantificación del número de ramas secundarias por cada proyección central de las NAfs. (A, C, D). **WT-veh**, NAf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. **KIR-veh**, NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control. **KIR-TTX**, NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráficos de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. + = media; ns = no significativo; \*p<0,05.  $N_{WT-veh}=7$ ,  $N_{KIR-veh}=9$ ,  $N_{KIR-TTX}=8$ . (A) Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,0525$ . Test de Dunn *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**:  $p=0,0591$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,1966$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p>0,999$ . (C) Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,729$ . Test de Dunn *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**:  $p>0,999$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**:  $p>0,999$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p>0,999$ . (D) Test de Kruskal-Wallis, \* $p=0,0442$ . Test de Dunn *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**: \* $p=0,0382$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,3860$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p>0,9999$ .



Luego analizamos las longitudes de las ramas individuales del árbol axonal. Para ello, determinamos un valor de mediana por neurona. En concordancia a nuestros resultados preliminares, vimos que los árboles axonales de las NAFs silenciados a nivel de célula única KIR-veh presentaron ramas más cortas que las NAFs WT-veh, mientras que las NAFs KIR-TTX no presentaron diferencias significativas al compararlas con las NAFs WT-veh o las NAFs KIR-veh (Fig. 25. Longitud de ramas ( $\mu\text{m}$ ). WT-veh: 4,95 (3,39)  $\mu\text{m}$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 3,06 (1,00)  $\mu\text{m}$ ,  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 3,75 (2,38)  $\mu\text{m}$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . ANOVA de una vía,  $*p=0,0136$ . Test de Tukey *post hoc*).

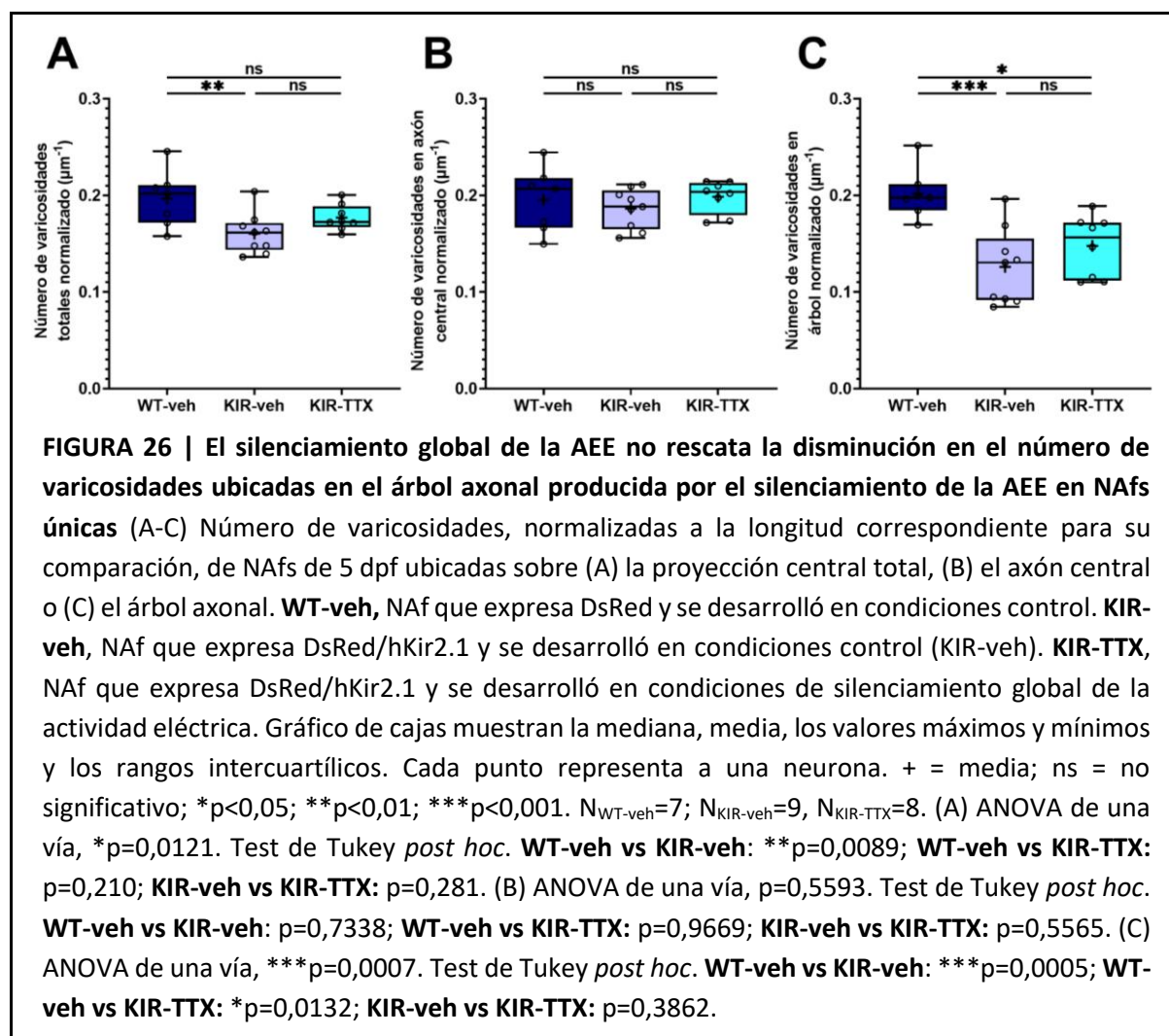


**FIGURA 25 | El silenciamiento de la AEE en NAFs únicas provoca una disminución en la longitud individual de sus ramas. Sin embargo, el silenciamiento global de la AEE rescata parcialmente el efecto producido por el silenciamiento de NAFs únicas.** Longitud individual de las ramas del árbol axonal central de una NAF de 5 dpf. **WT-veh**, NAF que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. **KIR-veh**, NAF que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control. **KIR-TTX**, NAF que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa la mediana por neurona. + = media; ns = no significativo;  $*p<0,05$ .  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ;  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . ANOVA de una vía,  $*p=0,0136$ . Test de Tukey *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**:  $*p=0,0102$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,2763$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,2325$ .

## 2. Estudio de varicosidades en NAFs silenciadas

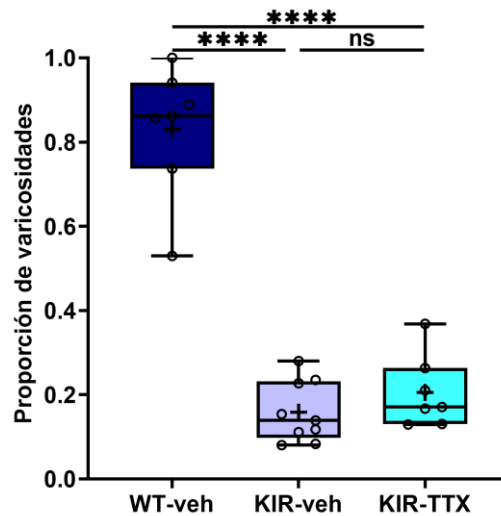
Observamos que las proyecciones centrales de las NAFs silenciadas a nivel de célula única (KIR-veh) presentaron una disminución en el número total de varicosidades respecto a NAFs WT-veh (Fig. 26A. WT-veh: 0,2019 (0,0389),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 0,1616 (0,0279),  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ;

KIR-TTX: 0,1727 (0,0213),  $N_{\text{KIR-TTX}} = 8$ . ANOVA de una vía,  $*p=0,0121$ . Test de Tukey *post hoc*). Al examinar específicamente las varicosidades del axón central, no encontramos diferencias significativas entre ningún tratamiento (Fig. 26B. WT-veh: 0,207 (0,0515),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 0,1884 (0,0401),  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 0,2034 (0,0334),  $N_{\text{KIR-TTX}} = 8$ . ANOVA de una vía,  $p=0,5593$ . Test de Tukey *post hoc*). Sin embargo, detectamos una reducción en el número de varicosidades en los árboles axonales de las NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) al compararlas con las NAfs WT-veh. De manera similar, las NAfs KIR-TTX exhibieron un menor número de varicosidades en sus árboles axonales respecto a las NAfs WT-veh (Fig. 26C. WT-veh: 0,1976 (0,0271),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 0,1305 (0,06385),  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 0,1566 (0,0601),  $N_{\text{KIR-TTX}} = 8$ . ANOVA de una vía,  $***p=0,0007$ . Test de Tukey *post hoc*).



Cuantificamos la proporción de varicosidades localizadas en los extremos de las ramas del árbol axonal y detectamos que tanto las NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) como las NAfs KIR-TTX presentaron una menor proporción de varicosidades en las puntas

de sus ramas, respecto a las NAfs WT-veh (Fig. 27. WT-veh: 0,8621 (0,2044),  $N_{WT-veh}=7$ ; KIR-veh: 0,1389 (0,13408),  $N_{KIR-veh}=9$ ; KIR-TTX: 0,1707 (0,1328),  $N_{KIR-TTX}=7$ . ANOVA de una vía, \*\*\*\* $p<0,0001$ . Test de Tukey *post hoc*).

