

Tesis Doctoral

Caracterización de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo

Zorrilla de San Martín, Javier

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zorrilla de San Martín, Javier. (2012). Caracterización de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zorrilla de San Martín, Javier. "Caracterización de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Caracterización de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente
olivococlear durante el desarrollo”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Autor: **Lic. Javier Zorrilla de San Martín**

Director de Tesis: **Dra. Eleonora Katz**

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, Marzo 2012

Resumen

Título: “Caracterización de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo”

En el órgano de Corti, el epitelio sensorial del sistema auditivo de los mamíferos, las células ciliadas internas (CCIs) transducen los estímulos sonoros a señales eléctricas que son enviadas al sistema nervioso central, mientras que las células ciliadas externas (CCEs) participan del proceso de amplificación y sintonización fina de estos estímulos. Durante el desarrollo, las CCIs presentan actividad espontánea, la cual promueve la liberación de glutamato en la sinapsis entre las CCIs y las dendritas de las neuronas aferentes que forman el nervio auditivo. La actividad espontánea en el sistema auditivo en desarrollo es fundamental tanto para la supervivencia neuronal como para el refinamiento y mantenimiento de los mapas tonotópicos en el cerebro. Desde el nacimiento hasta el comienzo de la audición (postnatal 12-13 en ratones), las CCIs reciben una inervación eferente axo-somática transitoria desde la oliva superior en el tallo cerebral, la cual se postula estaría modulando la actividad espontánea de las CCIs en este período del desarrollo. La sinapsis entre las fibras eferentes mediales olivococleares (MOC) y las células ciliadas es colinérgica, rápida e inhibitoria y está mediada por la activación conjunta del receptor colinérgico nicotínico (nAChR) $\alpha 9\alpha 10$ y el canal de potasio activado por calcio SK2. En trabajos previos, se han caracterizado extensamente los cambios que ocurren en la expresión y función del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y su acople con el canal SK2, en el corto período en el cual la sinapsis MOC-CCIs es funcional. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre las propiedades de liberación del neurotransmisor y los cambios que ocurren en la presinapsis durante este período. El principal objetivo de esta tesis fue caracterizar las propiedades biofísicas y funcionales de la sinapsis transitoria MOC-CCI durante el desarrollo postnatal previo al comienzo de la audición. Para esto se realizaron registros electrofisiológicos en el modo “*whole-cell*” en las CCIs presentes en preparaciones del órgano de Corti del ratón, aisladas en forma aguda, en dos períodos postnatales, mientras se estimulaban eléctricamente los axones eferentes para provocar la liberación del neurotransmisor. Los resultados de este trabajo de investigación muestran que la eficacia sináptica aumenta significativamente entre los días postnatales (P) 5-7 y 9-11. Este fenómeno está acompañado por cambios en el tipo de plasticidad de corto término, en los tipos de canales de Ca^{2+} que median y/o modulan la liberación del

neurotransmisor y también por un cambio en la cantidad de vesículas sinápticas disponibles para ser liberadas, sin modificaciones en la probabilidad de liberación de cada sitio activo.

Palabras clave: cóclea, células ciliadas, plasticidad de corto término, inervación eferente olivococlear.

Abstract

Title: "Characterization of transmitter release at the medial olivocochlear synapse during development"

In the organ of Corti, the sensory epithelium of the mammalian auditory system, inner hair cells (IHCs) transduce sound stimuli into electrical signals which are conveyed to the central nervous system, while outer hair cells (OHCs) participate in the amplification and fine tuning of sounds. During development, the IHCs present spontaneous activity which promotes the release of glutamate at the synapse between the IHCs and the afferent dendrites of the neurones that make up the auditory nerve. Spontaneous activity in the auditory system is fundamental both for neuronal survival as well as for the refinement and maintenance of tonotopic maps in the brain. Since birth until the onset of hearing (postnatal day (P) 12-13 in mice), the IHCs receive a transient axo-somatic innervation from the superior olive in the brain stem, which is postulated to modulate IHC spontaneous activity during this developmental period. The synapse between the medial olivocochlear (MOC) fibers and the IHCs is cholinergic, fast and inhibitory and is mediated by the combined activation of the $\alpha 9\alpha 10$ cholinergic nicotinic receptor (nAChR) and the SK2 calcium-activated potassium channel. In previous work, the changes that occur in the expression and function of the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR and its coupling to the SK2 channel have been extensively characterized during the short period at which this synapse is functional. However, little is known about the properties of transmitter release and the changes that take place at the presynaptic level during this period. The main goal of this Thesis work was to characterize the biophysical and functional properties of the transient MOC-IHC synapse during postnatal development prior to the onset of hearing. For this purpose, electrophysiological recordings in the whole-cell mode were performed in IHCs, present in acutely isolated organs of Corti from mice at two postnatal ages, while the MOC efferent axons were electrically stimulated to promote the release of transmitter. The results of this work show that the efficacy of the MOC-IHC synapse significantly increases from P5-7 to P9-11. This is accompanied by changes in the pattern of short term synaptic plasticity, in the types of calcium channels that support and/or mediate neurotransmitter release as well as in the number of synaptic vesicles ready to be released, without modifications in the release probability of each active site.

Keywords: Cochlea, Hair Cells, Short Term Plasticity, Olivocochlear innervation.

Este trabajo fue íntegramente realizado en el Laboratorio de Neurobiología, dirigido por la Dra. Ana Belén Elgoyhen, en el Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Agradecimientos

A las autoridades del Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber hecho posible la realización de esta tesis garantizando la financiación e infraestructura necesarias.

A la Dra. Belén Elgoyhen por abrir las puertas de su laboratorio, a mí como a tantos otros jóvenes con vocación por la investigación científica.

Agradezco especialmente la dedicación de mi directora de tesis que, en todo momento, mostró un enorme compromiso con el desarrollo de este trabajo y con mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio que me han acompañado durante estos años haciendo de este grupo un excelente ámbito de trabajo.

Al personal de apoyo del INGENI que incondicionalmente garantiza las condiciones necesarias para desarrollar la tarea científica.

A mi mamá, a mi papá y a mis hermanos. A mi familia y amigos.

A Marianela.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	3
Agradecimientos	5
Índice	7
Lista de abreviaturas	12
1. Introducción	14
1.1 El sistema auditivo de los mamíferos.....	15
1.1.1 Características generales.....	15
1.1.2 Transducción auditiva	15
1.2 Innervación del Órgano de Corti	20
1.2.1 Innervación aferente: codificación de estructura temporal e intensidad	20
1.2.2 Inervación Eferente: Control de la actividad del oído.....	21
1.2.3 Inervación eferente a las CCEs: control del amplificador coclear	21
1.2.4 Función del sistema MOC en la audición	23
1.2.5 La sinapsis eferente a las CCEs	24
1.2.6 El sistema eferente antes del comienzo de la audición	25
1.2.7 Actividad eléctrica durante el desarrollo del sistema auditivo.....	26
1.2.8 Función del sistema MOC en el desarrollo.....	27
1.3 Transmisión sináptica.....	28
1.3.1 Estudios fundacionales sobre transmisión sináptica	28
1.3.2 Naturaleza cuántica de la liberación del neurotransmisor	29
1.3.3 Participación del Ca ²⁺ en el proceso de neurotransmisión	30

1.4	Canales iónicos que participan del proceso de transmisión sináptica.....	31
1.4.1	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	31
1.4.2	Estructura molecular de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	33
1.4.3	Compartimentalización de las funciones del Ca^{2+}	36
1.4.4	Corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} y voltaje	36
1.5	Plasticidad de corto término	38
1.5.1	Depresión de corto término	38
1.5.2	Facilitación.....	39
1.5.3	Pooles de vesículas sinápticas	40
2	Objetivos	42
2.1	Objetivo General:	42
2.1	Objetivos Particulares:	42
3	Métodos	43
3.1	Disección del órgano de Corti	44
3.2	Soluciones	44
3.3	Registros electrofisiológicos en las células ciliadas.....	45
3.4	Estimulación eléctrica de los axones eferentes MOC	46
3.5	Estimación del contenido cuántico	47
3.6	Evaluación del efecto de drogas y toxinas sobre el contenido cuántico.	48
3.7	Drogas y Toxinas.....	49
4	Resultados	50
4.1	Caracterización de la transmisión sináptica entre las fibras eferentes del sistema medial olivococlear (MOC) y las células ciliadas internas (CCI) durante el desarrollo postnatal	51
4.1.1	Respuestas sinápticas evocadas por estimulación eléctrica	51

4.1.2	Respuestas sinápticas espontáneas	54
4.1.3	Análisis del contenido cuántico (m) durante el desarrollo postnatal	56
4.1.4	Sensibilidad de la liberación del neurotransmisor a los cambios en la concentración extracelular de $[Ca^{2+}]_e$ durante el desarrollo postnatal	58
4.2	Plasticidad de Corto Término en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo	61
4.2.1	Comparación de la STP en P5-7 y P9-11.....	61
4.2.2	STP en la sinapsis eferente transitoria a las CCIs en ratas	66
4.2.3	Relación entre el contenido cuántico y el tipo de plasticidad de corto término	66
4.2.4	Dependencia de la STP con el contenido cuántico inicial.	69
4.2.5	Estimación del tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas.....	70
4.2.6	Tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas durante el desarrollo.....	71
4.2.7	Estimación de la probabilidad de liberación de cada sitio activo	73
4.3	Canales de iónicos que sostienen y/o modulan la liberación del neurotransmisor	75
4.3.1	Canales de Ca^{2+} que median la liberación del neurotransmisor en P9-11	75
4.3.2	Los canales de Ca^{2+} del tipo L modulan negativamente la neurotransmisión en P9-11	79
4.3.3	Los canales de K^+ del tipo BK también modulan negativamente la cantidad de neurotransmisor liberado en la sinapsis eferente transitoria MOC-CCI.....	83
4.3.4	Los CCDVs del tipo L están acoplados funcionalmente a los canales BK en la sinapsis MOC-CCI	84
4.3.5	Canales de Ca^{2+} que median la liberación del neurotransmisor en el período P5-7. 87	
4.3.6	Canales de Ca^{2+} del tipo L en el período P5-7	90
4.3.7	Modulación de la liberación de ACh por canales de K^+ del tipo BK	94
4.4	Relación entre la STP y los canales que median y/o modulan la liberación del neurotransmisor.....	96

4.4.1	Relación entre la STP y el contenido cuántico	96
4.5	Rol de la α -sinucleína (α -sin) en la transmisión sináptica	99
4.5.1	Corrientes sinápticas espontáneas.....	100
4.5.2	Corrientes sinápticas evocadas y contenido cuántico	101
4.5.3	Plasticidad de Corto Término	102
5	Discusión	104
5.1	La eficiencia de liberación de ACh aumenta durante el desarrollo postnatal	106
5.2	La plasticidad de corto término (STP) cambia de facilitación a depresión entre P5-7 y P9-11	107
5.3	La relación entre la $[Ca^{2+}]_e$ y el m no se ve modificada	109
5.4	El tamaño del RRP se duplica durante el desarrollo postnatal	109
5.5	La probabilidad de liberación de cada sitio activo se mantiene constante	110
5.6	CCDVs que sostienen la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI	111
5.6.1	La liberación en P9-11 es sostenida por los CCDVs del tipo N y P/Q	111
5.6.2	En P5-7 la neurotransmisión es parcialmente sostenida por los CCDVs del tipo P/Q y, probablemente, también por los del tipo L.....	112
5.7	Modulación de la liberación de ACh por acción de los CCDVs del tipo L y los canales de K^+ del tipo BK	113
5.7.1	Acople funcional de los CCDVs del tipo L y los canales de K^+ del tipo BK en P9-11	113
5.7.2	Funcionalidad de los canales L y BK en P5-7	114
5.8	Cambios en la función de los CCDVs del tipo L	115
5.9	Relación entre el cambio en la STP y los CCDVs que sostienen la liberación de ACh	117
5.10	La falta de α -sinucleína no afecta la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI de ratones P9-11	117
5.11	Función moduladora de la inervación eferente transitoria a las CCI	118