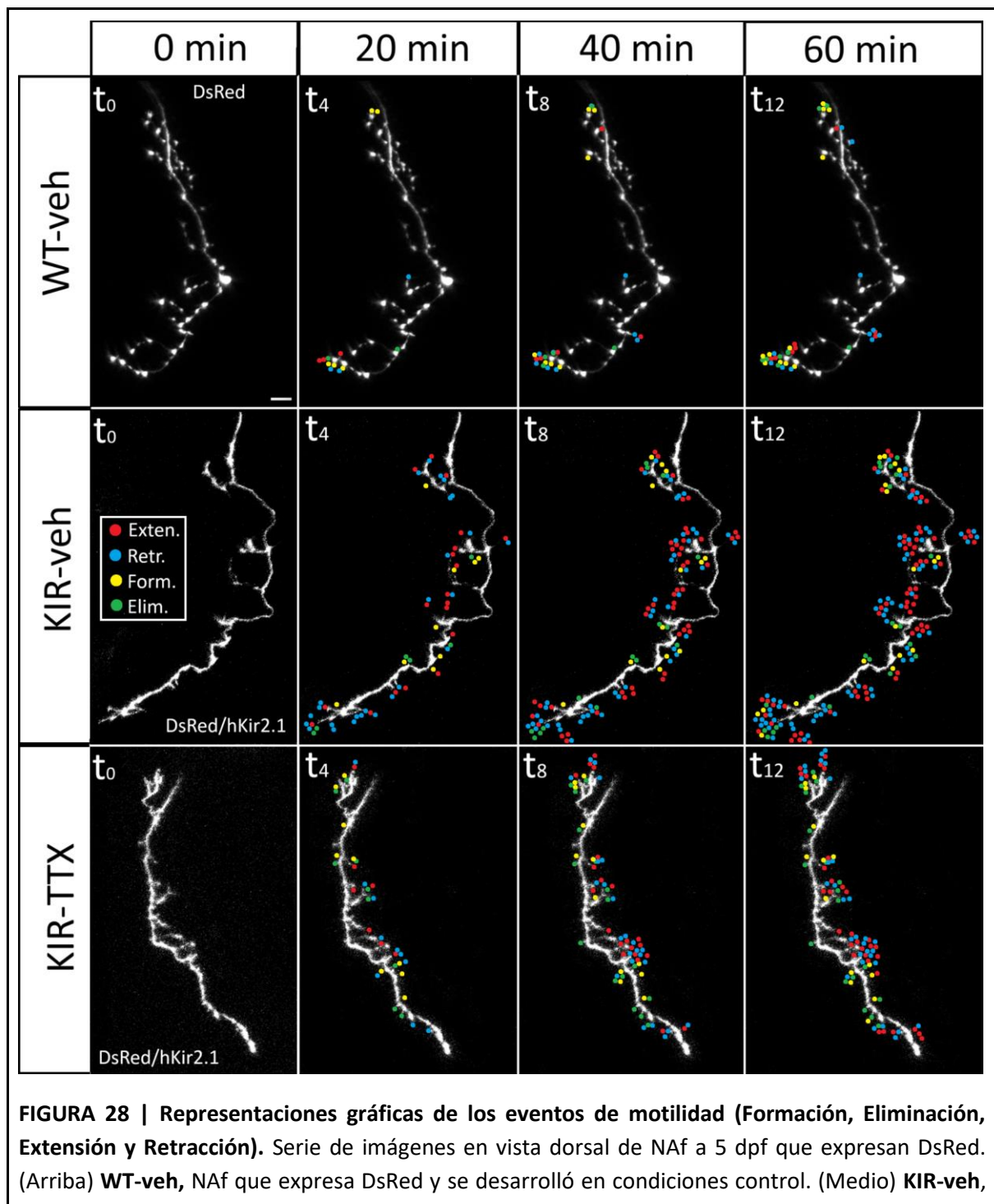


**FIGURA 27 | El silenciamiento global de la AEE no rescata la disminución en la proporción de ramas axonales con presencia de varicosidades en sus extremos producida por el silenciamiento de la AEE en NAfs únicas.** Proporción de varicosidades ubicadas sobre los extremos de las ramas de los árboles axonales de NAfs de 5 dpf ( $n^\circ$  de varicosidades /  $n^\circ$  total de extremos). **WT-veh**, NAf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. **KIR-veh**, NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control (KIR-veh). **KIR-TTX**, NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. + = media; ns = no significativo; \*\*\*\* $p<0,0001$ .  $N_{WT-veh}=7$ ;  $N_{KIR-veh}=9$ ,  $N_{KIR-TTX}=7$ . ANOVA de una vía, \*\*\*\* $p<0,0001$ . Test de Tukey *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**: \*\*\*\* $p<0,0001$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**: \*\*\*\* $p<0,0001$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,667$ .

En resumen, observamos una disminución en el número de varicosidades a lo largo del árbol axonal en las NAfs silenciadas a nivel célula única. Dicho fenotipo no fue rescatado por el silenciamiento global, ya que, las NAfs silenciadas a nivel célula única y globalmente en simultáneo (KIR-TTX) también presentaron menor número de varicosidades a lo largo de sus árboles axonales. El mismo fenómeno se observó en la proporción de varicosidades en los extremos de las ramas. Estos resultados nos sugieren que el establecimiento de las varicosidades es un fenómeno actividad-dependiente no competitivo.

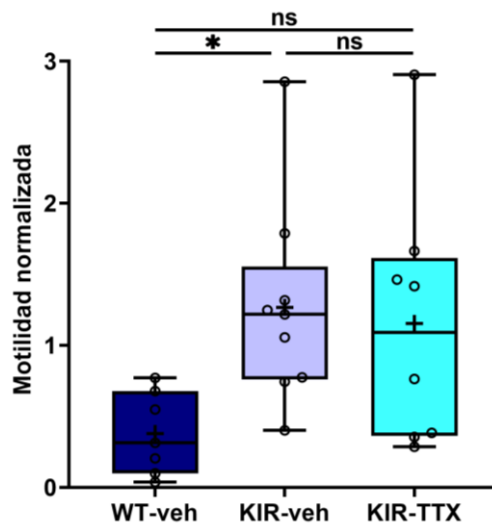
3. Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos sobre la dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAFs a 5 dpf de la LL.

Procedimos a estudiar la motilidad normalizada. Para eso, se detectaron eventos de extensión, retracción, formación y eliminación de ramas (Fig. 28).



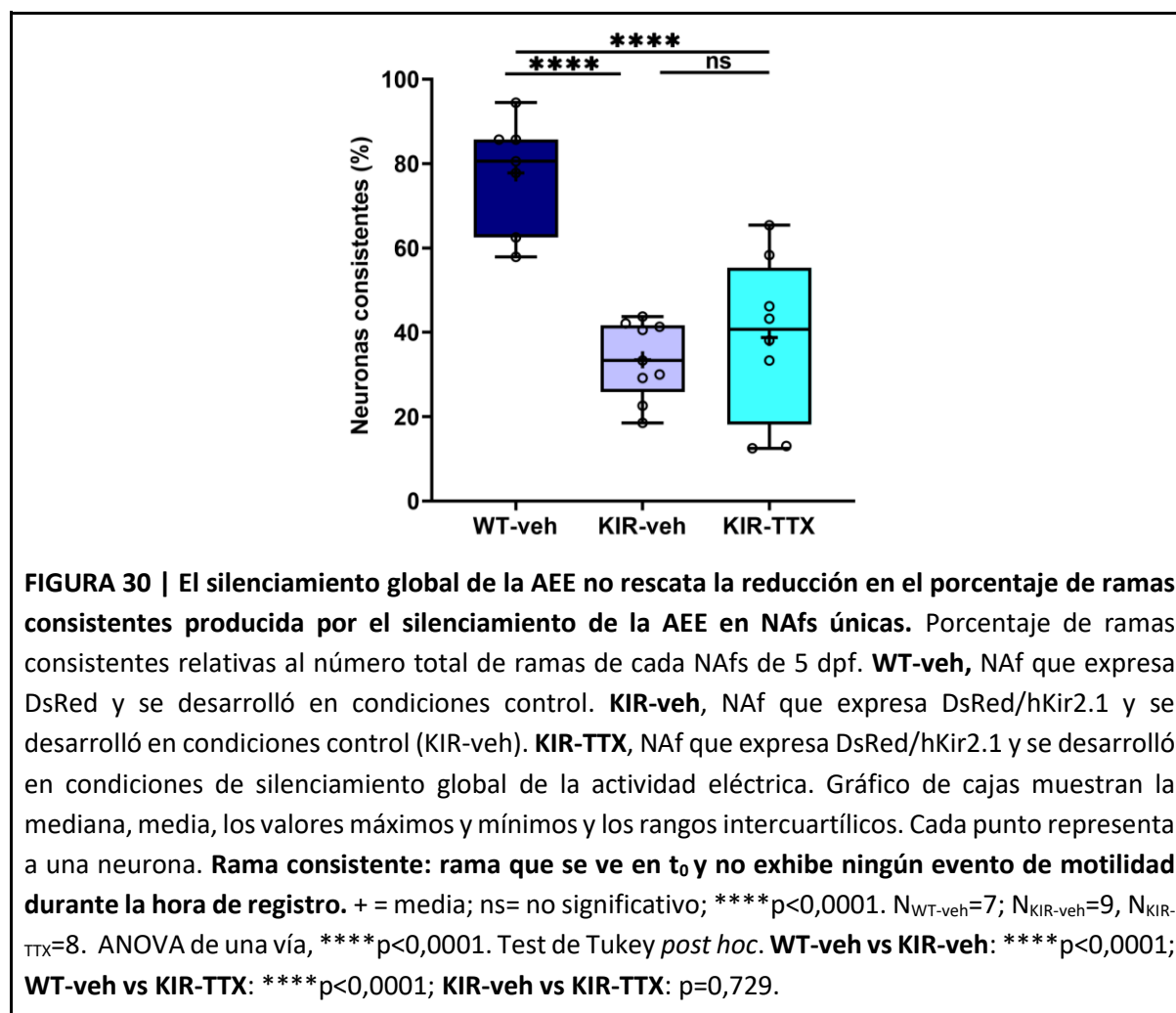
NAf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control. (Abajo) **KIR-TTX**, Naf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica.  $t_0$ ,  $t_4$ ,  $t_8$  y  $t_{12}$  corresponden a tiempos representativos del registro: 0, 20, 40 y 60 minutos, respectivamente. Los puntos coloreados representan eventos individuales de motilidad: extensión (rojo), retracción (celeste), formación (amarillo) y eliminación (verde). Los eventos detectados se marcaron individualmente en cada foto y se presentan solapados a medida que pasa el tiempo. Aquellas ramas donde no se encontraron eventos de motilidad durante toda la hora de registro, permanecen sin puntos. A  $t_{12}$  se visualizan todos los eventos a lo largo del registro. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Observamos que los árboles axonales de las NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) presentaron una mayor motilidad normalizada respecto a las NAfs WT-veh), mientras que las NAfs KIR-TTX no presentaron diferencias significativas al compararlas con las NAfs WT-veh o las NAfs KIR-veh (Fig. 29. Motilidad normalizada (sin unidades). WT-veh: 0,314 (0,578),  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 1,218 (0,794),  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 1,089 (1,251),  $N_{\text{KIR-TTX}}=9$ . ANOVA de una vía,  $*p=0,0451$ . Test de Tukey post hoc).



**FIGURA 29 | El silenciamiento de la AEE en NAfs única provoca un aumento en la motilidad. Sin embargo, el silenciamiento global de la AEE rescata parcialmente el efecto producido por el silenciamiento de NAfs únicas.** Motilidad normalizada a la longitud del árbol axonal central de una Naf de 5 dpf. **WT-veh**, Naf que expresa DsRed y se desarrolló en condiciones control. **KIR-veh**, Naf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control (KIR-veh). **KIR-TTX**, Naf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. + = media; ns = no significativo;  $*p<0,05$ .  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ;  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . ANOVA de una vía, Test de Tukey *post hoc*,  $*p=0,0451$ . **WT-veh vs KIR-veh:**  $*p=0,0496$ ; **WT-veh vs KIR-TTX:**  $p=0,1046$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX:**  $p=0,9410$ .

Para evaluar más en detalle la motilidad de los árboles axonales, calculamos el porcentaje de ramas consistentes. Observamos una disminución en el porcentaje de ramas consistentes tanto en NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) como de NAfs silenciadas única y globalmente en simultáneo (KIR-TTX), respecto de las NAfs WT-veh (Fig. 30. Ramas consistentes (%): WT-veh: 80,56 (23,21) %,  $N_{WT-veh}=7$ ; KIR-veh: 33,33 (15,82) %,  $N_{KIR-veh}=9$ ; KIR-TTX: 40,67 (37,17) %,  $N_{KIR-TTX}=8$ . ANOVA de una vía, \*\*\*\* $p<0,0001$ . Test de Tukey *post hoc*).