6	Conclusiones Generales	121
7	Referencias.....	123

Lista de abreviaturas

A: amperios

ACh: acetilcolina

ADN: ácido deoxirribonucleico

BAPTA: ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N', -tetraacético

BK: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia grande

Ca²⁺: ion calcio

CCDV: canales de calcio activados por voltaje

CCs: células ciliadas

CCEs: células ciliadas externas

CCIs: células ciliadas internas

Cm: capacitancia de la membrana

DHP: Dihidropiridina

E_{rev}: potencial de reversión

EGTA: ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético

fX: femto (X *10⁻¹⁵)

I: corriente

IbTx : iberiotoxina

IPSCs : corrientes sinápticas inhibitorias (prefijo e: evocadas; s: espontáneas)

I-V: corriente en función del potencial

Hz: hertz

K⁺: ion potasio

KO: 'knock out' mutante nulo

l : litro

m: contenido cuántico

m: metro

M: molar (moles/litro)

μX : micro (X *10⁻⁶)

mX: mili ($X \cdot 10^{-3}$)

MX: mega ($X \cdot 10^6$)

min: minutos

Mg^{2+} = ion magnesio

MOC: medial olivococlear

nX: nano ($X \cdot 10^{-9}$)

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

Ω : ohm

P: probabilidad

PX: X días postnatal

pX: pico ($X \cdot 10^{-12}$)

s: segundos

S.E.M.: error estándar de la media

S.D.: desvío estándar

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña

SNC: sistema nervioso central

T: temperatura

TTX : tetrodotoxina

V: voltaje

V_m : potencial de membrana

$V_{sostén}$ ó V_s : potencial de sostén

1. Introducción

1.1 El sistema auditivo de los mamíferos

1.1.1 Características generales

El sistema auditivo es capaz de extraer información de las ondas sonoras basándose en su intensidad, sus frecuencias componentes y su estructura temporal. Los mamíferos son capaces de detectar el rango de frecuencias más amplio entre los diferentes grupos animales (un rango típico en mamíferos es de 10 octavas) y su capacidad para diferenciar entre frecuencias es de los más precisos (el oído humano puede detectar diferencias menores al 0.2%). Asimismo, el oído de los mamíferos es capaz de percibir sonidos muy leves, cuya energía está en el orden del ruido térmico al que están expuestos los receptores, y también puede discriminar sonidos de gran intensidad, es decir, posee un amplio rango dinámico (Dallos et al., 1996). A partir de este universo de estímulos el sistema nervioso es capaz de desempeñar funciones como la percepción del habla o la localización espacial de las fuentes sonoras.

1.1.2 Transducción auditiva

El fenómeno de la audición comienza con la conversión de las oscilaciones de presión en el aire en oscilaciones de fluido que puedan ser percibidas por los receptores que se encuentran en el epitelio sensorial. En los mamíferos, las ondas sonoras impactan sobre la membrana timpánica que transmite la fuerza recibida a los tres huesecillos del oído medio (martillo, estribo y yunque) encargados de transmitir el movimiento de esta membrana a una segunda membrana, ubicada en la ventana oval, que conecta con los fluidos del oído interno donde se encuentran el sistema auditivo y el vestibular (Figura 1 A).

La cóclea, el órgano auditivo del oído interno (Figura 1 A), es una estructura ósea cerrada en forma de caracol que posee tres compartimentos llenos de fluido: la escala vestibular, la escala timpánica y la escala media (Figura 1 B y C). La escala timpánica y vestibular se conectan en el extremo apical de la cóclea y se encuentran llenos de una solución cuya composición es similar al medio extracelular normal denominada "*perilinfa*". La escala media se encuentra aislada y posee una solución rica en potasio (157 mM) llamada "*endolinfa*". Dada la composición iónica de la endolinfa, ésta presenta una diferencia de potencial de +80 mV respecto al resto de las escalas. A este

potencial se lo conoce como "*potencial endococlear*". La escala timpánica y la escala media se encuentran separadas por la *membrana basilar*, sobre la cual se encuentra emplazado el *órgano de Corti*.

El *órgano de Corti*, el epitelio sensorial del sistema auditivo, posee células mecanosensoriales: las células ciliadas. Las células ciliadas poseen su zona basal apoyada sobre células de soporte que a su vez se apoyan sobre la membrana basilar, mientras que su extremo apical se encuentra expuesto hacia la escala media, inmerso en la endolinfa (Figura 1 C y F). Las células ciliadas poseen en la zona apical un haz de prolongaciones que, contrario a lo que indica su nombre, no son verdaderos cilios sino que están formadas por filamentos de actina, y son llamadas "*estereocilios*" (Figura 2). Los estereocilios se encuentran unidos entre sí por diversos complejos proteicos, el más apical de los cuales se denomina "*Tip Link*" (Vollrath et al., 2007). Recostada sobre los estereocilios se encuentra una membrana acelular llamada *membrana tectorial* (Figura 1 F). La ventana oval conecta directamente con la escala timpánica (Figura 1 D). Las ondas de presión generadas en el fluido de la escala timpánica por el movimiento de la ventana oval son convertidas en una onda de movimiento transversal que se desplaza a lo largo de la membrana basilar (Figura 1 F). El fenómeno de propagación de las ondas de presión a lo largo de la cóclea fue descrito por primera vez usando fotografía estroboscópica en preparaciones de cóclea hechas a partir de cadáveres humanos y de gatos (Von Bekesy, 1956b, a). Con este método, Von Bekesy, no solo midió directamente las ondas sino que también mostró que las ondas de diferente frecuencia tienen regiones de máxima resonancia dentro de la cóclea (von Bekesy, 1956a).

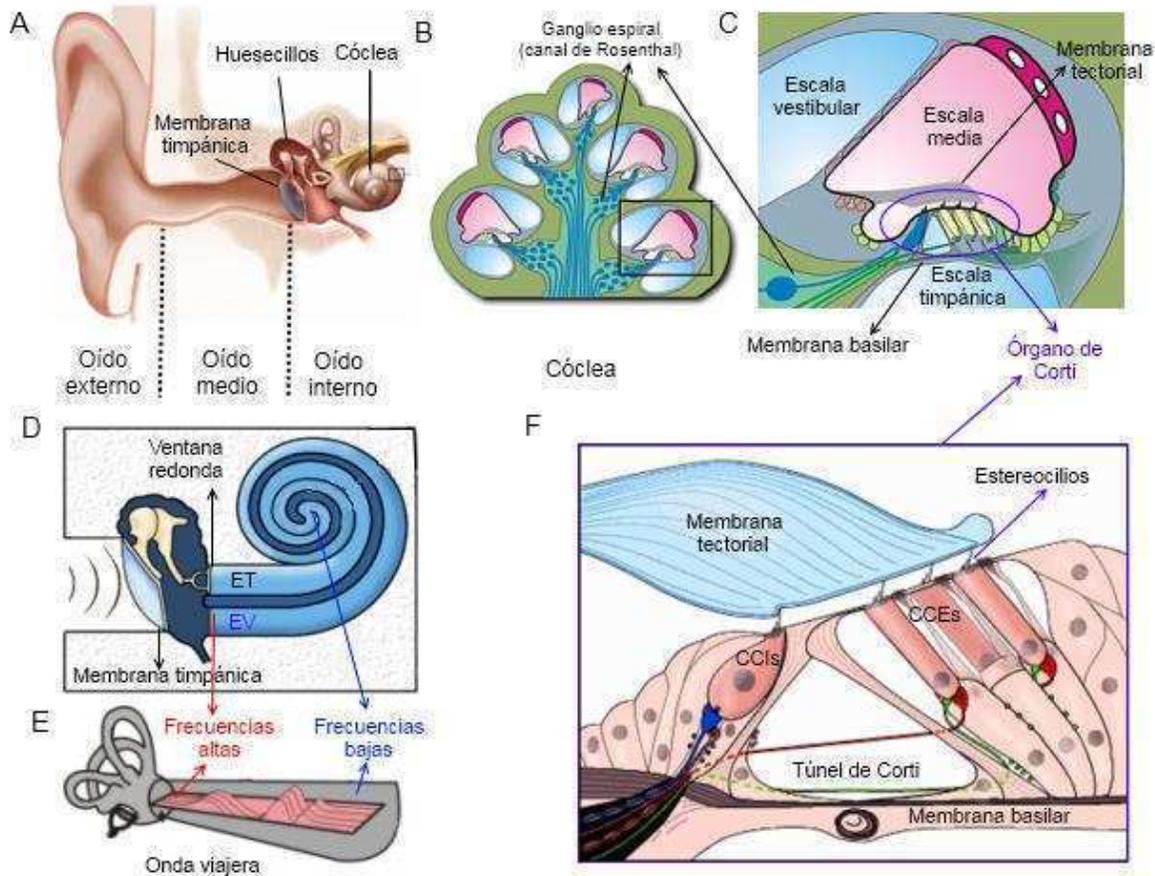


Figura 1: Estructura anatómica del oído. En A se observa la estructura general del oído compuesto por el oído externo, medio e interno. El sonido ingresa por el oído externo, impacta en la membrana timpánica y este movimiento es transmitido por los huesecillos del oído medio hacia la cóclea en el oído interno. En B y C se muestra un corte transversal de la cóclea en el que pueden observarse los tres compartimentos cocleares y la localización del órgano de Corti. En D se esquematiza la transmisión del estímulo sonoro entre el oído medio y el oído interno a través de la ventana oval. En E se muestra cómo el movimiento transmitido por los huesecillos a la ventana o se transforma en la onda viajera de la membrana basilar. En D y E se indica la zona de la membrana basilar donde se decodifican las frecuencias altas y las bajas. F, detalle de la estructura del órgano de Corti. En el mismo se pueden observar las células ciliadas internas (CCIs), los fonoreceptores propiamente dichos, y las células ciliadas externas, los amplificadores.

El movimiento de la membrana basilar produce una deflexión de los haces de estereocilios que resulta en la apertura de canales mecanotransductores ubicados en los mismos. Se propone que la tensión generada en el "Tip link" es el responsable de producir la apertura del mecanotransductor

(Vollrath et al., 2007) (Figura 1). Si bien la identidad molecular de los canales mecanotransductores es aún desconocida, se ha comprobado que se trata de un canal catiónico inespecífico de alta conductancia (~ 100 pS), muy permeable al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 5$) y cuya velocidad de apertura es la más rápida medida en un canal iónico (constante de activación < 10 μs en mamíferos a 37°C (Vollrath et al., 2007). Debido a la composición de la endolinfa, la apertura de los canales mecanotransductores produce una entrada masiva de K^+ que genera una rápida despolarización en las células ciliadas (Ohmori, 1985; Crawford et al., 1989, 1991; Ricci, 2002; Beurg et al., 2006; Fettiplace, 2009).

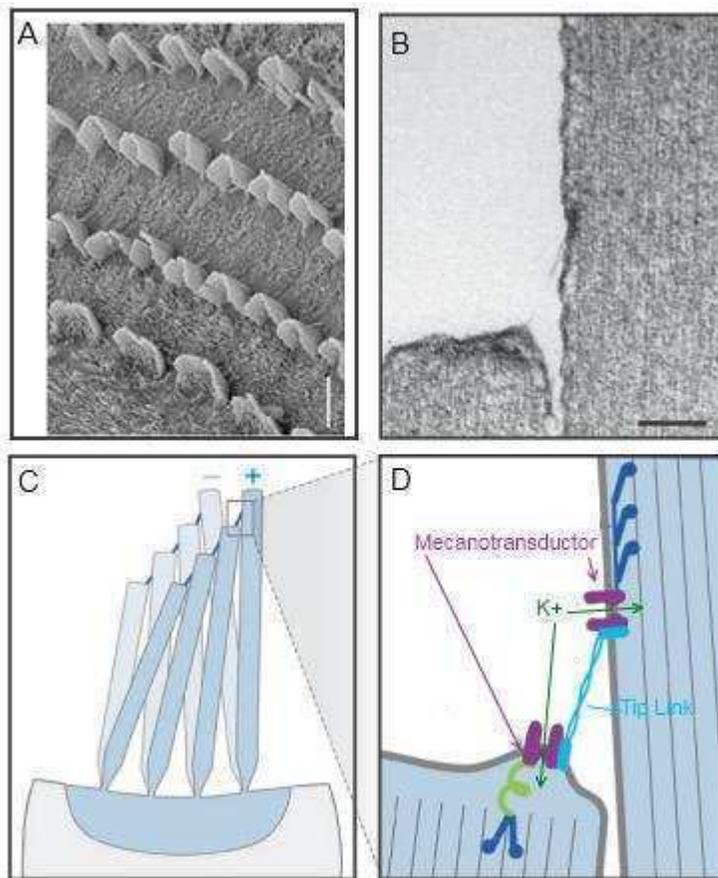


Figura 2: El mecanotransductor. A, microscopía electrónica mostrando los haces de estereocilios de las CCIs (1 hilera, abajo hacia la izquierda) y los de las CCEs (3 hileras). En B se muestra una ampliación de dos estereocilios unidos por el *tip link* (escala = $0.1 \mu\text{M}$). En C se muestra un esquema del movimiento de los estereocilios durante la transducción del sonido. En D se muestra un modelo esquemático de las moléculas involucradas en la transducción sonora. Durante el movimiento de los estereocilios, aumenta la tensión en el *tip link* lo que promueve la apertura de los canales mecanotransductores permitiendo el ingreso de

potasio desde la endolinfa y generando así un cambio de voltaje o potencial receptor en la célula ciliada. (Adaptado de (Vollrath et al., 2007).

La membrana basilar es una estructura compuesta por fibras de colágeno cuya forma y rigidez varía a lo largo de la longitud de la cóclea. Como consecuencia de las propiedades estructurales de esta membrana el sitio de máxima oscilación de la onda viajera a lo largo de la cóclea dependerá de la frecuencia del estímulo que llega a la ventana oval. De esta manera los estímulos de mayor frecuencia producen desplazamientos máximos en la zona basal y los estímulos de menor frecuencia lo hacen en la zona apical (Dallos et al., 1996)(Figura 1 D-E). Este fenómeno es la base del mecanismo por el cual el oído interno es capaz de realizar un análisis de frecuencia de los sonidos, ya que las frecuencias detectadas por cada CCI queda determinada por su posición longitudinal en la cóclea.

En los mamíferos existen dos tipos de células sensoriales: las células ciliadas internas (CCIs) y las células ciliadas externas (CCEs) (Figura 1). Las CCIs son los fonoreceptores propiamente dichos. Estas células poseen en la zona basal una maquinaria de liberación sináptica muy desarrollada y como consecuencia de la despolarización producida por el movimiento de los estereocilios (potencial receptor) liberan glutamato, activando así a los receptores para este neurotransmisor presentes en las dendritas de las neuronas aferentes que las inervan. Estas son las neuronas cuyo axones conforman el nervio auditivo, el cual lleva las señales hacia el sistema nervioso central (SNC) (Fuchs et al., 2003).

Si bien existe consenso en que las propiedades mecánicas de la membrana basilar determinan la capacidad del oído de analizar las frecuencias componentes de un sonido, el grado de discriminación de las frecuencias (sintonización fina) que se logra mediante este mecanismo es menor al que se observa fisiológicamente (Robles and Ruggero, 2001). La magnitud de la amplificación de los sonidos presenta una relación no lineal con la intensidad del estímulo, de manera que los sonidos de baja intensidad son amplificados en mayor magnitud que los de alta intensidad. Esta característica explica la gran amplitud en el rango dinámico de la audición y se debe a la existencia de un mecanismo activo, dependiente de energía (Rhode, 1971; Sellick et al., 1982; Robles et al., 1986; Ashmore, 2008). Otra consecuencia de la existencia de una retroalimentación positiva es la generación espontánea de movimiento de la membrana basilar.

Estos movimientos espontáneos pueden ser medidos como sonidos en el canal auditivo. Estos sonidos son llamados *emisiones otoacústicas* (Kemp, 1978). Todos estos fenómenos dependen de la integridad de las CCEs (Ryan and Dallos, 1975; Evans and Harrison, 1976; Dallos and Harris, 1978), por lo tanto se considera que estas células conforman el *amplificador coclear*.

1.2 Innervación del Órgano de Corti

La división de funciones que presentan los dos tipos de células ciliadas presentes en los mamíferos, se encuentra acompañada por patrones de innervación bien diferenciados (Figura 3).

1.2.1 Innervación aferente: codificación de estructura temporal e intensidad

Las CCIs, conforme con su función de receptor sonoro, se encuentran inervadas exclusivamente por terminales aferentes que conforman las fibras del nervio auditivo (Figura 3). Cada fibra aferente contacta una única CCI y cada CCI está inervada por 5 a 30 fibras aferentes. Las fibras aferentes que inervan a una misma CCI, responden en forma máxima a una frecuencia específica (Galambos and Davis, 1943; Kiang et al., 1962), de acuerdo con su posición tonotópica (Lieberman, 1982). Como se mencionó anteriormente, por su naturaleza los estímulos sonoros presentan variaciones temporales muy rápidas y parte de las adaptaciones de las células ciliadas, que permiten la codificación de dichos estímulos, es la velocidad de la cinética de los mecanotransductores. Sorprendentemente, se ha demostrado que en algunas especies las fibras aferentes también son capaces de seguir las respuestas de las CCIs en fase con el estímulo hasta frecuencias de 5 kHz (Matthews and Fuchs, 2010). Esto implica que las CCIs deben poseer la capacidad de liberar neurotransmisor a las dendritas aferentes en forma extremadamente rápida. Esta capacidad se la confiere una estructura particular llamada *sinapsis en cinta* (Fig. 4B) que consiste en una estructura proteica a la que se adosan numerosas vesículas sinápticas y caracteriza el punto de partida de la vía aferente. Esta estructura se encuentra en diversas células sensoriales que comparten la función de regular la liberación en forma graduada, a saber, los fotorreceptores, las células bipolares de la retina, los electroreceptores y las células ciliadas del sistema vestibular y de la línea lateral (Matthews and Fuchs, 2010).

1.2.2 Inervación Eferente: Control de la actividad del oído

El órgano de Corti recibe inervación eferente proveniente del tallo cerebral. De esta forma, en los individuos maduros, la actividad producida por los estímulos sensoriales es modulada en el oído interno. Durante el desarrollo, parte de la inervación eferente atraviesa importantes cambios antes de alcanzar su condición madura en términos de su anatomía y su fisiología.

En los mamíferos, la inervación eferente se puede clasificar en dos tipos dependiendo de donde estén localizados los somas de las neuronas que proyectan hacia el oído interno. Estos pueden estar ubicados en la parte medial o lateral del sistema olivar superior, dando lugar al sistema eferente Medial Olivo Coclear (MOC) que contacta directamente a las células ciliadas formando sinapsis axo-somáticas y al sistema eferente Lateral Olivo Coclear (LOC) que proyecta hacia la región basal de las células ciliadas donde forma contactos axo-dendríticos con las neuronas aferentes del ganglio espiral (Warr and Guinan, 1979).

En roedores, el número de proyecciones eferentes que se encuentra en la cóclea el día del nacimiento no es diferente del que se puede encontrar en individuos adultos (Robertson et al., 1989). Sin embargo, aunque las fibras eferentes entran en la cóclea en P0, invaden su destino final, las CCEs, progresivamente entre P3 y P11 (Cole and Robertson, 1992). En ratas y ratones el comienzo de la audición se produce alrededor de P12 (Puel and Uziel, 1987; Geal-Dor et al., 1993), momento en cual el patrón de innervación eferente de las fibras MOC adopta su estructura adulta, exclusivamente en las CCEs (Lenoir et al., 1980).

Las proyecciones del sistema LOC tienen un alto grado de ramificación y se caracterizan por carecer de cubierta mielínica. Estos axones son delgados y proyectan hacia la zona basal de las CCI (Warr et al., 1997; Rubel et al., 1998). Los terminales, o contactos "*en passant*" del sistema LOC, hacen sinapsis con las dendritas aferentes radiales del tipo I.

1.2.3 Inervación eferente a las CCEs: control del amplificador coclear

En el sistema auditivo maduro, las CCEs, cuya función principal es la de amplificar los movimientos de la membrana basilar, si bien reciben una inervación aferente de tipo II (Weisz et al., 2009), están mayoritariamente inervadas por fibras eferentes del sistema MOC (Figura 3). La inervación eferente de las células ciliadas no es exclusiva de los mamíferos, sino que es común a todos los

vertebrados. Esto se cumple no sólo en las células ciliadas del epitelio auditivo sino también en otros órganos sensoriales que poseen células ciliadas como receptores sensoriales, a saber, el aparato vestibular y la línea lateral en peces y anfibios (Manley and Koppl, 1998; Simmons, 2002).