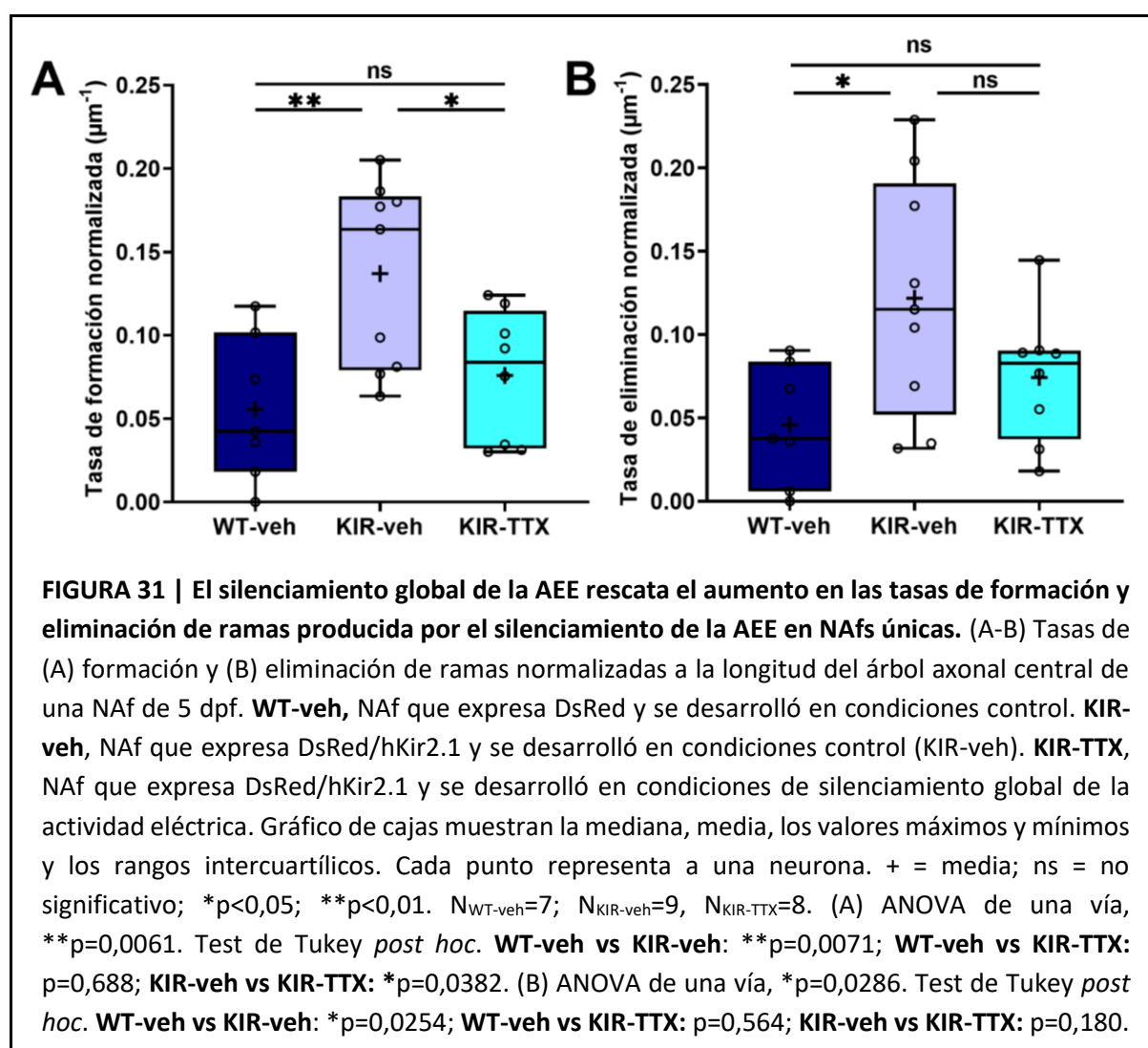


### Análisis de eventos de motilidad

Para diferenciar mejor entre los fenómenos actividad dependiente competitivos de los no competitivos que participan en la dinámica de crecimiento de los árboles axonales centrales de las NAfs, analizamos por separado los eventos de formación y eliminación de ramas, y de extensión y retracción.

## Eventos de formación y eliminación

A la hora de analizar los eventos de formación y eliminación, normalizamos las tasas de dichos eventos respecto a la longitud inicial del árbol axonal. Observamos que los árboles axonales de las NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) presentaron una mayor tasa de formación tanto al compararlas con las NAfs WT-veh como con las NAfs silenciadas única y globalmente en simultáneo (KIR-TTX) (Fig. 31A. Formación ( $\mu\text{m}^{-1}$ ): WT-veh: 0,0424 (0,0836)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 0,164 (0,104)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 0,0838 (0,0825)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . ANOVA de una vía,  $**p=0,0061$ . Test de Tukey *post hoc*). Por otro lado, vimos que los árboles axonales de las NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) presentaron una mayor tasa de eliminación respecto a las NAfs WT-veh, pero no significativamente mayor que las NAfs que sobreexpresan KIR y que fueron silenciadas globalmente (KIR-TTX) (Fig. 31B. Eliminación ( $\mu\text{m}^{-1}$ ): WT-veh: 0,0376 (0,0778)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 0,115 (0,139)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 0,0827 (0,0530)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . ANOVA de una vía,  $*p=0,0286$ . Test de Tukey *post hoc*).

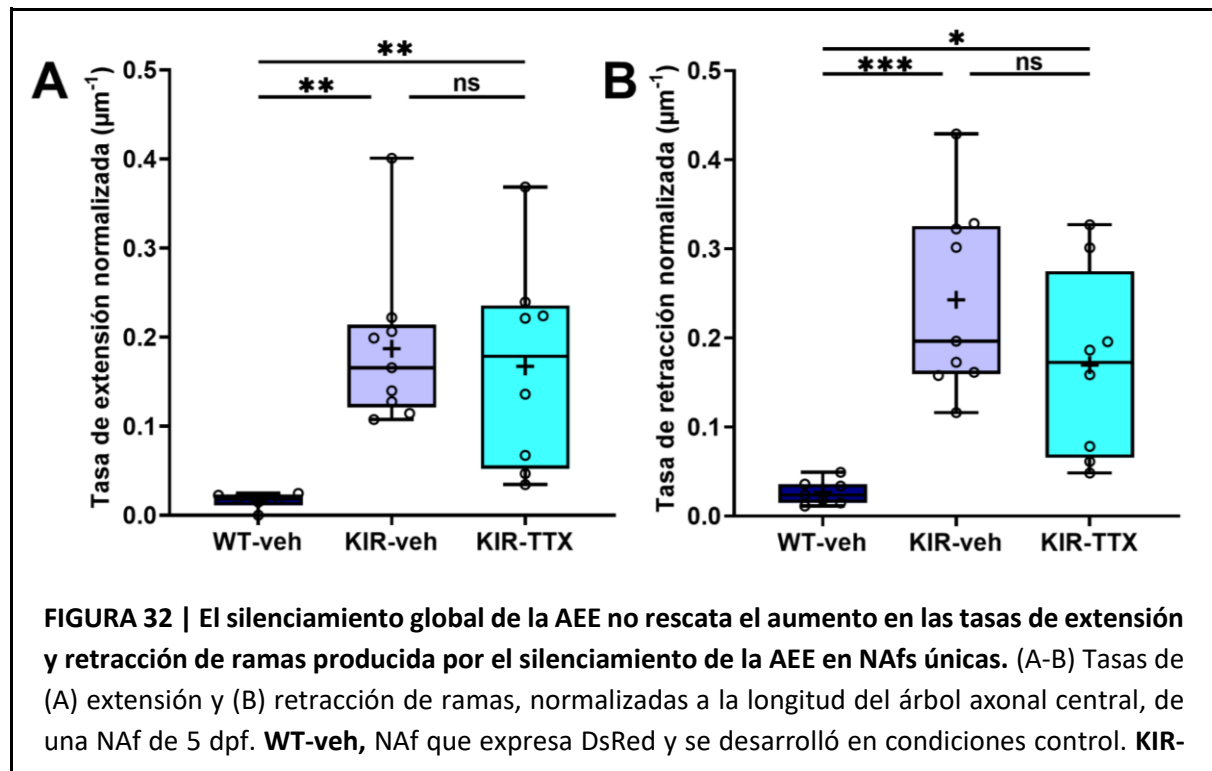




Estos resultados evidencian que las tasas de formación y eliminación de ramas son fenómenos competitivos dependientes de la actividad. En otras palabras, estas tasas aumentan cuando la neurona silenciada está rodeada de otras neuronas activas. En cambio, si está rodeada de neuronas inactivas no hay cambios en sus tasas de formación y eliminación. Estas evidencias nos permiten proponer que, una neurona con menor AEE que sus vecinas, está en desventaja provocando un incremento en el nacimiento de nuevas ramas. En síntesis, nuestros resultados sugieren que la formación y la eliminación de ramas son fenómenos competitivos dependientes de la actividad eléctrica.

### Eventos de extensión y retracción

Para analizar los eventos de extensión y retracción, normalizamos las tasas de dichos eventos respecto a la longitud inicial del árbol axonal. Vimos que los árboles axonales de las NAfs silenciados a nivel de célula única (KIR-veh) como las NAfs KIR-TTX presentaron tasas de extensión como de retracción mayores a las exhibidas por las NAfs WT-veh (Fig. 32A. Extensión ( $\mu\text{m}^{-1}$ ): WT-veh: 0,0185 (0,0120)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=6$ ; KIR-veh: 0,166 (0,093)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 0,179 (0,184)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . Kruskal-Wallis,  $**p=0,0017$ . Test de Dunn *post hoc*. Fig. 32B. Retracción ( $\mu\text{m}^{-1}$ ): WT-veh: 0,0235 (0,0211)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{WT-veh}}=7$ ; KIR-veh: 0,196 (0,166)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-veh}}=9$ ; KIR-TTX: 0,172 (0,209)  $\mu\text{m}^{-1}$ ,  $N_{\text{KIR-TTX}}=8$ . Kruskal-Wallis,  $***p=0,0006$  Test de Dunn *post hoc*).





**veh**, Naf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones control (KIR-veh). **KIR-TTX**, Naf que expresa DsRed/hKir2.1 y se desarrolló en condiciones de silenciamiento global de la actividad eléctrica. Gráfico de cajas muestran la mediana, media, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. + = media; ns = no significativo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . (A)  $N_{WT-veh}=6$ ;  $N_{KIR-veh}=9$ ,  $N_{KIR-TTX}=8$ , Kruskal-Wallis, \*\* $p=0,0017$ . Test de Dunn *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**: \*\* $p=0,0031$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**: \*\* $p=0,0064$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p > 0,999$ . (B)  $N_{WT-veh}=7$ ;  $N_{KIR-veh}=9$ ,  $N_{KIR-TTX}=8$ , Kruskal-Wallis, \*\*\* $p=0,0006$ . Test de Dunn *post hoc*. **WT-veh vs KIR-veh**: \*\*\* $p=0,0005$ ; **WT-veh vs KIR-TTX**: \* $p=0,0191$ ; **KIR-veh vs KIR-TTX**:  $p=0,954$ .

Nuestros resultados muestran que el aumento en las tasas de extensión como de retracción observado en las NAFs KIR-veh no fue rescatado por el silenciamiento global. Esto nos sugiere que la extensión y la retracción de ramas son fenómenos actividad-dependiente no competitivos.

# DISCUSIÓN

Mi tesis se centra en el estudio del rol de la AEE en el ensamblado de circuitos sensoriales utilizando como modelo las NAFs de la LLP del pez cebra. En particular, mi objetivo fue entender mejor cómo la falta de AEE en una neurona individual puede afectar el desarrollo de los árboles axonales que crecieron en un entorno competitivo, comparado con aquellas que lo hicieron en un entorno no competitivo, es decir, cuando la AEE fue silenciada globalmente con TTX.

Comprender reglas de desarrollo básicas que guían la construcción de circuitos neuronales complejos es un objetivo clave en la neurociencia del desarrollo. En este estudio, hemos identificado una regla clave en el desarrollo neuronal, donde la AEE guía la competencia entre neuronas. Específicamente, hemos demostrado que la supresión de AEE en una neurona reduce su capacidad para competir con neuronas vecinas, lo que afecta su crecimiento y maduración. Nuestros datos de imágenes *time-lapse* de alta resolución sugieren que el silenciamiento de la AEE afecta la estabilidad tanto de las ramas axonales más antiguas como de las recientemente formadas. Probablemente, la exacerbada eliminación de ramas impide el *feedback* necesario para detener la formación de nuevas ramas (Ruthazer et al., 2003), motivo por el cual la pérdida de competencia, a causa del silenciamiento individual de la AEE, exagera las tasas de formación como de eliminación de ramas. Por otro lado, la supresión de la AEE a nivel de célula única disminuye el número de varicosidades en el árbol axonal, por lo que probablemente disminuya la capacidad de las ramas para establecer conexiones sinápticas efectivas, afectando a la estabilidad y a la arquitectura del árbol axonal, lo que se traduce en una reducción en el área de cobertura de la NAF sobre el cerebro medio, así como un acortamiento de la longitud de las ramas axonales.