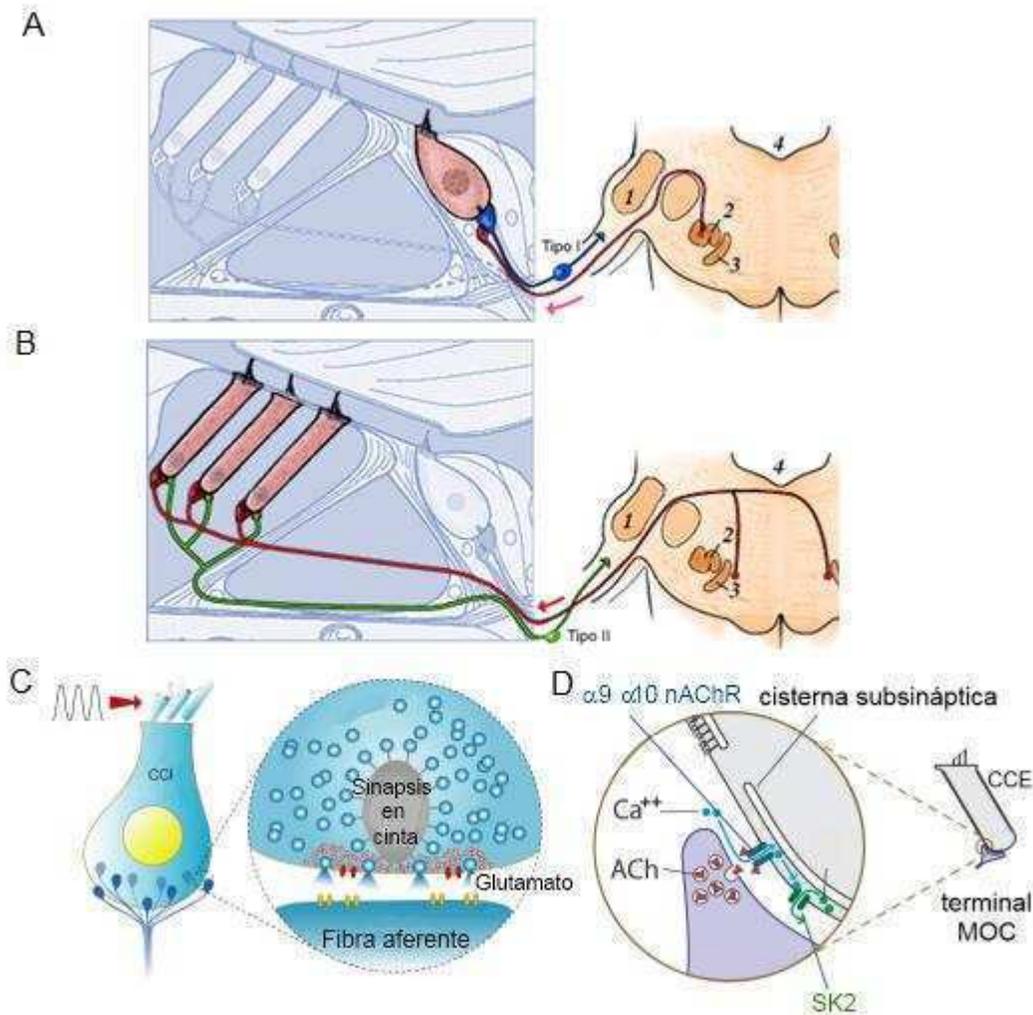


Figura 3: Patrón de inervación de las células ciliadas de mamíferos adultos. A) El esquema muestra la inervación de las CCI. Estas células están inervadas por las neuronas aferentes de tipo I que van hacia el núcleo coclear (azul). El sistema eferente lateral (rosa), que se origina en la oliva superior lateral, controla la sinapsis CCI-neurona aferente. B) Esquema mostrando la inervación de las CCE. Las CCEs hacen sinapsis con unos pocos terminales aferentes de tipo II, que forman el sistema aferente espiral (verde). Las neuronas del sistema eferente medial (rojo), a partir de ambos lados del complejo de la oliva superior medial, hacen

contactos axosomática con las CCEs. 1- Núcleo coclear, 2- Oliva superior lateral, 3- Oliva superior medial y 4- Cuarto ventrículo. Esquema adaptado de la página web:<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition>. En C se muestran las especializaciones sinápticas de la sinapsis entre las CCI y las dendritas de las neuronas aferentes, llamada 'Ribbon synapse' o sinapsis en cinta. En D se muestra un esquema de las especializaciones de los contactos sinápticos entre las fibras MOC y las CCEs. En la misma se muestra la ubicación sináptica del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y del canal SK2 y se indican también las cisternas subsinápticas.

1.2.4 Función del sistema MOC en la audición

Los primeros indicios respecto a la función que cumple esta inervación eferente en la función auditiva provienen de experimentos en los cuales se activan eléctricamente las fibras MOC mientras se monitorea la respuesta del nervio auditivo a estímulos sonoros. De esta manera se demostró que existe una disminución en la respuesta del nervio auditivo producido por la activación de las fibras MOC (Galambos, 1956; Wiederhold and Kiang, 1970). Es decir que el sistema MOC ejerce un control inhibitorio de la respuesta auditiva codificada por la cóclea. Estudios posteriores demostraron que esta inhibición de la respuesta aferente producida por las fibras MOC se encuentra a su vez asociada a una disminución del potencial receptor de las CCI (Brown and Nuttall, 1984), en el movimiento de la membrana basilar (Cooper and Guinan, 2006) y en la magnitud de las emisiones otoacústicas (Mountain, 1980; Siegel and Kim, 1982). Todos estos resultados indican que la activación de las fibras MOC resulta en una inhibición del efecto amplificador de las CCEs reduciendo así la ganancia de la cóclea.

Las fibras MOC responden a la estimulación auditiva con disparos regulares que se mantienen mientras el estímulo auditivo está presente (Brown et al., 1998). Existen distintos tipos de fibras MOC que responden en forma específica a sonidos presentados en el oído que inervan, en el oído contrario, o en ambos oídos indistintamente. Las fibras eferentes responden preferentemente a una frecuencia característica (FC) presentando curvas de sintonización muy agudas (Robertson and Gummer, 1985; Liberman and Brown, 1986; Brown, 1989). Por otro lado, cuando una fibra es estimulada a su FC, la tasa de disparo en respuesta a un estímulo aumenta monotónicamente con la intensidad del estímulo (Robertson and Gummer, 1985; Liberman and Brown, 1986; Brown, 1989; Brown et al., 1998).

Estudios realizados en la preparación *ex vivo* de órgano de Corti han demostrado que la sinapsis MOC-CCE tiene una baja probabilidad de liberación y que la facilitación combinada con la sumación de las respuestas sinápticas produce un incremento del grado de inhibición de las CCEs dependiente de la actividad de las fibras MOC (Ballestero et al., 2011). Los autores de este trabajo postularon que la plasticidad de corto término (STP por sus siglas en inglés “short term plasticity”) en esta sinapsis podría ser la determinante del grado de inhibición del amplificador coclear producido por la estimulación por sonidos de diferentes intensidades.

1.2.5 La sinapsis eferente a las CCEs

El control inhibitorio de la actividad de las CCEs se lleva a cabo mediante una sinapsis muy particular. Las CCEs poseen contactos sinápticos con 1 a 3 botones eferentes cuya característica estructural más notable es la presencia de una cisterna subsináptica muy desarrollada en aposición a la membrana postsináptica (Figura 3D). El principal neurotransmisor liberado por las fibras MOC es la acetilcolina (ACh) (Eybalin, 1993). Tanto la aplicación exógena de ACh (Housley and Ashmore, 1991; Dulon and Lenoir, 1996; Evans, 1996; Nenov et al., 1996a, b) como la liberación de neurotransmisor desde los terminales eferentes (Oliver et al., 2000; Ballestero et al., 2011) producen respuestas bifásicas compuestas por una despolarización rápida inicial seguida de una gran corriente hiperpolarizante lenta que le confiere a esta sinapsis un carácter inhibitorio. La cinética y la dependencia de voltaje de las corrientes sinápticas registradas tanto en CCEs como en CCIIs así como experimentos realizados con buffers de Ca^{2+} apoyan la hipótesis que postula que la entrada de Ca^{2+} a través del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ produce la activación de los canales SK2 y la subsiguiente salida de K^+ desde el interior celular (Glowatzki and Fuchs, 2000; Oliver et al., 2000; Gomez-Casati et al., 2005). Consistentemente con esta hipótesis, el receptor nicotínico (nAChR) de las células ciliadas de mamíferos tiene una permeabilidad muy alta al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 9-16$) (Katz et al., 2000; Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005).

El nAChR de las células ciliadas es un miembro atípico de la familia de los nAChRs. Si bien las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ presentan un alto nivel de identidad de secuencia entre ellas (54%), poseen un bajo nivel de identidad con el resto de los nAChRs (< al 39% , (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001), considerándose como los miembros más alejados y ancestrales de la familia (Le Novere et al., 2002; Franchini and Elgoyhen, 2006). Estas diferencias de identidad aminoacídica se

correlacionan con el perfil farmacológico atípico de este receptor, que presenta similitudes con otros miembros de la superfamilia Cys-Loop (Rothlin et al., 1999; Elgoyhen et al., 2001; Rothlin et al., 2003). Además, este receptor presenta una farmacología mixta que comparte características de los receptores colinérgicos tanto nicotínicos como muscarínicos (receptores de ACh acoplados a proteína G) (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001). Este perfil farmacológico peculiar es compartido por los canales homoméricos $\alpha 9$, los heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ expresados en un sistema heterólogo y por los receptores colinérgicos nativos de las células ciliadas de la cóclea (Gomez-Casati et al., 2005).

1.2.6 El sistema eferente antes del comienzo de la audición

Los primeros terminales cargados con vesículas sinápticas se pueden reconocer temprano en el desarrollo embrionario y se pueden observar contactos sinápticos a partir del día postnatal 1 en ratas y ratones (Lenoir et al., 1980). Una característica sobresaliente de la inervación a las CCI's inmaduras es la sorprendentemente alta cantidad de contactos directos entre terminales nerviosos y el soma de las CCI's, de los cuales, la mayoría muestra las diferenciaciones típicas de contactos sinápticos (Robertson et al., 1989; Cole and Robertson, 1992). Sin embargo, en los individuos adultos, estos contactos entre axones eferentes y la membrana basal de las células ciliadas son extremadamente raros y el análisis por microscopía electrónica de cortes realizados en serie, mostraron que difícilmente podrían ser caracterizados como contactos sinápticos (Lieberman, 1980). Se ha postulado que esta inervación directa a las CCI's durante el desarrollo postnatal corresponde al sistema eferente MOC que forma contactos transitorios antes de contactar a las CCE's (Simmons et al., 1990; Simmons et al., 1996).

En paralelo con esta remodelación de la inervación, en las CCI's se producen cambios en la expresión de genes involucrados con esta sinapsis. Las CCI's expresan el ARN mensajero que codifica para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ desde estadios embrionarios. Sin embargo, mientras la expresión del mensajero de la subunidad $\alpha 9$ se mantiene hasta el estadio adulto (Elgoyhen et al., 1994; Luo et al., 1998; Simmons and Morley, 1998), el mensajero de la subunidad $\alpha 10$ deja de detectarse en P15 (Elgoyhen et al., 2001; Morley and Simmons, 2002) (Figura 4). Asimismo, utilizando técnicas de inmunocitoquímica se demostró que tanto la subunidad $\alpha 10$ como el canal SK2 dejan también de expresarse en las CCI's luego de P15 (Katz et al., 2004), coincidiendo con la retracción de las fibras eferentes (Simmons et al., 1996; Simmons, 2002).

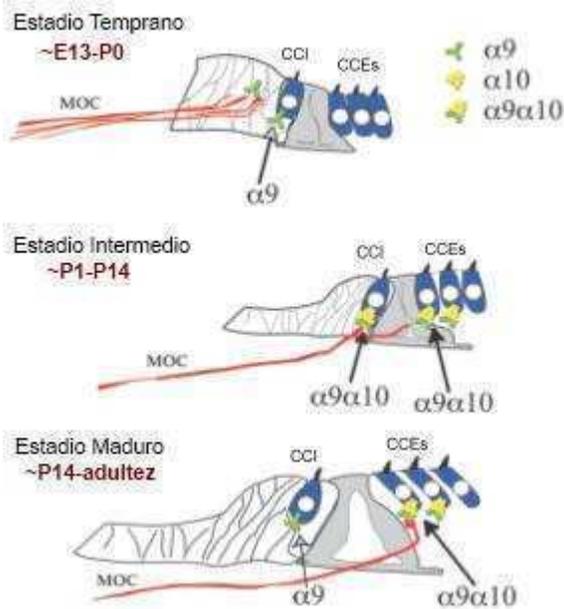


Figura 4. Expresión de las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$ durante el desarrollo. En el esquema se muestran tres períodos de la sinaptogénesis de las fibras MOC en paralelo con la expresión de las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$. En cada período se indica en color bordó la edad correspondiente en los roedores altrícios. En períodos tempranos, antes de que las fibras MOC hagan contacto con las CCI, éstas expresan la subunidad nicotínica $\alpha 9$. En estadios intermedios en los cuales tanto las CCI como las CCEs reciben contactos sinápticos, ambos tipos celulares expresan las dos subunidades nicotínicas ($\alpha 9$ y $\alpha 10$). En las CCI, luego de la retracción de las fibras eferentes (alrededor de P12) aún puede detectarse la presencia de transcritos para la subunidad $\alpha 9$ pero no para la $\alpha 10$. (Adaptado de (Simmons, 2002).

La participación del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ y del canal SK2 en esta sinapsis fue confirmada mediante registros en CCI neonatales (Glowatzki and Fuchs, 2000). Además, en forma consistente con los cambios en la expresión génica y en la invasión, las CCI presentan sensibilidad a la ACh entre P0-P14 y respuestas sinápticas entre P1-P14 (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

1.2.7 Actividad eléctrica durante el desarrollo del sistema auditivo

Durante el desarrollo y antes del comienzo de la audición las CCI son capaces de generar potenciales de acción repetitivos, llevados principalmente por Ca^{2+} , que desaparecen al comienzo de la audición debido a la expresión de canales rápidos de K^+ activados por Ca^{2+} del tipo BK (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003; Marcotti et al., 2004). Esta actividad eléctrica de las CCI inmaduras

es capaz de provocar la liberación de glutamato que activa a los receptores glutamatérgicos presentes en las dendritas de las neuronas aferentes que forman el nervio auditivo (Beutner and Moser, 2001; Glowatzki and Fuchs, 2002). Si bien se propone que la generación de estos potenciales de acción es espontánea y dependiente de las propiedades eléctricas intrínsecas de las CCI (Kros et al., 1998; Johnson et al., 2011a), algunos estudios muestran que durante períodos tempranos del desarrollo, las células de soporte liberan ATP. Se mostró además que el ATP liberado es capaz de despolarizar a las CCI y se postuló entonces que la actividad de las células de soporte es lo que da inicio a los potenciales de acción (Tritsch et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que los patrones de actividad espontánea en las vías auditivas superiores durante el desarrollo conservan la estructura de la actividad generada en las CCI (Tritsch and Bergles, 2010; Tritsch et al., 2010). Estos estudios confirman el hecho de que la actividad originada en el oído interno, ya sea por las propiedades intrínsecas de las CCI (Beutner and Moser, 2001; Glowatzki and Fuchs, 2002), la liberación de ATP (Tritsch et al., 2007) o ambas, determina el patrón de actividad del sistema auditivo, a nivel central, antes del comienzo de la audición.

1.2.8 Función del sistema MOC en el desarrollo

La generación de potenciales de acción en las CCI puede ser inhibida tanto por aplicación exógena de ACh (Glowatzki and Fuchs, 2000) como por activación eléctrica de las fibras MOC que las contactan (Goutman et al., 2005; Johnson et al., 2011b). Estos resultados sugieren que la inervación eferente olivococlear podría tener un rol modulador de la actividad espontánea de la vía auditiva durante el desarrollo, ejerciendo un control sobre el correcto establecimiento de las mismas. De acuerdo con esta propuesta, se observó que el patrón de disparo rítmico de las neuronas aferentes inmaduras se vuelve continuo luego de cortar los terminales eferentes (Walsh et al., 1998). Por otro lado, se ha postulado que el sistema eferente participa en la regeneración y neosinaptogenesis que se produce en respuesta a traumas acústicos leves. Luego de exponer individuos adultos (Guinea Pigs) a protocolos de daño acústico de baja intensidad, los autores observaron que la inervación eferente directa a las células ciliadas reaparece durante un breve periodo que precede la recuperación de los umbrales normales de audición (Puel et al., 1995).

Más aún, recientemente (Lauer et al., 2012), se encontró que esta sinapsis transitoria MOC-CCI reaparece durante el envejecimiento. Los autores de este trabajo postulan que la pérdida de

actividad aferente en el oído interno podría desencadenar el retorno a un estado de inervación “inmaduro”.

1.3 Transmisión sináptica

La generación de un potencial de acción en el soma de la neurona presináptica inicia el proceso de comunicación entre neuronas. Esta onda de variación del potencial de membrana se propaga hasta alcanzar el terminal sináptico donde la despolarización de la membrana celular produce la activación de corrientes de calcio dependientes de voltaje (CCDV). La entrada de calcio al terminal dispara la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana y el volcado del neurotransmisor a la brecha sináptica. Una vez allí, la activación de receptores en la neurona postsináptica continúa el proceso a través de señales eléctricas o de la activación de cascadas intracelulares de señalización (Nicholls, 2001). Este fenómeno ocurre en escalas de tiempo del orden de ms e incluso de una fracción de ms.

En la actualidad se sabe que la neurotransmisión está finamente regulada a diferentes niveles y es inmensamente variable dependiendo de la sinapsis que se estudie. Estos mecanismos de regulación y las particularidades de cada sistema son los que le confieren a cada sinapsis la capacidad de codificar e integrar información cumpliendo las funciones computacionales que caracterizan al sistema nervioso (Auger and Marty, 1997; Atwood and Karunanithi, 2002; Abbott and Regehr, 2004; Blitz et al., 2004).

1.3.1 Estudios fundacionales sobre transmisión sináptica

La mayor parte de los trabajos pioneros sobre transmisión sináptica fueron realizados en preparaciones como la placa neuromuscular de la rana y la sinapsis gigante del calamar. Entre otras razones, por las posibilidades técnicas, como la de medición de cambios en el potencial de membrana con el instrumental de la época y la identificación visual de la unión neuromuscular que fueron determinantes en la elección de la preparación. Además, razones históricas como la existencia de una importante cantidad de conocimiento acumulado sobre este tipo de preparaciones y los descubrimientos de Otto Loewi sobre la acción de la ACh en el músculo cardíaco (Loewi, 1921) allanaron el camino a las investigaciones que luego establecieron las bases de la actual comprensión de la neurotransmisión.

Aunque ya en 1848 se postuló la naturaleza química de la comunicación entre las motoneuronas y las fibras musculares en las ranas (Du Bois-Reymond, 1848), recién con la publicación de los trabajos realizados por Dale y sus colegas en la década del 30 (Dale, 1934; Brown et al., 1936; Dale et al., 1936), describiendo la liberación de ACh sobre las fibras musculares, se terminó de aceptar el concepto de que una sustancia química es liberada y funciona como mensajero entre células. A estos trabajos le siguió una importante cantidad de trabajos enfocados en la fisiología y la biofísica del fenómeno de la transmisión sináptica.

1.3.2 Naturaleza cuántica de la liberación del neurotransmisor

En los años 50 Fatt y Katz describieron la existencia de “ruido biológico” durante los registros de potenciales realizados con microelectrodos intracelulares en la placa neuromuscular de anfibios (Fatt and Katz, 1950). A partir de esta observación azarosa se desprendió una descripción completa de lo que terminaron llamando “potenciales miniatura”. Estos autores demostraron que existe un gran parecido entre los potenciales miniatura y los potenciales de placa evocados y finalmente mostraron que las amplitudes siguen una distribución Gaussiana. El curso temporal y el efecto de varias drogas sobre los potenciales miniatura resultó ser indistinguible de los potenciales evocados (epps por su sigla en inglés “excitatory postsynaptic potentials”) por estimulación del nervio. Debido a que la ACh es el transmisor en la sinapsis neuromuscular, tanto los potenciales miniatura como los epps son aumentados y prolongados por el efecto de la prostigmina, una droga que inhibe la hidrólisis de la ACh por la acetilcolinesterasa (Fatt and Katz, 1952). Del mismo modo, los potenciales de membrana (miniatura y evocados) son reducidos y eventualmente bloqueados por agentes que bloquean al receptor de ACh (Fatt and Katz, 1952). También notaron que el incremento en la $[Mg^{2+}]_e$ o la disminución en la $[Ca^{2+}]_e$ bloqueaba la liberación de ACh y en esta condición, de baja eficiencia de liberación, se hace evidente el hecho de que la amplitud de los potenciales de placa evocados no siguen una distribución continua sino discreta. Estas observaciones llevaron a enunciar la hipótesis cuántica de la liberación del neurotransmisor, que postula que los potenciales miniatura son unidades de liberación de neurotransmisor, cuanto (Q) y que los potenciales evocados son múltiplos enteros de un cuanto (Del Castillo and Katz, 1954a). La teoría cuántica permitió por primera vez modelar formalmente el proceso de neurotransmisión. Katz y sus colegas enunciaron el primer modelo formal que consiste en una distribución binomial de la amplitud de los epps que, bajo un régimen de baja probabilidad de liberación se puede ajustar a una distribución de Poisson. En este modelo, los parámetros fundamentales que definen

a una sinapsis son i) la amplitud de la respuesta producida por una única vesícula (tamaño del cuanto, Q), ii) el número de sitios activos independientes (N) y la probabilidad de liberación en cada sitio (P). A partir de estos parámetros se puede definir el promedio de vesículas que se libera en cada potencial de acción como $P * N$. Este valor se conoce como 'contenido cuántico' (m) y es un indicador de la fuerza de una sinapsis (Bennett and Kearns, 2000).

Luego de la caracterización de la naturaleza cuántica de la liberación en la placa neuromuscular de la rana, rápidamente se obtuvieron evidencias que validaron la hipótesis cuántica en los mamíferos (Liley, 1956). En la actualidad se reconoce la validez general de este modelo y se lo utiliza como marco teórico para el desarrollo de investigaciones en el área de transmisión sináptica en una variedad cada vez mayor de preparaciones en sistemas y especies diferentes.

Analizando las corrientes sinápticas evocadas (eIPSCs) y espontáneas (sIPSCs por sus siglas en inglés: *evoked y spontaneous inhibitory post synaptic currents*) (Goutman et al., 2005) demostraron que la liberación de ACh, en la sinapsis eferente transitoria a las CCl, es de naturaleza cuántica. Además, los autores mostraron que las corrientes evocadas por estimulación eléctrica corresponden a las mediadas por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ acoplado al canal SK2.

1.3.3 Participación del Ca^{2+} en el proceso de neurotransmisión

Durante las primeras décadas de estudio de la transmisión sináptica se pudieron describir importantes características, entre ellas, se demostró la importancia del Ca^{2+} para el proceso de liberación del neurotransmisor (Del Castillo and Stark, 1952) y la relación supra lineal que existe entre la concentración extracelular de este ion y la cantidad de neurotransmisor liberado (Dodge and Rahamimoff, 1967). Experimentos subsiguientes, realizados en la sinapsis gigante del calamar tratada con tetrodotoxina (TTX), mostraron que una despolarización de la presinapsis, independientemente de la ocurrencia de un potencial de acción, es suficiente para desencadenar la liberación del neurotransmisor y evocar potenciales sinápticos (Katz and Miledi, 1966). Experimentos posteriores permitieron medir directamente la entrada de calcio al terminal presináptico en la sinapsis gigante del calamar mediante la técnica de "voltage-clamp". Con este abordaje experimental, se pudo establecer claramente la relación entre el potencial de acción y la entrada de calcio, mostrando también el curso temporal de la entrada de este ion. Además, por primera vez, se pudo medir directamente la relación entre la cantidad de calcio que entra al

terminal y la amplitud de la respuesta postsináptica (Llinas et al., 1972; Llinas and Nicholson, 1975; Llinas et al., 1982).

En conjunto, estos trabajos pusieron en evidencia desde un primer momento la importancia del calcio como vínculo entre la actividad eléctrica y la actividad secretoria, fenómeno al que denominaron “*electro-secretory coupling*” (Katz and Miledi, 1966).