Además, a través de la supresión global de la AEE revelamos fenómenos dependientes de la actividad pero que no se relacionan con la pérdida de competitividad. Más bien, esto sugiere que la simple ausencia de AEE en una neurona es el factor clave que incrementa la dinámica de sus ramas axonales establecidas, provocando que se extiendan y retraigan con mayor frecuencia. Esto, muy probablemente se deba a la reducción de varicosidades en los extremos de las ramas axonales, las cuales están directamente correlacionadas con la cantidad de sinapsis (Meyer & Smith, 2006; Valera et al., 2021), resultando en una menor estabilidad de los árboles axonales. Este efecto, a diferencia de otros, parece ser exclusivo de la falta de AEE e independiente del entorno competitivo.

## **Parte 1.** Silenciamiento único: Efectos del silenciamiento de la AEE de una N Af individual en un entorno competitivo.

### 1. El silenciamiento único de N Afs reduce el área de cobertura sobre el cerebro medio y altera la complejidad del árbol axonal.

En este trabajo, silenciamos la AEE mediante la sobreexpresión del canal de potasio hKir2.1 en N Afs individuales. Para lograrlo, expresamos de manera estocástica las construcciones SILL:Gal4 y UAS:DsRed::UAS:hKir2.1. La eficacia del silenciamiento en animales inyectados con estas construcciones fue previamente demostrada en Plazas et al., 2013, donde, mediante Imaging de  $Ca^{2+}$ , se observó que las neuronas de la espina dorsal que expresaban UAS:DsRed podían mostrar transientes de actividad, mientras que aquellas que expresaban UAS:DsRed::UAS:hKir2.1 permanecían silenciadas.

Basados en resultados preliminares de nuestro laboratorio propusimos la hipótesis de que la supresión de la AEE en N Afs únicas conduce a un desarrollo anormal de los árboles axonales centrales que se proyectan hacia el cerebro medio.

En concordancia con nuestra hipótesis, en la sección de resultados vimos, principalmente, que la AEE desempeña un papel fundamental en el desarrollo de las proyecciones axonales centrales de las N Afs de la LLP. Puntualmente, la supresión de la AEE en N Afs individuales, a través de la sobreexpresión estocástica del canal de potasio hKir2.1, conduce a un desarrollo anormal de los árboles axonales que se proyectan hacia el cerebro medio, resultando en una reducción del área de cobertura a nivel central.

¿Podría la reducción en el área de cobertura causada por el silenciamiento único sugerir un mecanismo competitivo de la AEE entre neuronas vecinas durante la expansión territorial de los circuitos sensoriales? ¿O simplemente indica que la AEE es crucial para dicha expansión territorial, independientemente de la interacción con el entorno? Más adelante exploraremos cómo estos interrogantes se aclaran al comparar los resultados con el efecto del doble silenciamiento: el silenciamiento individual de una N Af en un entorno globalmente silenciado con TTX, es decir, un entorno no competitivo.

En un análisis más detallado del efecto del silenciamiento único, observamos que este afecta la complejidad del árbol axonal. Si bien no hay diferencias en el número de ramas totales de los árboles axonales silenciados respecto a los WT, las neuronas silenciadas presentan un mayor número de ramas secundarias. De manera contraintuitiva, el silenciamiento individual incrementa la complejidad del árbol axonal.

En cuanto a la arquitectura del árbol axonal, el silenciamiento individual de una NAF también afecta la longitud de las ramas, las cuales se acortan significativamente. Esta reducción en la longitud de las ramas explica la disminución en el área de cobertura observada en las NAFs silenciadas individualmente.

Es importante destacar que la disminución en el área de cobertura, el aumento en el número de ramas secundarias, y la reducción en la longitud individual de las ramas en la proyección central de las NAFs silenciadas de la LL a 5 dpf ya fueron documentadas en estudios previos de nuestro laboratorio, tal como se describe en la tesis doctoral de Salatino, L. (2024). Estos resultados no solo corroboran los hallazgos anteriores, sino que también resaltan la consistencia y reproducibilidad de nuestros experimentos, lo que reafirma la fiabilidad de la metodología empleada y la solidez de las conclusiones obtenidas. Esto nos sirve como control y sugiere que las inyecciones de vehículo a 2 dpf en el saco vitelino, introducidas en este estudio, son inocuas y no alteran el fenotipo de las NAFs silenciadas.

Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de neuronas ganglionares de la retina (NGRs) individuales en pez cebra, mediante la sobreexpresión de hKir2.1, lleva a un desarrollo anómalo de los árboles axonales que proyectan al tectum óptico. A los 5 dpf, estos árboles axonales en las NGRs mostraron una longitud y complejidad reducidas (Hua et al., 2005). En este mismo estudio, los autores bloquearon la transmisión sináptica sobreexpresando una versión mutante no funcional de la proteína VAMP (VAMPm) y replicaron los resultados obtenidos con hKir2.1. De manera consistente con nuestros hallazgos, la supresión de la actividad presináptica interfiere con el desarrollo adecuado del árbol axonal.

De manera contraintuitiva, al sobreexpresar la cadena liviana de la toxina tetánica (TeNT-lc), que bloquea completamente la fusión vesicular, en el mismo sistema, las NRG, se observaron árboles axonales con una complejidad similar, pero con una longitud aumentada (Fredj et al., 2010). Los autores argumentan que las diferencias en los resultados obtenidos en dichos estudios se deben principalmente al grado de supresión de la actividad presináptica logrado con los métodos utilizados. En el estudio de Hua et al. (2005), se utilizó un mutante de VAMP2 que suprimió la actividad presináptica, pero no la eliminó por completo, lo que resultó en árboles axonales más pequeños en las NRG. Esta supresión parcial pudo haber inducido mecanismos de plasticidad como la depresión a largo plazo (LTD), llevando a la eliminación de sinapsis y, por ende, a una menor formación de las ramas axonales. Dado que las sinapsis parecen estar correlacionadas tanto con la estabilización como con la formación de ramas axonales (Zhang et al., 1998, 2000; Vislay-Meltzer et al., 2006; Alsina et al., 2001; Meyer y Smith, 2006; Ruthazer et al., 2006), la eliminación de sinapsis llevaría tanto a un aumento en la tasa de eliminación de ramas como a una reducción en la tasa de formación de ramas. Ambos resultados darían como resultado árboles axonales más pequeños.

Por otro lado, en el estudio de Fredj et al. (2010) que empleó TeNT-Lc, se logró una supresión más completa de la actividad sináptica. Este bloqueo más efectivo evitó la eliminación de sinapsis y permitió un mayor crecimiento de las ramas axonales, resultando en árboles axonales más grandes. Esto sugiere que diferentes grados de supresión sináptica pueden generar efectos opuestos en el crecimiento axonal.

Otro parámetro a comparar con el trabajo de nuestros colegas es el número de ramas axonales en las neuronas silenciadas, relacionado con la complejidad del árbol. En nuestro caso, al silenciar individualmente la AEE, no observamos cambios en la cantidad de ramas que se extienden desde el axón central, similar a lo reportado por Fredj et al. (2010). Sin embargo, Hua et al. (2005) encontraron una disminución en el número de ramas, lo que nuevamente pone de manifiesto la heterogeneidad de los resultados. Como hemos mencionado, las diferencias en los niveles de silenciamiento podrían explicar esta variabilidad. Mientras que en Fredj et al. (2010) el silenciamiento de la AEE es prácticamente completo, en Hua et al. (2005) es parcial, desencadenando mecanismos diferentes.

En cuanto a la relación de estos trabajos con nuestros resultados, debe destacarse que estamos estudiando sistemas diferentes, por lo que, la discrepancia en los resultados también podría sugerir que los mecanismos celulares que rigen el establecimiento y refinamiento de los sistemas sensoriales en desarrollo aún no se comprendan completamente debido a su heterogeneidad y la posible falta de una regla única. Es decir, las reglas que subyacen a estos procesos podrían no ser universales en todas las regiones del cerebro ni aplicables a todos los tipos de células (Kirkby et al., 2013; Hua et al., 2005).

Recapitulando, nuestros hallazgos indican que el silenciamiento de la AEE causa anomalías en el crecimiento de los árboles axonales de las NAFs, afectando tanto su complejidad como el territorio que ocupan en el cerebro medio. Las evidencias obtenidas sugieren que la AEE desempeña un papel esencial en el establecimiento, el desarrollo adecuado de la arquitectura y complejidad de los árboles axonales de las NAFs de la LLP.

## 2. El silenciamiento único provoca deficiencias en la conectividad sináptica.

Para profundizar en el análisis morfológico de las NAFs tras el silenciamiento individual con hKir2.1, estudiamos las varicosidades en el árbol axonal como indicador indirecto de la conectividad con neuronas de segundo orden. Estas varicosidades, engrosamientos de la membrana neuronal, han sido observadas en varios sistemas sensoriales, incluyendo LLA y LLP (Valera et al., 2021). Diversos estudios han identificado una correlación positiva entre estos engrosamientos de la membrana y la acumulación de proteínas de la maquinaria presináptica (Meyer & Smith, 2006; Valera et al., 2021). Más aún, se sabe que la formación

de sinapsis es crucial para la maduración, el crecimiento y la complejidad adecuados del árbol axonal (Meyer & Smith, 2006; Niell et al., 2004).

En las NAfs de la LL, se ha documentado que las varicosidades colocan con la proteína presináptica sinapsina 1 (Valera et al., 2021). Por ello, para el estudio *in vivo* y en tiempo real del crecimiento axonal, consideramos la formación de varicosidades como un indicador de la conectividad de las NAfs con sus destinos postsinápticos. Estas varicosidades aparecen en las proyecciones centrales desde los 3,5 dpf, tanto en el axón central (donde se establecen primero las ramas primarias) como en el árbol axonal.

En la sección de resultados, vimos que los animales WT a los 5 dpf, presentan varicosidades claramente definidas, con una gran acumulación de DsRed y tamaños variados, algunas incluso bastante extensas. Tras la sobreexpresión de hKir2.1, observamos una reducción en el número de varicosidades en los árboles axonales, aunque no en el axón central. Aunque aún no hemos calculado el área de estos engrosamientos, notamos cualitativamente una marcada disminución en su tamaño.

Descubrimos que la disminución en el número de varicosidades en el árbol axonal se debe principalmente a la ausencia de varicosidades en las puntas de las ramas. Esto sugirió que muchas ramas axonales no tenían una morfología madura, a diferencia del fenotipo WT de 5 dpf, donde las puntas suelen presentar engrosamientos. En el proceso normal de maduración, los árboles axonales inmaduros generan numerosas ramas nuevas, la mayoría de las cuales se retraen y desaparecen, mientras que algunas se estabilizan. El crecimiento axonal se guía por mecanismos de “prueba y error” y depende del establecimiento adecuado de sinapsis (Meyer & Smith, 2006). Nuestros resultados apoyan este modelo sinaptotrópico, ya que el silenciamiento de la AEE reduce el número de varicosidades en el árbol axonal, y esto está acompañado con una reducción en la longitud de las ramas, indicando que fallas en la sinaptogénesis afectan el crecimiento axonal.

Nuevamente, es fundamental resaltar la consistencia y reproducibilidad de nuestros experimentos. La disminución en el número de varicosidades en los árboles axonales de las NAfs silenciadas, así como en las puntas de las ramas de la proyección central a los 5 dpf de la LL, ya había sido documentada en estudios anteriores de nuestro laboratorio, como se detalla en la tesis doctoral de Salatino, L. (2024). Estos resultados no solo validan hallazgos previos, sino que también refuerzan la consistencia y fiabilidad de nuestros experimentos, confirmando la robustez de la metodología utilizada y la solidez de las conclusiones obtenidas.

### 3. La dinámica de crecimiento y la maduración de los árboles axonales de las NAfs depende de la AEE.

En nuestro estudio sobre la dinámica de crecimiento axonal, observamos una motilidad exacerbada en las NAfs silenciadas individualmente a los 5 dpf, con un aumento tanto en las tasas de formación y eliminación de ramas, como en sus tasas de extensión y retracción.