En la actualidad se utilizan muchas preparaciones diferentes para estudiar los principios generales de la neurotransmisión así como las características particulares de cada sinapsis. El “cáliz de Held”, la sinapsis formada entre neuronas del núcleo Coclear y el núcleo Medial del cuerpo Trapezoideo, se destaca porque su morfología con forma de cáliz y su tamaño excepcionalmente grande permiten acceder simultáneamente a la pre y a la postsinapsis para realizar registros de “*Patch-Clamp*” en la configuración “*Whole-Cell*”. De esta manera, no solo se puede controlar el potencial de ambas partes sino que, además se pueden dializar los medios intracelulares con diferentes sustancias. El DM-Nitrophen es una molécula que se une al Ca^{2+} con mucha afinidad pero, al ser estimulado con pulsos de luz ultravioleta, su afinidad por el ion disminuye. De esta manera, aplicando pulsos de luz por tiempos breves, se generan incrementos transitorios en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Con esta técnica se determinó que un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ a $10 \mu\text{M}$, (equivalente a la concentración alcanzada por la llegada de un potencial de acción (Borst and Sakmann, 1996), durante menos de 0,5 ms es suficiente para producir la fusión normal de vesículas sinápticas (Bollmann et al., 2000; Schneggenburger and Neher, 2000).

1.4 Canales iónicos que participan del proceso de transmisión sináptica.

1.4.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Desde que se registraron las primeras corrientes de Ca^{2+} quedó clara la existencia de múltiples tipos de conductancias, caracterizadas por sus propiedades farmacológicas y biofísicas (Tsien et al., 1988; Bean, 1989; Llinas et al., 1992). En el músculo esquelético cardíaco, la principal corriente de Ca^{2+} se distingue por su alto voltaje de activación, su gran conductancia unitaria, marcada regulación por proteínas dependientes de AMPc e inhibición específica por dihidropiridinas (DHPs) y fenilalquilaminas (tabla 1, (Catterall, 2011)). A estas corrientes se las denominó corrientes del tipo L debido a que, por su lenta inactivación, son de larga duración cuando el Ba^{2+} es el ion que transporta la carga y no hay inactivación dependiente de Ca^{2+} (Tsien et al., 1988). Las corrientes de

Ca^{2+} del tipo L también se registraron en células endocrinas donde sostienen el proceso de liberación de hormonas (Yang and Berggren, 2006) y en neuronas donde cumplen una función de regulación de la expresión génica, integración de “*inputs*” sinápticos (Tsien et al., 1988; Bean, 1989). Los canales del tipo L también son los que median la liberación de graduada de glutamato en la sinapsis en cinta presente en las células ciliadas del sistema auditivo de vertebrados (Platzer et al., 2000).

Estudios electrofisiológicos de las corrientes de Ca^{2+} en erizos de mar revelaron la existencia de otras conductancias con propiedades diferentes a las del tipo L (Hagiwara et al., 1975) que luego fueron caracterizadas en neuronas de la raíz dorsal usando la técnica de fijación de voltaje (Carbone and Lux, 1984). En comparación con las conductancias del tipo L, estas nuevas corrientes se activaban a potenciales mucho más negativos, se inactivaban mucho más rápidamente, tenían una conductancia unitaria más pequeña y eran insensibles a las drogas disponibles en ese momento (tabla 1). Estas fueron designadas corrientes de Ca^{2+} del tipo T por sus aperturas transitorias (Nowycky et al., 1985).

Experimentos realizados en neuronas de la raíz dorsal disociadas revelaron la existencia de una corriente adicional, la corriente del tipo N (Nowycky et al., 1985). Las corrientes del tipo N fueron distinguidas inicialmente por una dependencia intermedia con el voltaje y una tasa de inactivación más negativa y más rápida que las del tipo L pero más positiva y más lenta que las del tipo T (Nowycky et al., 1985). Estas corrientes son insensibles a los antagonistas orgánicos de las corrientes L pero sensibles a la toxina del molusco bivalvo *Conus geographus*, ω -Conotoxina GVIA (tabla 1) y otras toxinas peptídicas relacionadas (Tsien et al., 1988; Olivera et al., 1994; Catterall, 2000, 2011).

El análisis de los efectos de otras toxinas peptídicas reveló la existencia de tres tipos de corrientes de Ca^{2+} adicionales. Las corrientes del tipo P fueron registradas inicialmente en neuronas de Purkinje (Llinas et al., 1989). Se distinguen por su alta sensibilidad a la toxina arácnida ω -Agatoxina IVA (Mintz et al., 1992). Corrientes sensibles a la misma toxina pero con diferentes grados de sensibilidad fueron halladas en diferentes tipos neuronales, en términos generales se las denomina corrientes del tipo P/Q (Catterall, 2000, 2011). Las corrientes del tipo R fueron denominadas así porque eran resistentes a la mayoría de los bloqueantes específicos conocidos para los otros tipos de canales de Ca^{2+} (Catterall, 2000, 2011). Se encontró sin embargo que

pueden ser bloqueados por el péptido SNX-482, derivado de la tarántula *Hysteroocrates gigas* (Newcomb et al., 1998). Aunque las corrientes de los tipos L y T pueden ser registradas en una mayor variedad de tipos celulares, las corrientes de los tipos N, P/Q y R son más abundantes en las neuronas (Catterall, 2011).

Dado que las propiedades biofísicas de cada tipo de corriente son variables entre los distintos tipos celulares y que en la gran mayoría de los casos las restricciones técnicas impiden la medición directa de las mismas en los terminales sinápticos, estos perfiles farmacológicos se han convertido en la principal herramienta para la identificación de cada tipo de conductancia.

1.4.2 Estructura molecular de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Los CCDVs están compuestos por cinco subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ y δ . El análisis de sus propiedades bioquímicas, de glicosilación e hidrofobicidad de estas cinco proteínas llevo a postular un modelo (Figura 5) que incluye a la subunidad $\alpha 1$, de 190 kDa, como el principal componente asociado a un dímero compuesto por las subunidades $\alpha 2\delta$ través de un puente disulfuro, una subunidad β de 55 kDa fosforilada y ubicada del lado intracelular del canal y, finalmente, la subunidad γ (33 kDa) que también atraviesa la membrana (Catterall, 2011).

La subunidad $\alpha 1$ cuenta con aproximadamente 2000 residuos aminoácidos de longitud y una estructura de varios pasos transmembranales (Figura 5). La secuencia de aminoácidos está organizada en cuatro dominios repetidos (I-IV), de los que cada uno contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6) y un “loop” asociado a la membrana entre los segmentos S5 y S6. La subunidad intracelular β tiene segmentos α -hélice pero no segmentos transmembranales, mientras que la subunidad γ es una glicoproteína con cuatro pasos transmembrana (figura 2) (Takahashi et al., 1987). La subunidad $\alpha 2$ clonada tiene varios sitios de glicosilación y secuencias hidrofóbicas (Ellis et al., 1988), pero estudios de biosíntesis indican que es una glicoproteína extracelular, unida a la membrana a través de un puente disulfuro formado con la subunidad δ , que se encuentra unida a la membrana (Figura 5) (Gurnett et al., 1996). La subunidad δ esta codificada por el extremo 3' del mismo gen que codifica para la subunidad $\alpha 2$. Las formas maduras se producen por proteólisis postraducciona y formación del puente disulfuro (De Jongh et al., 1996). Aunque inicialmente se asumió que la subunidad δ estaba anclada a la membrana a través de un pequeño segmento hidrofóbico, trabajos recientes sugieren que durante el procesamiento

postraduccional se cliva el segmento transmembrana y se lo reemplaza por un grupo glicofosfatidilinositol que funciona como ancla a la membrana (Figura 5) (Davies et al., 2010).

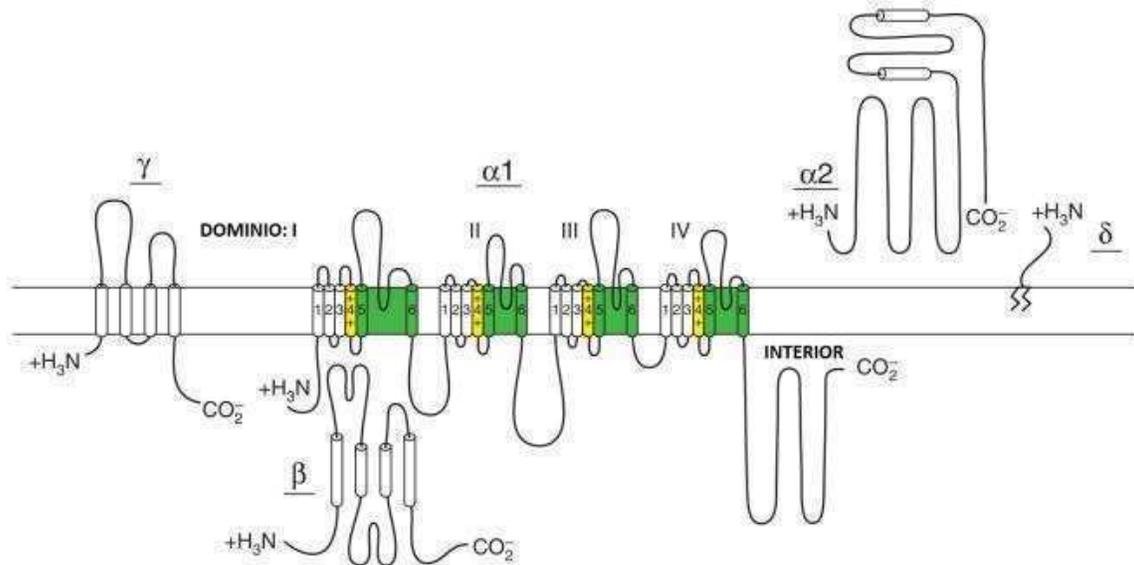


Figura 5: Esquema de la estructura molecular de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Las estructuras de α hélice predichas a partir del análisis de secuencia están representadas como cilindros. La longitud relativa de cada segmento guarda una proporción aproximada con la fracción del péptido que representa. Las líneas en zig-zag de la subunidad δ representan el ancla de fosfatidilinositol. Modificada de (Catterall, 2011)

Los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} están definidos en una primera instancia por el tipo de subunidad $\alpha 1$ que contienen y se han identificado 10 tipos de subunidades diferentes por medio de clonado de los cDNA y expresión funcional en células de mamíferos o en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estas subunidades se pueden clasificar en base a criterios estructurales y funcionales en tres familias: $\text{Ca}_v 1$; $\text{Ca}_v 2$ y $\text{Ca}_v 3$ (Snutch and Reiner, 1992; Ertel et al., 2000). Las corrientes del tipo L están mediadas por subunidades de la familia $\text{Ca}_v 1$ que tienen un 75% de identidad de secuencia entre ellas. Los canales formados por las subunidades $\text{Ca}_v 2$ forman una subfamilia diferente con un 40% de identidad de secuencia con los $\text{Ca}_v 1$ pero 70% entre ellos mismos. La subunidad $\text{Ca}_v 2.1$ conduce las corrientes del tipo P/Q (Mori et al., 1991; Starr et al., 1991) las $\text{Ca}_v 2.2$ conducen las del tipo N y las $\text{Ca}_v 2.3$ conducen las del tipo R. Las corrientes de Ca^{2+} del tipo T están mediadas por la subunidad $\text{Ca}_v 3$ (Perez-Reyes et al., 1998).

La diversidad de estructura y función de los canales de Ca^{2+} aumenta sustancialmente por la existencia de múltiples subunidades β . Se han identificado 4 subunidades diferentes y cada una es sujeto de “*splicing*” alternativo por lo que se alcanza una importante cantidad de isoformas (Dolphin, 2003). Se identificaron genes que codifican para las subunidades $\alpha 2\delta$ (Klugbauer et al., 1999), las isoformas producidas por cada uno de esos genes tienen efectos selectivos sobre los niveles de expresión funcional y de dependencia con el voltaje de las subunidades $\alpha 1$ (Davies et al., 2007).

Tabla 1: Identidad y principales funciones conocidas de los diferentes canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Tipo de I_{Ca}	Subunidad $\alpha 1$	Antagonista Específico	Funciones Fisiológicas
Tipo L	$\text{Ca}_v1.1$	DHPs	Acoplamiento excitación contracción en el musculo esquelético. Regulación de la transcripción.
	$\text{Ca}_v1.2$	DHPs	Acoplamiento de la excitación contracción en el musculo cardíaco y liso, secreción endócrina, transitorios de Ca^{2+} en soma y dendritas, regulación de la actividad enzimática y de la transcripción.
	$\text{Ca}_v1.3$	DHPs	Secreción endócrina, marcapasos cardíaco, transitorios de Ca^{2+} en soma y dendritas, liberación del neurotransmisor en células ciliadas.
	$\text{Ca}_v1.4$	DHPs	Transducción visual.
N	$\text{Ca}_v2.1$	ω -Conotoxina-GVIA	Liberación del neurotransmisor, transitorios de Ca^{2+} dendríticos
P/Q	$\text{Ca}_v2.2$	ω -Agatoxina-IVA	Liberación del neurotransmisor, transitorios de Ca^{2+} dendríticos.
R	$\text{Ca}_v2.3$	SNX-482	Liberación del neurotransmisor, transitorios de Ca^{2+} dendríticos.
T	$\text{Ca}_v3.1/2/3$	No se conoce	Marcapasos y disparo repetitivo

De (Catterall, 2011)

1.4.3 Compartimentalización de las funciones del Ca^{2+}

En las neuronas, el Ca^{2+} no solo dispara la fusión de vesículas sinápticas sino que regula una gran cantidad de procesos en forma simultánea. Desde la activación de canales iónicos (para una extensa revisión del tema ver: (Fakler and Adelman, 2008) hasta el inicio de cascadas de segundos mensajeros y regulación de la expresión génica (ver: (Flavell and Greenberg, 2008)). La razón por la que el Ca^{2+} puede cumplir funciones tan diferentes, e incluso contrapuestas en algunos casos, es que existe un alto grado de compartimentalización o restricción de la difusión a regiones muy acotadas de las células. La compartimentalización, la morfología neuronal (Horton and Ehlers, 2003) y la localización de los canales, bombas, transportadores y buffers intracelulares determinan la duración y el área por donde difunde cada aumento transitorio en la concentración de Ca^{2+} (Augustine et al., 2003). Los incrementos locales de la concentración de Ca^{2+} producidos por la apertura de un canal se denominan nanodominios, en referencia a la magnitud alcanzada dado que, para que se produzca alguna transferencia de información, el sensor de Ca^{2+} tiene que estar localizado a no menos de 50 nM. La apertura de un conjunto de canales agrupados produce incrementos mayores en la concentración de Ca^{2+} en radios mayores, del orden de cientos de nanómetros. A estos se los denomina microdominios (Chad and Eckert, 1984; Simon and Llinas, 1985; Adler et al., 1991; Roberts, 1993; Naraghi and Neher, 1997) revisiones del tema: (Augustine et al., 2003; Neher and Sakaba, 2008).

1.4.4 Corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} y voltaje

Como se mencionó en las secciones anteriores, el Ca^{2+} dispara una variedad de reacciones con consecuencias diferentes y en algunos casos, incluso contrarias. Estos fenómenos pueden ocurrir simultáneamente debido a la compartimentalización que se da por diversas restricciones a la difusión Ca^{2+} (morfología, buffers, bombas, transportadores) y a que, en términos generales, las proteínas que actúan como sensores se encuentran próximos a la fuente de Ca^{2+} .

Los canales de K^+ y Cl^- son los únicos que tienen un potencial de reversión cercano al potencial de membrana normal de las células, esta característica los vuelve actores fundamentales en la regulación del propio potencial de reposo en la mayoría de las células. En neuronas y tejidos excitables, los canales de K^+ también cumplen un papel importante en la modulación de la forma y

duración de los potenciales de acción, la frecuencia de disparo y la excitabilidad en general de la célula (ver (Salkoff et al., 2006).

Los canales de alta conductancia del tipo BK (originalmente denominados big K o maxi K) conforman una subfamilia dentro de la familia de los canales de K^+ que se caracteriza por su alta conductancia individual y por su activación, dependiente de la $[Ca^{2+}]_i$ y del potencial de membrana. Debido a su sensibilidad a la modulación por diversos factores, como Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , pH o fosforilación y a su gran conductancia, estos canales son un componente especialmente versátil de la maquinaria de regulación del potencial de membrana (ver (Berkefeld et al., 2010).

En el genoma de mamíferos existen cuatro genes que conforman la familia *Slo* (*Slo1*, *Slo2.1*, *Slo2.2* y *Slo3*) y que codifican subunidades α capaces de formar canales homotetraméricos. Estos permiten el paso selectivo de una corriente de K^+ . Cada homotetrámero tiene una cinética característica y marcadamente diferente a los demás. Los canales BK tienen un dominio intracelular de unión a Ca^{2+} que funciona como fuente de energía para disparar la apertura del canal (Schreiber and Salkoff, 1997; Bao and Cox, 2005; Sweet and Cox, 2008). La otra fuente de energía que determina la apertura del canal es la despolarización de la membrana que actúa movilizándolo un dominio sensible a voltaje (Horrigan and Aldrich, 1999, 2002). Ambos estímulos convergen alostéricamente, lo que se visualiza experimentalmente como un desplazamiento hacia potenciales más hiperpolarizados de la curva de activación dependiente de voltaje (para una revisión del tema ver: (Magleby, 2003).

En algunos tipos neuronales, la entrada de Ca^{2+} y la subsiguiente activación de canales BK modulan la repolarización del terminal sináptico alterando así la liberación del neurotransmisor. En la placa neuromuscular, los canales BK se encuentran localizados en la proximidad de los sitios de liberación y están funcionalmente acoplados a los mismos canales de Ca^{2+} que sostienen la liberación de ACh, lo que produce una disminución de la cantidad de neurotransmisor que se libera por impulso nervioso (Robitaille and Charlton, 1992; Robitaille et al., 1993). En el hipocampo, estos canales modulan la cantidad de neurotransmisor liberado alterando así la cinética de repolarización de los potenciales de acción (Storm, 1987; Hu et al., 2001).

1.5 Plasticidad de corto término

Una propiedad general de las sinapsis es que no son sistemas invariantes, sino todo lo contrario, están dotadas de una extraordinaria capacidad de cambiar de acuerdo a su historia previa, es decir, la actividad sináptica determina como será la actividad futura. La historia de la sinapsis se codifica en diferentes formas de plasticidad sináptica dependiente de actividad. La plasticidad de corto término puede consistir en una disminución de la fuerza sináptica (depresión) o en un aumento de la misma (facilitación) (Zucker and Regehr, 2002). En cualquier caso, el cambio puede durar, desde algunos milisegundos hasta varios segundos antes de que la sinapsis vuelva a funcionar dentro de sus niveles originales. Cuando la plasticidad sináptica funciona dentro de escalas temporales más largas, segundos a minutos, se habla de aumentación o potenciación postetánica. Del mismo modo, los fenómenos plásticos de duraciones todavía mayores se clasifican como plasticidad de largo término (LTP por sus siglas en inglés “long term potentiation”). En todos los casos, las diferentes escalas temporales revelan la existencia de mecanismos de naturaleza diferente (Zucker and Regehr, 2002; Fioravante and Regehr, 2011).

La plasticidad neta revela la interacción de diversos mecanismos que inciden sobre la fuerza sináptica. En muchas sinapsis, la actividad repetitiva lleva a una disminución transitoria de las respuestas postsinápticas.

1.5.1 Depresión de corto término

La depresión se puede dar por una depleción del pool de vesículas listas para ser liberadas, por desensibilización del receptor postsináptico o por depresión de las corrientes de Ca^{2+} presinápticas, entre otras razones (Zucker and Regehr, 2002). El pool de vesículas listas para ser liberadas (RRP por sus siglas en inglés “readily releasable pool”) consiste en una proporción menor del total de vesículas sinápticas que se encuentran en el terminal (este tema se desarrollará con mayor detalle en la sección siguiente; (para ver una amplia revisión del tema: (Rizzoli and Betz, 2005). Cuando la actividad sináptica es más rápida que la tasa de reabastecimiento de este conjunto de vesículas, la fuerza sináptica disminuye por la disminución de la cantidad de vesículas disponibles. Esta visión predice que los aumentos en la eficiencia inicial de liberación implican mayores niveles de depresión. Esto se cumple en muchos tipos de sinapsis: en el hipocampo (Debanne et al., 1996), en la córtico-talámica (Ran et al., 2009), en el cáliz de Held

(Schneppenburger et al., 1999), entre otros ejemplos. En estos casos, la recuperación de la depresión puede durar varios segundos y también está relacionada con la elevación de la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico (Dittman and Regehr, 1998; Hosoi et al., 2007; Sakaba, 2008). También se ha propuesto la existencia de alguna forma de inactivación de los sitios de liberación, por el cual, una vez que se fusionó una vesícula, ese sitio atraviesa una serie de procesos que lo dejan en condiciones de volver a funcionar. (Hosoi et al., 2007). Una disminución de la entrada de calcio producida por la actividad repetitiva también podría incidir sobre la tasa de liberación. Debido a la relación supralineal entre la concentración de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisión, pequeños cambios en la entrada de este ion pueden tener un fuerte impacto sobre la fusión de vesículas. Este fenómeno fue demostrado en el Cáliz de Held (Forsythe et al., 1998; Xu and Wu, 2005).

1.5.2 Facilitación

La mayoría de las sinapsis con una baja probabilidad de liberación inicial atraviesan procesos de facilitación (aumento de la fuerza sináptica) cuando son activadas en forma repetitiva (Katz and Miledi, 1968). Este aumento en la amplitud de las respuestas sinápticas es dependiente del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la presinapsis y puede durar hasta algunos segundos (Zucker and Regehr, 2002; Fioravante et al., 2011).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar este fenómeno es la acumulación de Ca^{2+} residual debido a la actividad repetitiva que activaría un sensor de alta afinidad. Esta hipótesis surge de inconsistencias encontradas al comparar las cinéticas de decaimiento de la facilitación y de la concentración de Ca^{2+} (Delaney and Tank, 1994; Regehr et al., 1994; Atluri and Regehr, 1996). Otra posible explicación es la saturación de los buffers presinápticos ante la estimulación repetitiva (Neher, 1998; Matveev et al., 2004). El aumento de la corriente de Ca^{2+} producida por actividad precedente también podría explicar fenómenos de facilitación, de hecho, la contribución de este fenómeno a la STP fue demostrada directamente en el caso del cáliz de Held (Ishikawa et al., 2005; Inchauspe et al., 2007). En términos generales, la STP determina cómo se codifica la información en cada sinapsis pero, además, revela aspectos fundamentales de su funcionamiento.