Está bien documentado que los árboles axonales de neuronas sensoriales inmaduras son altamente móviles, presentando extremos afinados que exhiben movimientos exploratorios, mientras que los árboles maduros muestran una menor motilidad (Meyer & Smith, 2006; Niell et al., 2004; Nikolaou & Meyer, 2012). El incremento en las tasas de extensión y retracción en nuestras NAfs silenciadas individualmente, muy probablemente, se relacione directamente con la ausencia de varicosidades en los extremos de las ramas, ya que las ramas con puntas afinadas, sin varicosidades, mostraron más movimientos. Las sinapsis juegan un papel crucial en la detención del crecimiento axonal al seleccionar filopodios que se convierten en ramas estables, lo que permite que los árboles axonales definan su territorio y funcionen de manera estable (Alsina et al., 2001; Meyer y Smith, 2006; Ruthazer et al., 2006). Dado que el crecimiento axonal está guiado por el establecimiento de sinapsis, no es sorprendente encontrar mayor inestabilidad en un modelo con fallas en la conectividad.

Nuestros resultados están en línea con los de Fredj et al. (2010), quienes observaron que el bloqueo de la actividad presináptica en NGRs individuales resultó en una mayor motilidad axonal y extensión de ramas, llevando a árboles axonales más extensos. Por otro lado, Hua et al. (2005) encontraron una menor tasa de motilidad al silenciar individualmente las NGRs con hKir2.1. Esta aparente contradicción podría explicarse (Salatino, L. (2024). Tesis doctoral) por varias razones:

1. Los sistemas sensoriales diferentes podrían requerir patrones mínimos de actividad distintos para establecer sinapsis y regular el crecimiento axonal.
2. Los diferentes métodos experimentales utilizados para la expresión del plásmido hKir2.1 pueden haber producido distintos niveles de silenciamiento, considerando que la expresión en el estudio de Hua et al. (2005) comenzó después de las 48 hpf, mientras que en nuestro trabajo comenzó en etapas más tempranas.
3. Los diferentes destinos postsinápticos de las NAfs y NGRs podrían involucrar distintos factores moduladores del crecimiento axonal.

Debe considerarse que las NAfs de la LL son glutamatérgicas. El glutamato actúa como modulador positivo para el crecimiento axonal y la plasticidad sináptica en diversos sistemas (Chang & Camilli, 2001; Gan, 2003; Schmitz et al., 2009; Fernández-Montoya et al., 2018; Mattson, 2008), y también como inhibidor en terminales presinápticos a través de receptores

AMPA (Chang & Camilli, 2001; Fredj et al., 2010; Schmitz et al., 2009). No obstante, su efecto en las NAfs durante el desarrollo aún no ha sido estudiado.

En resumen, nuestros resultados van en concordancia con los antecedentes reportados en otros sistemas sensoriales, sugiriendo que la maduración de los árboles axonales de las NAfs es dependiente de actividad.

#### 4. El silenciamiento a nivel de célula única exacerba la extensión y retracción, así como la formación y eliminación de ramas.

Está documentado que la formación y eliminación de ramas, tanto nuevas como establecidas, son procesos esenciales en el desarrollo de los sistemas sensoriales, determinando la conectividad sináptica y asegurando la correcta organización de los mapas sensoriales (Kandler et al., 2009; Li et al., 2022; Redolfi et al., 2021). En NAfs silenciadas individualmente, encontramos un aumento en las tasas de formación y eliminación de ramas a los 5 dpf, lo que sugiere que la AEE actúa como modulador de estos eventos. Como no observamos diferencias en la vida media de las ramas recientemente formadas entre las NAfs WT y las silenciadas (datos no mostrados), el incremento en la tasa de eliminación se debería principalmente a la pérdida de ambos tipos de ramas, las nuevas y las ya establecidas previamente.

La formación de las ramas dendríticas y axonales está regulada por factores de crecimiento exógenos como BDNF, FGF y NGF, siendo estos los más comunes en el sistema nervioso (Kalil et al., 2014). Además, se ha demostrado que la aplicación de BDNF es suficiente para inducir la formación de ramas en árboles axonales de NGRs en *Xenopus* (Cohen-Cory et al., 2010) y para promover la rápida extensión de nuevas ramas (Alsina et al., 2001). Sin embargo, la estabilización de las ramas recientemente formadas depende de transientes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gomez & Zheng, 2006).

Nuestros resultados indican que el arresto en la formación de ramas nuevas es dependiente de actividad, ya que el silenciamiento con hKir2.1 en NAfs exacerba la tasa de formación.

#### En pocas palabras (Parte 1)

En esta parte hemos replicado en gran medida resultados previos de nuestro laboratorio. Estos resultados no solo confirman los hallazgos anteriores, sino que también subrayan la consistencia y reproducibilidad de nuestros experimentos, reafirmando la fiabilidad de la metodología empleada y la solidez de las conclusiones obtenidas.



La formación de un sistema sensorial funcional presenta vías de señalizaciones moleculares en las neuronas en desarrollo que son extremadamente complejas y cruciales. Este proceso depende de interacciones dinámicas y precisas que aseguran el correcto establecimiento de las redes neuronales. Para entender mejor el papel de la actividad neuronal, es esencial emplear modelos experimentales que sean relativamente simples, fáciles de manipular y que permitan el uso de herramientas genéticas y farmacológicas, además de estudios *in vivo* que faciliten una observación detallada y controlada. En este sentido, el modelo de LLP en pez cebra se ha revelado como una herramienta altamente eficaz para estudiar la actividad neuronal en el desarrollo de sistemas sensoriales.

En nuestro estudio, demostramos que el silenciamiento individual de las NAFs de la LLP del pez cebra, resulta en anomalías significativas en el ensamblado, la arquitectura, la complejidad, la dinámica de crecimiento y la maduración de los árboles axonales. Estos resultados destacan la importancia de la AEE en el desarrollo morfológico y funcional de los sistemas sensoriales y subrayan la utilidad del pez cebra como modelo para futuras investigaciones en este ámbito.

## **Parte 2.** Silenciamiento global: Efectos de la supresión global de la AEE sobre el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAFs de la LL.

### 1. El silenciamiento global de la AEE no afecta el territorio, ni la complejidad ni la arquitectura del árbol axonal.

Teniendo en cuenta los resultados de la primera sección surge una pregunta fundamental: ¿Los fenotipos observados tras el silenciamiento único sugieren que la AEE actúa como un mecanismo competitivo entre neuronas vecinas, donde la pérdida de competencia provoca los efectos "negativos" asociados al silenciamiento individual, indicando que la interacción competitiva entre neuronas es esencial para el desarrollo de sistemas sensoriales? ¿O, por el contrario, la falta de AEE por sí sola es crítica para el correcto establecimiento, independientemente de la interacción con el entorno?

Para determinar si los fenómenos observados en el silenciamiento único son consecuencia de silenciar una sola neurona rodeada de neuronas activas, primero analizamos el efecto del

silenciamiento global de la AEE en el desarrollo de los árboles axonales centrales de las NAFs WT. Para ello, expresamos de manera estocástica las construcciones SILL:Gal4 y UAS:DsRed en estadio embrionario de una célula de peces cebra. Posteriormente, estos peces recibieron una inyección de TTX en el saco vitelino a los 2 dpf, con el objetivo de silenciar globalmente la AEE.

En esta segunda parte, nos enfocamos en comparar el fenotipo de estos animales con los animales cuyas NAFs WT fueron inyectadas con vehículo (de TTX) también a los 2 dpf, para aislar y evaluar el efecto específico del TTX sobre el desarrollo de los árboles axonales centrales de las NAFs.

Primero, observamos que el silenciamiento global de la AEE en las NAFs WT no afecta significativamente el área de cobertura, el número de ramas axonales ni su longitud. Esto nos permite concluir que la supresión global de la AEE, por sí sola, no altera el establecimiento, la complejidad ni la arquitectura de las proyecciones centrales de las NAFs en el cerebro medio. Este hallazgo, sería la primera evidencia de que, al menos en relación con los parámetros analizados hasta ahora, la AEE no pareciera ser crucial de manera aislada, sino que su impacto dependería de la interacción con el entorno. Esto reforzaría la primera hipótesis planteada de que existirían mecanismos competitivos de la AEE entre neuronas vecinas durante la expansión territorial de los circuitos sensoriales y la configuración de sus árboles axonales. En este contexto, el fenotipo observado en el silenciamiento único, visto en la parte 1, podría deberse a la pérdida de competencia de la neurona con sus vecinos competidores, más que a la simple ausencia de AEE.

Sin embargo, aún es prematuro establecer conclusiones definitivas. Será necesario considerar los resultados obtenidos en la tercera parte, cuando exploremos estos interrogantes en relación con el doble silenciamiento: el silenciamiento individual de una NAF en un entorno globalmente silenciado con TTX, es decir, en un entorno no competitivo.

En resumen, estos resultados ofrecen una primera evidencia que respalda la hipótesis de la competencia, al menos en lo que respecta a los parámetros analizados hasta ahora: área de cobertura, complejidad y arquitectura del árbol axonal. Esto sugeriría la existencia de una interacción entre neuronas activas dependiente de su AEE, lo que tendría un impacto crucial en el establecimiento y la morfología de las proyecciones axonales centrales.

## 2. La supresión global de la AEE resulta en deficiencias en la conectividad sináptica.

Tras el silenciamiento global con TTX, nuevamente, nos centramos en profundizar el análisis morfológico de las NAFs, estudiando las varicosidades como indicadores indirectos de la conectividad con neuronas de segundo orden. Anteriormente hemos mencionado la

correlación positiva entre las varicosidades y la conectividad sináptica, así como la importancia de la formación de sinapsis para la maduración, el crecimiento y la complejidad del árbol axonal (Valera et al., 2021; Meyer & Smith, 2006; Niell et al., 2004).

La inyección de TTX la realizamos a los 2 dpf, antes de la aparición de las varicosidades en las proyecciones centrales, las cuales emergen a partir de los 3,5 dpf tanto en el axón central como en el árbol axonal (Valera et al., 2021). Dada esta temporalidad de los eventos, el silenciamiento global de la AEE podría tener un impacto significativo en la conectividad sináptica.

A pesar de no haber observado cambios en el área de cobertura, la complejidad ni la arquitectura del árbol axonal, sí detectamos impactos del silenciamiento global de la AEE en la conectividad sináptica. Como vimos en la sección de resultados, observamos que en animales WT a los 5 dpf las varicosidades están bien definidas, con una acumulación notable de DsRed y tamaños variados, algunas de ellas bastante grandes. Sin embargo, al suprimir globalmente la AEE, se detectó una disminución en el número de varicosidades en los árboles axonales, aunque no en el axón central. Aunque no se midió, también se notó una reducción en el tamaño de estos engrosamientos. Descubrimos que la reducción en el número de varicosidades en el árbol axonal se debe principalmente a la falta de varicosidades en las puntas de las ramas, lo que sugiere que muchas ramas axonales no alcanzan una morfología madura. Esto contrasta con el fenotipo WT a 5 dpf, donde las puntas de las ramas suelen presentar engrosamientos.

Resulta importante notar que a diferencia de lo que sucede con el área de cobertura, la complejidad y la arquitectura del árbol axonal, donde las evidencias sugieren fuertemente que la AEE regula de manera competitiva dichas características, el establecimiento de las varicosidades estaría regulada por la AEE de manera no competitiva. Acá si la AEE pareciera ser crucial de manera aislada, siendo su impacto independiente de la presencia de actividad eléctrica en las neuronas del entorno. Sin embargo, como dijimos anteriormente, aún es prematuro establecer conclusiones definitivas y será necesario seguir explorando estos interrogantes en la tercera parte con el doble silenciamiento.

En resumen, la reducción en el número de varicosidades al suprimir globalmente la AEE indicaría que esta actividad es crucial para el establecimiento de sinapsis, independientemente del estado de las neuronas circundantes.

### 3. La supresión global de la AEE altera la dinámica de crecimiento y la maduración de los árboles axonales.

En nuestro estudio sobre la dinámica de crecimiento axonal, encontramos que la supresión global de la AEE en las NAFs WT incrementa las tasas de extensión y retracción sin afectar

las tasas de formación y eliminación. Esto sugiere que, cuando se suprime la AEE tanto en una NAF como en sus neuronas vecinas, las ramas axonales son menos estables, lo cual es característico de árboles axonales inmaduros (Meyer & Smith, 2006; Niell et al., 2004; Nikolaou & Meyer, 2012).

Aunque es prematuro sacar conclusiones definitivas y se necesita realizar un análisis más profundo en el modelo de doble silenciamiento, los hallazgos actuales sugerirían que la motilidad neuronal involucra componentes diferenciados. Los movimientos de extensión y retracción parecieran depender meramente de la AEE y ser independientes del entorno, mientras que la formación y eliminación de ramas axonales podrían ser fenómenos actividad-dependiente competitivos. Estas diferencias sugieren que los procesos de extensión/retracción y formación/eliminación podrían estar mediados por mecanismos celulares y moleculares distintos. Para confirmar estas teorías, será necesario investigar en detalle el modelo doblemente silenciado.

Otro punto importante a resaltar es que el aumento en las tasas de extensión y retracción provocado por la supresión global de la AEE en NAFs WT, muy probablemente, se deba a la ausencia de varicosidades en los extremos de las ramas. Dado que el crecimiento axonal está estrechamente relacionado con el establecimiento de sinapsis, no es sorprendente encontrar una mayor inestabilidad en un modelo con defectos en la conectividad.

En resumen, la supresión global de la AEE en las NAFs WT sugiere que la formación y eliminación de ramas podrían estar regulados por mecanismos competitivos entre neuronas vecinas, mientras que la extensión y retracción parecieran depender directamente de la AEE y ser menos influenciados por la competencia del entorno.

## En pocas palabras (Parte 2)

La falta de efectos del silenciamiento global de la AEE en las NAFs WT sobre el área de cobertura, la complejidad del árbol axonal, el número y longitud de las ramas, así como sobre la formación y eliminación de estas, sugiere que estos aspectos podrían estar regulados por mecanismos dependientes de la actividad y competitivos entre neuronas vecinas. En contraste, los procesos de extensión y retracción de ramas parecen depender directamente de la AEE y ser menos influenciados por la competencia con el entorno. Por lo tanto, la supresión global de la AEE en las NAFs WT indicaría que la AEE es fundamental para el establecimiento de sinapsis y la estabilidad de las ramas axonales. Para validar estas hipótesis, será esencial realizar un análisis más detallado en el modelo de doble silenciamiento.

### **Parte 3.** Fenómenos actividad-dependiente competitivos y no competitivos que regulan el establecimiento y dinámica de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAfs de la LL.

En la primera y segunda parte de esta sección, al analizar por separado tanto el silenciamiento único y el silenciamiento global de las NAfs, surge una pregunta fundamental: ¿Qué aspectos del desarrollo de los sistemas sensoriales están regulados por mecanismos competitivos entre neuronas vecinas, y cuáles dependen directamente de la AEE sin verse afectados por la competencia del entorno? En otras palabras, ¿cuándo es esencial la interacción competitiva entre neuronas y cuándo es crítica la falta de AEE por sí sola?

Para abordar esta pregunta central en el desarrollo de los sistemas sensoriales, realizamos un doble silenciamiento en un mismo pez cebra: primero, silenciamos individualmente la AEE mediante la sobreexpresión del canal de potasio hKir2.1 en NAfs individuales. Para lograrlo, expresamos de manera estocástica las construcciones SILL:Gal4 y UAS:DsRed::UAS:hKir2.1. Y, además, a los 2 dpf inyectamos TTX en el saco vitelino del pez, el cual silencia la AEE a nivel global. La eficacia del silenciamiento en animales tratados con estas construcciones e inyecciones ha sido previamente demostrada en estudios similares (Gnuegge et al., 2001; Hua et al., 2005). En particular, Hua et al. (2005) realizaron el silenciamiento individual de NGRs en pez cebra mediante la expresión de hKir2.1, y también utilizaron una inyección de TTX intraocular para bloquear la actividad eléctrica en todas las NGRs. Según su estudio, este tratamiento con TTX no afectó la morfología de las neuronas, un hallazgo consistente con nuestros resultados.

#### 1. El territorio y la arquitectura del árbol axonal de una NAf dependen de la interacción y la competencia con neuronas vecinas.

Basados en resultados preliminares de nuestro laboratorio propusimos la hipótesis de que el establecimiento y la maduración de los árboles axonales de las NAfs de la LL está regulado por procesos dependientes de la actividad eléctrica, algunos competitivos y otros no competitivos. Los primeros dependen de la capacidad de competir de una neurona respecto a neuronas vecinas y el segundo no, solo depende de la AEE en sí misma.

La supresión de la AEE en NAFs individuales provoca un desarrollo anómalo de los árboles axonales que se proyectan hacia el cerebro medio, resultando en una disminución del área de cobertura a nivel central. Sin embargo, como vimos en la sección de resultados, al realizar el doble silenciamiento, la supresión global de la AEE contrarresta, al menos en parte, este fenotipo. Esto sugiere que el área de cobertura de una NAF está determinada por procesos de actividad dependientes y competitivos, influenciado por la interacción con neuronas vecinas. Es decir, la reducción en el área de cobertura de la NAF en el cerebro medio solo se manifiesta cuando su AEE es menor que la de las neuronas vecinas. Esta competencia entre neuronas activas y silenciadas es clave para el establecimiento de las proyecciones axonales centrales.

Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de NGRs individuales en pez cebra, mediante la expresión de hKir2.1, provoca un desarrollo anómalo en los árboles axonales que proyectan al tectum óptico. A los 5 dpf, estos árboles axonales en las NGRs mostraron una reducción en su longitud (Hua et al., 2005). En ese mismo estudio, al bloquear la actividad eléctrica a nivel global, los autores lograron revertir el fenotipo, restaurando el área del árbol axonal individual a niveles normales.

De igual manera, y como mencionamos anteriormente, al sobreexpresar la cadena liviana de la toxina tetánica (TeNT-Ic), que bloquea completamente la fusión vesicular, en el mismo sistema, las NGRs mostraron una expansión significativa del territorio ocupado por el árbol axonal en el tectum (Fredj et al., 2010). Sin embargo, cuando las NGRs vecinas también fueron silenciadas, el área del árbol axonal individual se restauró a niveles normales.

En línea con nuestros hallazgos, ambos estudios concluyen que la capacidad de una neurona para establecer un territorio es un proceso que depende de la competencia.

Por otro lado, en el estudio de Fredj et al. (2010), el silenciamiento individual resultó en una complejidad similar en los árboles axonales, mientras que en el caso de Hua et al. (2005), el silenciamiento individual provocó una reducción en la complejidad del árbol axonal, que pudo revertirse mediante el silenciamiento global. Nuestros hallazgos son consistentes con esta última observación. Inicialmente, el silenciamiento individual mostró una alteración en la complejidad y en la arquitectura del árbol axonal, presentando un mayor número de ramas secundarias y una reducción en la longitud de las ramas. Sin embargo, al suprimir globalmente la AEE, logramos revertir, al menos parcialmente, este fenotipo.

Tanto nuestros hallazgos como el de nuestros colegas, Hua et al. (2005), sugieren que la complejidad del árbol axonal de una NAF depende de la AEE y de la interacción y competencia entre neuronas, lo que refuerza la idea de que se trata de un fenómeno competitivo. La complejidad del árbol se altera sólo cuando la neurona tiene una AEE reducida en comparación con sus vecinos competidores.

## 2. La conectividad sináptica depende de la AEE, a través de mecanismos no competitivos.

Estudiamos las varicosidades en el árbol axonal como un indicador indirecto de la presencia de conexiones sinápticas con neuronas de segundo orden. En el caso del silenciamiento individual, observamos una reducción en el número de varicosidades en los árboles axonales, un efecto equivalente al observado con el silenciamiento global de la AEE. En línea con estos resultados, cuando realizamos el doble silenciamiento —es decir, el silenciamiento individual de una NAF en un entorno donde todas las neuronas vecinas también están silenciadas— no vimos una reversión del fenotipo, ya que continuamos observando una disminución en el número de varicosidades en los árboles axonales, así como una reducción en el tamaño de estas.

Más aún, al igual que en los casos de silenciamiento individual y global por separado, el doble silenciamiento también resultó en la ausencia de varicosidades en las puntas de las ramas axonales. Esto sugiere nuevamente que las ramas axonales no alcanzan una morfología madura, en contraste con el fenotipo WT a 5 dpf, donde las puntas suelen presentar engrosamientos característicos. Estos hallazgos refuerzan una vez más el modelo sinaptotrópico, destacando cómo las fallas en la sinaptogénesis pueden afectar negativamente el crecimiento axonal.

En resumen, la reducción en la formación de sinapsis tanto en el silenciamiento individual, en el silenciamiento global como en el doble silenciamiento de la AEE, indica que la AEE es crucial por sí sola para la formación sináptica, independientemente de la expresión de AEE en las neuronas circundantes.

## 3. La motilidad de los árboles axonales está regulada por procesos dependientes de la AEE tanto competitivos como no competitivos

En nuestro estudio sobre la dinámica de crecimiento axonal, observamos una motilidad exacerbada en las NAFs silenciadas individualmente a los 5 dpf, manifestada por un aumento tanto en las tasas de formación y eliminación de ramas como en las de extensión y retracción. Sin embargo, cuando suprimimos globalmente la AEE, solo las tasas de extensión y retracción se incrementaron en las NAFs WT, lo cual atribuimos a la ausencia de varicosidades en los extremos de las ramas, sugiriendo que las fallas en la conectividad generan mayor inestabilidad del árbol axonal.

Teniendo en cuenta estos resultados, planteamos la hipótesis de que el doble silenciamiento, no rescataría los fenotipos de extensión y retracción, pero sí los de formación y eliminación. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis demostrando que la motilidad, que

abarca cuatro movimientos básicos (extensión, retracción, formación y eliminación), tiene componentes diferenciados: mientras que los movimientos de extensión y retracción son fenómenos dependientes de la AEE no competitivos, los de formación y eliminación son fenómenos competitivos, dependientes de la relación de la AEE de una neurona con su entorno. Cuando una neurona tiene menos AEE que sus vecinas, estos movimientos de formación y eliminación se exacerban.

Nuestros resultados indican que el arresto en la formación de ramas nuevas es un fenómeno competitivo, ya que el silenciamiento global de la AEE rescata la exacerbación en la formación de ramas dada por el silenciamiento individual. Este fenómeno competitivo es respaldado por estudios como el de Hua et al. (2005), donde si bien reportaron una menor tasa de formación y eliminación de ramas, también encontraron que el fenotipo se revertía al silenciar globalmente las NGRs vecinas, reafirmando la importancia del entorno y la naturaleza competitiva de estos procesos.

En contraste, estudios como el de Fredj et al. (2010) mostraron que el silenciamiento global de las NGRs vecinas no revierte el aumento en la formación de ramas, lo que llevó a los autores a concluir que la formación de filopodios estaba regulada por la función presináptica (equivalente a la actividad eléctrica en nuestro caso), independientemente de la actividad de las neuronas vecinas. Además, este trabajo destacó que la supresión de la función presináptica en NGRs individuales impide que detengan la extensión de ramas ya establecidas, lo que resulta en una expansión significativa del territorio ocupado por el árbol axonal en el tectum óptico. Sin embargo, cuando las NGRs vecinas también fueron silenciadas, el área del árbol axonal se restauró a niveles normales. Por lo tanto, los autores afirman que la capacidad de los axones para detener la extensión de ramas y ocupar establemente un territorio es un proceso dependiente de la actividad y competitivo.

Nuestros resultados, sin embargo, sugieren lo contrario: la formación y eliminación de ramas son procesos dependientes de la actividad y competitivos, mientras que la extensión y retracción de ramas dependen de la AEE, pero de manera independiente a la actividad en las neuronas circundantes.

Las diferencias observadas en la extensión/retracción y formación/eliminación de ramas podrían indicar que estos procesos se rigen por mecanismos celulares y moleculares distintos. Los mecanismos subyacentes que hemos descrito aún no se comprenden completamente, pero las evidencias sugieren que las señales retrógradas podrían desempeñar un papel crucial en el proceso competitivo. En el caso de las NGRs, se han propuesto varios mensajeros retrógrados como posibles mediadores, incluidos las neurotrofinas, las moléculas de adhesión celular y el óxido nítrico (Regehr et al., 2009); así como las neurotrofinas y el ácido araquidónico (Schmidt et al., 2004; Cogen y Cohen-Cory, 2000; Cohen-Cory y Fraser, 1995). Aunque aún no está confirmado, estos mismos



mecanismos podrían estar influyendo en la competencia durante el desarrollo de las NAfs de la LLP.

En resumen, el modelo de doble silenciamiento de la AEE en las NAfs indica que la formación y eliminación de ramas están reguladas por mecanismos dependientes de la actividad eléctrica y competitivos entre neuronas vecinas, mientras que la extensión y retracción dependen directamente de la AEE, sin ser significativamente influenciadas por la competencia con el entorno. En este contexto, la AEE es esencial para la estabilización del crecimiento axonal.

En pocas palabras (parte 3).

Para responder a las preguntas planteadas al inicio de esta tercera parte, concluimos que el modelo de doble silenciamiento nos permitió obtener conclusiones más sólidas en comparación con los análisis realizados en las primeras dos secciones. todas nuestras evidencias sobre el rol de la AEE en el desarrollo de las proyecciones centrales de las NAfs de la LLP apuntan en la misma dirección: ciertos aspectos del desarrollo de las proyecciones centrales de las NAfs están regulados por mecanismos dependientes de la actividad y la competencia entre neuronas vecinas. Estos parámetros incluyen el área de cobertura del árbol axonal, el número de ramas secundarias, la longitud de las ramas, y las tasas de formación y eliminación de ramas, subrayando la importancia de la interacción neuronal en el desarrollo de los sistemas sensoriales.

En contraste, otros procesos dependen directamente de la AEE y no se ven influenciados por la competencia en el entorno, como las tasas de extensión y retracción de ramas y, muy probablemente, la conectividad sináptica. Esto resalta la importancia de la AEE para la maduración y estabilidad de los árboles axonales en el desarrollo de los sistemas sensoriales.

# CONCLUSIONES

- En el desarrollo de los sistemas sensoriales, algunos procesos que regulan el crecimiento y la maduración de los árboles axonales son dependientes tanto de la AEE como de la competencia neuronal, mientras que otros se regulan exclusivamente por la AEE, sin ser influenciados por el entorno.
- En la LL en desarrollo, la competencia entre neuronas vecinas, mediada por la AEE, regula el crecimiento, la complejidad y la arquitectura de los árboles axonales centrales de las NAfs.
- La AEE, al margen de la competencia neuronal, es esencial para la maduración y estabilidad de los árboles axonales centrales de las NAfs en desarrollo, ya que promueve la conectividad sináptica, lo que disminuye la motilidad de las ramas axonales ya establecidas.

# BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, D., & Ghysen, A. (1999). Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7558–7562. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7558>
- Alsina, B., Vu, T., & Cohen-Cory, S. (2001). Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: Dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/nn735>
- Antonini, A., & Stryker, M. P. (1993). Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science*, 260(5115), 1819–1821.
- Badalà F, Nouri-Mahdavi K, Raoof DA, Leeprechanon N, Law SK, Caprioli J. Optic disk and nerve fiber layer imaging to detect glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2007 Nov;144(5):724-32. doi: 10.1016/j.ajo.2007.07.010. Epub 2007 Sep 14. PMID: 17868631; PMCID: PMC2098694.
- Bleckmann H, Zelick R. Lateral line system of fish. *Integr Zool*. 2009 Mar;4(1):13-25. doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00131.x. PMID: 21392273.
- Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtman JW, Sanes JR. Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature*. 2003 Jul 24;424(6947):430-4. doi: 10.1038/nature01844. PMID: 12879071.
- Burrone, J., O'Byrne, M., & Murthy, V. N. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, 420(6914), 414–418. <https://doi.org/10.1038/nature01242>
- Chang S, De Camilli P. Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat Neurosci*. 2001 Aug;4(8):787-93. doi: 10.1038/90489. PMID: 11477424.
- Chitnis, Ajay B., Damian Dalle Nogare, and Miho Matsuda. 2012. "Building the Posterior Lateral Line System in Zebrafish." *Developmental Neurobiology* 72 (3): 234–55. doi:10.1002/dneu.20962.
- Cogen, J., & Cohen-Cory, S. (2000). Nitric oxide modulates retinal ganglion cell axon arbor remodeling in vivo. *Journal of Neurobiology*, 45(2), 120–133. [https://doi.org/10.1002/1097-4695\(20001105\)45:2<120::aid-neu6>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-4695(20001105)45:2<120::aid-neu6>3.0.co;2-6)
- Cohen-Cory, S., & Fraser, S. E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*, 378(6553), 192–196. <https://doi.org/10.1038/378192a0>
- Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., & Marshak, S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Developmental Neurobiology*, 70(4), 271–288. <https://doi.org/10.1002/dneu.20774>
- Coombs, S. (2001). Smart skins: information processing by lateral line flow sensors. *Autonomous Robots*, 11(3), 255–261.
- Coombs, S., Bleckmann, H., Fay, R., Popper, A. (eds) *The Lateral Line System*. Springer Handbook of Auditory Research, vol 48. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/2506\\_2013\\_14](https://doi.org/10.1007/2506_2013_14)

- Coombs, S., Bleckmann, H., Fay, R. R., & Popper, A. N. (Eds.). (2014). The lateral line system (Vol. 52). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8851-4>
- Dow, Eliot and Jacobo, Adrian and Hossain, Sajjad and Siletti, Kimberly and Hudspeth, Albert J. Connectomics of the zebrafish's lateral-line neuromast reveals wiring and miswiring in a simple microcircuit. doi:10.7554/elife.33988. January 2018.
- Edwards, J. G., Greig, A., Sakata, Y., Elkin, D., & Michel, W. C. (2007). Cholinergic innervation of the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 504(6), 631–645. <https://doi.org/10.1002/cne.21480>
- Erazo-Fischer, E., Striessnig, J., & Taschenberger, H. (2007). The role of physiological afferent nerve activity during in vivo maturation of the calyx of Held synapse. *Journal of Neuroscience*, 27(7), 1725–1737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4116-06.2007>
- Faucherre, A., Pujol-Martí, J., Kawakami, K., & López-Schier, H. (2009). Afferent neurons of the zebrafish lateral line are strict selectors of hair-cell orientation. *PLoS ONE*, 4(2), e4477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004477>
- Fernández-Montoya, J., Avendaño, C., & Negredo, P. (2018). The glutamatergic system in primary somatosensory neurons and its involvement in sensory input-dependent plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 69. <https://doi.org/10.3390/ijms19010069>
- Forsythe ID. Hearing: a fantasia on Kölliker's organ. *Nature*. 2007 Nov 1;450(7166):43-4. doi: 10.1038/450043a. PMID: 17972872.
- Fredj, N., Hammond, S., Otsuna, H., Chien, C. Bin, Burrone, J., & Meyer, M. P. (2010). Synaptic activity and activity-dependent competition regulates axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10939–10951. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1556-10.2010>
- Friauf E, Lohmann C. Development of auditory brainstem circuitry. Activity-dependent and activity-independent processes. *Cell Tissue Res*. 1999 Aug;297(2):187-95. doi: 10.1007/s004410051346. PMID: 10470488.
- Galli, L., & Maffei, L. (1988). Spontaneous Impulse Activity of Rat Retinal Ganglion Cells in Prenatal Life. *Science*. <https://doi.org/3175637>
- Gan WB. Glutamate-dependent stabilization of presynaptic terminals. *Neuron*. 2003 Jun 5;38(5):677-8. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00333-7. PMID: 12797951.
- Ghysen, A., & Dambly-Chaudière, C. (2007). The lateral line microcosmos. *Genes and Development*, 21(17), 2118–2130. <https://doi.org/10.1101/gad.1568407>
- Glueckert, R., Wietzorrek, G., Kammen-Jolly, K., Scholtz, A., Stephan, K., Striessnig, J., & Schrott-Fischer, A. (2003). Role of class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels for cochlear morphology. *Hearing Research*, 178(1–2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00054-6)
- Gnuegge L, Schmid S, Neuhauss SC. Analysis of the activity-deprived zebrafish mutant macho reveals an essential requirement of neuronal activity for the development of a fine-grained visuotopic map. *J Neurosci*. 2001 May 15;21(10):3542-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-10-03542.2001. PMID: 11331383; PMCID: PMC6762499.
- Gomez, T. M., & Zheng, J. Q. (2006). The molecular basis for calcium-dependent axon

- pathfinding. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2), 115–125.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1844>
- Gomez, T. M., Robles, E., Poo, M., & Spitzer, N. C. (2001). Filopodial Calcium Transients Promote Substrate-Dependent Growth Cone Turning. *Science*, 291(5510), 1983–1987.  
<https://doi.org/10.1126/science.1056493>
- Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudiere, C., and Ghysen, A. (2001) Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mechanisms of Development*. 105(1-2):69-77.
- Haehnel-Taguchi, M., Akanyeti, O., & Liao, J.C. (2014). Afferent and motoneuron activity in response to single neuromast stimulation in the posterior lateral line of larval zebrafish. *Journal of Neurophysiology*, 112(6), 1329–1339. <https://doi.org/10.1152/jn.00386.2014>
- Hanson MG, Landmesser LT. Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron*. 2004 Sep 2;43(5):687-701. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.018. PMID: 15339650.
- Hines JH, Ravanelli AM, Schwindt R, Scott EK, Appel B. Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat Neurosci*. 2015 May;18(5):683-9. doi: 10.1038/nn.3992. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25849987; PMCID: PMC4414883.
- Hua, J. Y., & Smith, S. J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature Neuroscience*, 7(4), 327–332. <https://doi.org/10.1038/nn1218>
- Hua, J. Y., Smear, M. C., Baier, H., & Smith, S. J. (2005). Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature*, 434(7036), 1022–1026.  
<https://doi.org/10.1038/nature03412>
- Huberman AD, Manu M, Koch SM, Susman MW, Lutz AB, Ullian EM, Baccus SA, Barres BA. Architecture and activity-mediated refinement of axonal projections from a mosaic of genetically identified retinal ganglion cells. *Neuron*. 2008 Aug 14;59(3):425-38. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.018. PMID: 18701068; PMCID: PMC8532044.
- Jones TA, Leake PA, Snyder RL, Stakhovskaya O, Bonham B. Spontaneous discharge patterns in cochlear spiral ganglion cells before the onset of hearing in cats. *J Neurophysiol*. 2007 Oct;98(4):1898-908. doi: 10.1152/jn.00472.2007. Epub 2007 Aug 8. PMID: 17686914; PMCID: PMC2234389.
- Kalil, K., & Dent, E. W. (2014). Branch management: Mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(1), 7–18.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3650>
- Kandler K. Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr Opin Neurobiol*. 2004 Feb;14(1):96-104. doi: 10.1016/j.conb.2004.01.017. PMID: 15018944.
- Kandler, K., Clause, A., & Noh, J. (2009). Tonotopic reorganization of developing auditory circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(10), 669–677. <https://doi.org/10.1038/nrn2701>
- Karlsson, J., Von Hofsten, J., & Olsson, P. E. (2001). Generating transparent zebrafish: A refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Marine Biotechnology*, 3(6), 522–527. <https://doi.org/10.1007/s1012601-0053-4>
- Kerschensteiner D, Morgan JL, Parker ED, Lewis RM, Wong RO. Neurotransmission

- selectively regulates synapse formation in parallel circuits in vivo. *Nature*. 2009 Aug 20;460(7258):1016-20. doi: 10.1038/nature08236. PMID: 19693082; PMCID: PMC2746695.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben-Ari Y, Buzsáki G. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*. 2004 Dec 9;432(7018):758-61. doi: 10.1038/nature03132. PMID: 15592414.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995 Jul;203(3):253-310. doi: 10.1002/aja.1002030302. PMID: 8589427.
- Kindt KS, Finch G, Nicolson T. Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Dev Cell*. 2012 Aug 14;23(2):329-41. doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.022. PMID: 22898777; PMCID: PMC3426295.
- Kindt KS, Finch G, Nicolson T. Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Dev Cell*. 2012 Aug 14;23(2):329-41. doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.022. PMID: 22898777; PMCID: PMC3426295.
- Kirkby, L. A., Sack, G. S., Firl, A., & Feller, M. B. (2013). A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron*, 80(5), 1129-1144. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.030>
- Leake PA, Hradek GT, Chair L, Snyder RL. Neonatal deafness results in degraded topographic specificity of auditory nerve projections to the cochlear nucleus in cats. *J Comp Neurol*. 2006 Jul 1;497(1):13-31. doi: 10.1002/cne.20968. PMID: 16680765; PMCID: PMC2430266.
- Li, V. J., Schohl, A., & Ruthazer, E. S. (2022). Topographic map formation and the effects of NMDA receptor blockade in the developing visual system. *Neuroscience*, DOI: 10.1073/pnas.2107899119
- Liao, J. C. (2010). Organization and physiology of posterior lateral line afferent neurons in larval zebrafish. *Biology Letters*, 6(3), 402–405. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0995>
- Lippe WR. Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci*. 1994 Mar;14(3 Pt 2):1486-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-03-01486.1994. PMID: 8126550; PMCID: PMC6577532.
- López-Schier, H., & Hudspeth, A. J. (2006). A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18615–18620. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608536103>
- Lozano-Ortega, M., Valera, G., Xiao, Y., Faucherre, A., & López-Schier, H. (2018). Hair cell identity establishes labeled lines of directional mechanosensation. *PLoS Biology*, 16(3), e2004404. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004404>
- Mattson, M. P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1144(1), 97–112. <https://doi.org/10.1196/annals.1418.005>
- McHenry MJ, Feitl KE, Strother JA, Van Trump WJ. Larval zebrafish rapidly sense the water flow of a predator's strike. *Biol Lett*. 2009 Aug 23;5(4):477-9. doi: 10.1098/rsbl.2009.0048.

- Epub 2009 Mar 25. PMID: 19324627; PMCID: PMC2781903.
- McKay SM, Oleskevich S. The role of spontaneous activity in development of the endbulb of Held synapse. *Hear Res.* 2007 Aug;230(1-2):53-63. doi: 10.1016/j.heares.2007.05.006. Epub 2007 May 24. PMID: 17590547.
- McKinney, W. (2010) Data Structures for Statistical Computing in Python. Proceedings of the 9th Python in Science Conference, Austin, 28 June-3 July 2010, 56-61. doi: 10.25080/Majora-92bf1922-00a.
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.-C.F., Steiner, P., Hirling, H. and Unser, M. (2004), Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry*, 58A: 167-176. doi: 10.1002/cyto.a.20022.
- Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science.* 1991 May 17; 252(5008):939-43. doi: 10.1126/science.2035024. PMID: 2035024.
- Metcalf WK. Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol.* 1985 Aug 8;238(2):218-24. doi: 10.1002/cne.902380208. PMID: 4044912.
- Metcalf WK, Kimmel CB, Schabtach E. Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J Comp Neurol.* 1985 Mar 15;233(3):377-89. doi: 10.1002/cne.902330307. PMID: 3980776.
- Meyer, M. P., & Smith, S. J. (2006). Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 26(13), 3604–3614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0223-06.2006>
- Meyer, M. P., & Smith, S. J. (2004). In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nature Neuroscience*, 7(3), 254–260. <https://doi.org/10.1038/nn1191>
- Montgomery, J., Carton, G., Voigt, R., Baker, C., & Diebel, C. (2000). Sensory processing of water currents by fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1401), 1325–1327. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0693>
- Mostafapour SP, Cochran SL, Del Puerto NM, Rubel EW. Patterns of cell death in mouse anteroventral cochlear nucleus neurons after unilateral cochlea removal. *J Comp Neurol.* 2000 Oct 30;426(4):561-71. doi: 10.1002/1096-9861(20001030)426:4<561::aid-cne5>3.0.co;2-g. PMID: 11027399.
- Motulsky, H. J., & Brown, R. E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - A new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>
- Nagiel, A., Andor-Ardó, D., & Hudspeth, A. J. (2008). Specificity of afferent synapses onto plane-polarized hair cells in the posterior lateral line of the zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8442–8453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2425-08.2008>
- Nicolson T. The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu Rev Genet.* 2005;39:9-22. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.105049. PMID: 16285850.
- Niell, C. M., Meyer, M. P., & Smith, S. J. (2004). In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nature Neuroscience*, 7(3), 254–260. <https://doi.org/10.1038/nn1191>



- Nikolaou, N., & Meyer, M. P. (2012). Imaging circuit formation in zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 346–357. <https://doi.org/10.1002/dneu.20874>
- Pasquale, E. B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, 133(1), 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.011>
- Pineau, J., & Lacroix, S. (2007). Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia*, 55(4), 360–372. <https://doi.org/10.1002/glia.20474>
- Plazas, P. V., Nicol, X., & Spitzer, N. C. (2013). Activity-dependent competition regulates motor neuron axon pathfinding via PlexinA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1524–1529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213048110>
- Plazas, P. V., & Elgoyhen, A. B. (2021). The cholinergic lateral line efferent synapse: structural, functional and molecular similarities with those of the cochlea. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.765083>
- Pujol-Martí, J., Zecca, A., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Lopez-Schier, H. (2012). Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. *J. Neurosci.* 32, 2976–2987.
- Pujol-Martí, J., & López-Schier, H. (2013). Developmental and architectural principles of the lateral-line neural map. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00047>
- Raible DW, Kruse GJ. Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *J Comp Neurol.* 2000 May 29;421(2):189-98. PMID: 10813781.
- Redolfi, N., & Lodovichi, C. (2021). Spontaneous Afferent Activity Carves Olfactory Circuits. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.637536>
- Regehr WG, Carey MR, Best AR. Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron.* 2009 Jul 30;63(2):154-70. doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.021. PMID: 19640475; PMCID: PMC3251517.
- Rossel, Mireille, Christine Dambly-chaudie, and Alain Ghysen. 2005. “Role of SDF1 Chemokine in the Development of Lateral Line Efferent and Facial Motor Neurons,” no. Track II: 2–6.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Ruthazer, E. S., Akerman, C. J., & Cline, H. T. (2003). Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. *Science*, 301(5629), 66–70. <https://doi.org/10.1126/science.1082588>
- Ruthazer, E. S., Li, J., & Cline, H. T. (2006). Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *Journal of Neuroscience*, 26(7), 1857–1866. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4310-05.2006>
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature.* 1988 Oct 6;335(6190):563-4. doi: 10.1038/335563a0.



PMID: 3047590.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt JT, Fleming MR, Leu B. Presynaptic protein kinase C controls maturation and branch dynamics of developing retinotectal arbors: possible role in activity-driven sharpening. *J Neurobiol.* 2004 Feb 15;58(3):328-40. doi: 10.1002/neu.10286. PMID: 14750146.
- Schmitz, Y., Luccarelli, J., Kim, M., Wang, M., & Sulzer, D. (2009). Glutamate controls growth rate and branching of dopaminergic axons. *Journal of Neuroscience*, 29(38), 11973–11981. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2927-09.2009>
- Schatz, C. J. & Stryker, M. P. Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J. Physiol. (Lond.)* 281, 267–283 (1978).
- Sonntag, M., Englitz, B., Kopp-Scheinpflug, C., & Rübsamen, R. (2009). Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: An in vivo study in mice. *Journal of Neuroscience*, 29(30), 9510–9520. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1377-09.2009>
- Florentina Soto, Xiaofeng Ma, Jacob L. Cecil, Bradly Q. Vo, Susan M. Culican, Daniel Kerschensteiner. *Journal of Neuroscience* 18 April 2012, 32 (16) 5426-5439; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0194-12.2012
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120), 707–712. <https://doi.org/10.1038/nature05300>
- Stryker, M. P. & Harris, W. A. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 6, 2117–2133 (1986).
- Tesis doctoral de Salatino, L. (2024).
- Torborg, C. L., & Feller, M. B. (2005). Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 76, Issue 4, pp. 213–235). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.002>
- Trapani, J.G., and Nicolson, T. (2010). Physiological recordings from zebrafish lateral-line hair cells and afferent neurons. *Methods Cell Biol.* 100, 219–231.
- Trapani, J. G., & Nicolson, T. (2011). Mechanism of spontaneous activity in afferent neurons of the zebrafish lateral-line organ. *Journal of Neuroscience*, 31(5), 1614–1623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3369-10.2011>
- Tritsch, N. X., Yi, E., Gale, J. E., Glowatzki, E., & Bergles, D. E. (2007). The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature*, 450(7166), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature06233>
- Valera G, Markov DA, Bijari K, Randlett O, Asgharsharghi A, Baudoin JP, Ascoli GA, Portugues R, López-Schier H. A neuronal blueprint for directional mechanosensation in larval zebrafish. *Curr Biol.* 2021 Apr 12;31(7):1463-1475.e6. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.045. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33545047; PMCID: PMC8044000.

- Van Der Walt, S., Colbert, S. C., & Varoquaux, G. (2011). The NumPy array: a structure for efficient numerical computation. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2011.37>
- Van Netten, S.M., McHenry, M.J. (2013). The Biophysics of the Fish Lateral Line. In: Coombs, S., Bleckmann, H., Fay, R., Popper, A. (eds) *The Lateral Line System*. Springer Handbook of Auditory Research, vol 48. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/2506\\_2013\\_14](https://doi.org/10.1007/2506_2013_14)
- Van Netten, S., and McHenry, M.J. (2014). The Biophysics of the Fish Lateral Line. In *The Lateral Line: Springer Handbook of Auditory Research*, Vol.
- Vislay-Meltzer RL, Kampff AR, Engert F. Spatiotemporal specificity of neuronal activity directs the modification of receptive fields in the developing retinotectal system. *Neuron*. 2006 Apr 6;50(1):101-14. doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.016. PMID: 16600859.
- Westerfield, M. (2000) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene.
- Whitfield, T.T. (2002), Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J. Neurobiol.*, 53: 157-171. <https://doi.org/10.1002/neu.10123>
- Yu CR, Power J, Barnea G, O'Donnell S, Brown HE, Osborne J, Axel R, Gogos JA. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*. 2004 May 27;42(4):553-66. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00224-7. PMID: 15157418.
- Zhang LI, Tao HW, Holt CE, Harris WA, Poo M. A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature*. 1998 Sep 3;395(6697):37-44. doi: 10.1038/25665. PMID: 9738497.
- Zhang LI, Tao HW, Poo M. Visual input induces long-term potentiation of developing retinotectal synapses. *Nat Neurosci*. 2000 Jul;3(7):708-15. doi: 10.1038/76665. PMID: 10862704.
- Zhao H, Reed RR. X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell*. 2001 Mar 9;104(5):651-60. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00262-8. PMID: 11257220.
- Zhang LI, Poo MM. Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci*. 2001 Nov;4 Suppl:1207-14. doi: 10.1038/nn753. PMID: 11687831.