1.5.3 Pooles de vesículas sinápticas

Una de las características salientes de las sinapsis químicas es la existencia de un prominente conjunto de vesículas localizadas en la proximidad del punto de contacto entre células. Desde los más tempranos estudios sobre neurotransmisión se reconoció la existencia de diferentes agrupamientos de neurotransmisor con características distintivas (Liley and North, 1953; Elmqvist et al., 1964; Elmqvist and Quastel, 1965). Estos autores no solo postularon la existencia de grupos de vesículas con características fisiológicas distintivas sino que además se refirieron a la existencia de una reserva de neurotransmisor a la que se recurriría en situaciones de mucha actividad sináptica.

Las vesículas atraviesan un ciclo de reciclado que le permite a las células la reutilización de las proteínas y lípidos que las componen. Normalmente la proporción de vesículas que se encuentra asociado a la membrana es pequeña respecto al total. Además del hecho de que algunas se encuentran en las cercanías de la membrana, no hay otras características que permitan distinguir a las vesículas por microscopía electrónica o análisis bioquímico. Sin embargo, las características fisiológicas permiten postular la existencia de varios conjuntos de vesículas: el pool de vesículas listas para ser liberadas (RRP), el pool de vesículas reciclables (RecP) y el pool de reserva (RP). Aunque en la bibliografía estos pooles pueden recibir nombres diferentes, existe consenso respecto a las denominaciones utilizadas en este trabajo (Sudhof, 2000, 2004; Rizzoli and Betz, 2005).

Cuando una sinapsis es estimulada en forma repetitiva durante períodos largos de tiempo, se puede observar una primera fase en la que se produce una disminución de la liberación hasta alcanzar una tasa estacionaria. La depresión sináptica inicial refleja la depleción del RRP mientras que el nivel de liberación que se mantiene en el estado estacionario refleja el reabastecimiento del RRP desde el RecP o desde el RP (Schneppenburger et al., 1999; Schneppenburger et al., 2002).

El tamaño del RRP normalmente coincide con el número de vesículas que se puede liberar por aplicación de altas concentraciones de sacarosa (Rosenmund and Stevens, 1996) y con el número de vesículas “ancladas” (próximas al sitio activo) que se puede medir por microscopía electrónica (Schikorski and Stevens, 1997, 1999). Al número total de vesículas que participan de la exo y endocitosis durante protocolos largos de estimulación se lo denomina RecP. Este pool está compuesto por vesículas del RRP y vesículas del RP que reabastecen al primero (Sudhof, 2004). La

estimulación de neuronas del hipocampo en presencia de la tinción FM1-43 (que es captada durante la endocitosis) permite el marcado completo del RecP. En estas neuronas, el tamaño del RecP fue estimado en 21-25 vesículas, mientras que el del RRP fue de 4-8 vesículas y el número total de vesículas fue estimado en más de 200 (Murthy and Stevens, 1999; Sudhof, 2000). La proporción que cada uno de estos grupos significa, respecto al total de vesículas que hay en cada terminal, varía dependiendo de la sinapsis (Rizzoli and Betz, 2005).

El tamaño del RRP determina, parcialmente, la amplitud de las respuestas sinápticas. Modificaciones en el tamaño del pool, así como los cambios en la dinámica del ciclo de reciclado de vesículas, inciden sobre la eficiencia de liberación de las sinapsis y sobre su desempeño durante regímenes de actividad repetitiva (Sudhof, 2004; Hosoi et al., 2007).

2 Objetivos

2.1 Objetivo General:

Caracterizar las propiedades biofísicas y moleculares de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente transitoria entre las fibras mediales olivococleares y las células ciliadas internas del órgano de Corti (sinapsis MOC-CCI) durante el desarrollo postnatal, antes del comienzo de la audición.

2.1 Objetivos Particulares:

- Estudiar la eficacia de la transmisión sináptica en dos períodos del desarrollo postnatal.
- Caracterizar el tipo de plasticidad de corto término (STP) durante estos períodos.
- Determinar cuáles son los tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) que median la liberación de ACh en estas dos etapas del desarrollo.
- Determinar si existen mecanismos de modulación de la transmisión sináptica en ambos períodos.

3 Métodos

3.1 Disección del órgano de Corti

Se utilizaron ratones Balb/c de diferentes edades postnatales. El día de nacimiento se consideró como día 0 (P0, postnatal 0). Los ratones fueron sacrificados por decapitación de acuerdo a los lineamientos de la *American Veterinary Medical Associations' AVMA Guidelines on Euthanasia* (June 2007).

Las disecciones del órgano de Corti se realizaron bajo lupa (Leica MZ75, Wetzlar, Alemania) en ratones de edades desde P5 hasta P11. Luego de extraer la cóclea, se escindió la vuelta apical y posteriormente se removió la estría vascularis, el modiolo y la membrana tectorial. Las preparaciones se colocaron sobre un cubreobjetos con hilo de nylon para inmovilizarlas y luego se montaron en una cámara para registros electrofisiológicos bajo un microscopio Leica LFS (Leica DMLFS, Wetzlar, Alemania). El seguimiento visual de las preparaciones se realizó con contraste de interferencia diferencial (DIC) utilizando un objetivo de inmersión en agua 40X y una cámara con aumento de contraste (Hamamatsu C275410, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan). Los registros electrofisiológicos se realizaron inmediatamente luego de la disección y los mismos se prolongaron hasta un máximo de tres horas.

3.2 Soluciones

La preparación de cóclea fue continuamente bañada con una solución extracelular compuesta por (en mM): NaCl 155, KCl 5.8, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 0.9, NaH₂PO₄ 0.7, D-glucosa 5.6, y HEPES 10; pH 7.4; 300-320 mosmol kg⁻¹. Esta solución tiene una composición iónica similar a la de la perilinfa, solución que baña la base de las células ciliadas. Dado que el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es bloqueado por cationes divalentes (Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005), durante los experimentos se eliminó el Mg²⁺ de la solución extracelular.

Para registrar las corrientes sinápticas combinadas *nAChR+SK* se utilizó la solución intracelular KCl-EGTA conteniendo (en mM): KCl 135, MgCl₂ 3.5, CaCl₂ 0.1, ácido etilenglicol-bis(β -aminoetilester)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5, HEPES 5 y Na₂ATP 2.5, pH 7.2. La osmolaridad de las soluciones intracelulares varió entre 270 y 290 mosmol kg⁻¹.

3.3 Registros electrofisiológicos en las células ciliadas

Las células ciliadas fueron identificadas primero visualmente utilizando el objetivo 40X y luego por su capacitancia (de 7 a 12 pF) y por sus corrientes de Na⁺ y K⁺ características (Kros et al., 1998; Marcotti and Kros, 1999) (Figura 6 B y C). Para realizar los registros electrofisiológicos en las CClIs, luego de montar la preparación bajo el microscopio y exponer los axones eferentes, se removieron algunas células de soporte que se encuentran por encima de ellas utilizando una pipeta de limpieza. La pipeta de registro fue trasladada a través del tejido bajo presión positiva.

Los registros electrofisiológicos en las CClIs se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Las señales fueron filtradas a 2-10 kHz y digitalizadas a 5-20 kHz mediante una placa convertora analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los registros se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C). Se utilizaron pipetas de vidrio de 1.2 mm de diámetro con resistencias de 6-8 MΩ estiradas con un estirador de pipetas modelo PC-10 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA). Los registros en las CClIs se realizaron a potenciales de sostén ($V_{\text{sostén}}$) de -90 mV a menos que se aclare lo contrario.

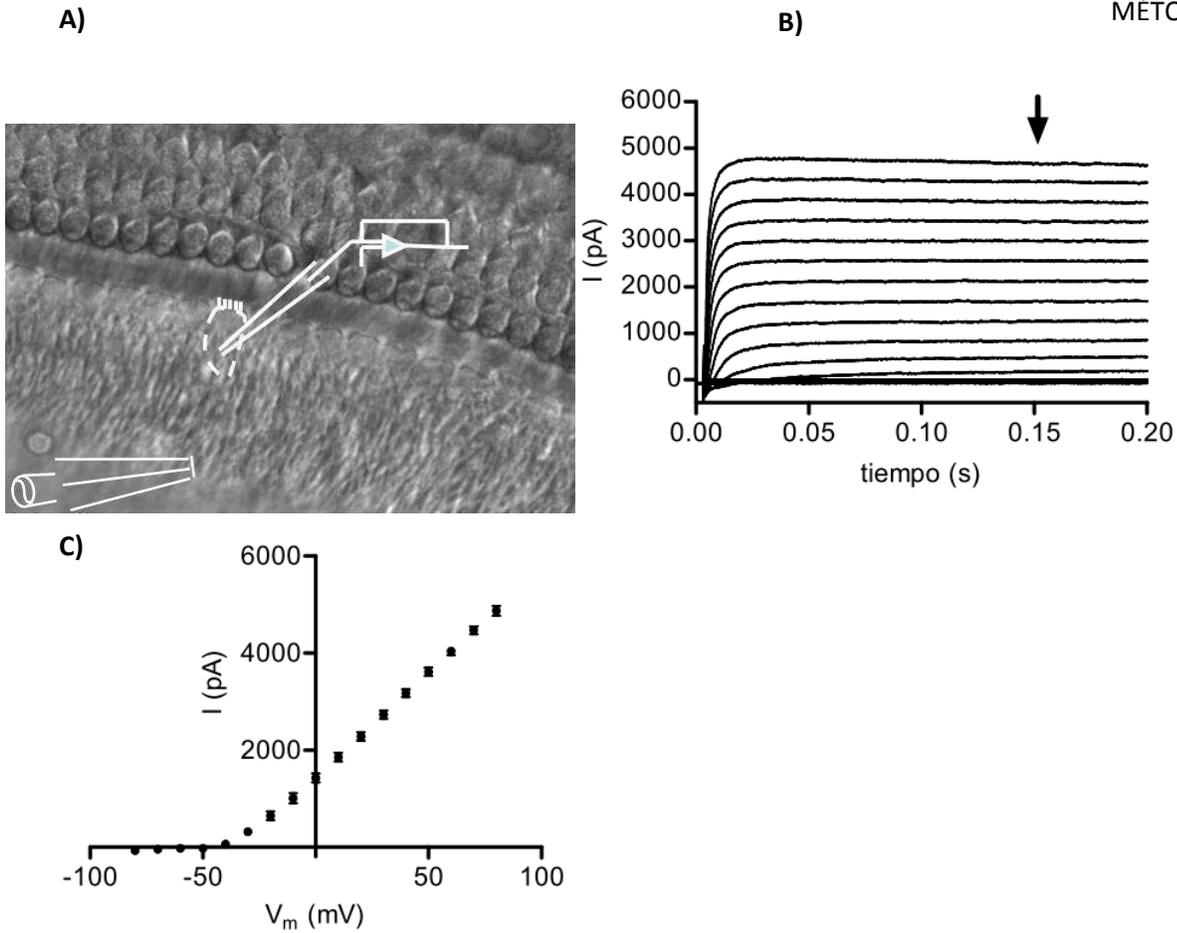


Figura 6: Esquema de registro y estimulación; identificación de las CCIs por sus características electrofisiológicas. A) En líneas punteadas se destaca la ubicación de la célula cilada interna con el esquema representativo de las posiciones de las pipetas de registro y estimulación. B) trazos representativos de las corrientes evocadas por el protocolo de corriente en función del voltaje utilizado para identificar a las células ciliadas. C) Curva corriente-voltaje (I-V) tipo correspondiente a 4 CCIs de un ratón de 7 días de edad. Los puntos muestran media \pm error estándar de la corriente evocada a cada voltaje.

3.4 Estimulación eléctrica de los axones eferentes MOC

Para producir la liberación de neurotransmisor desde los terminales eferentes, se utilizó un electrodo bipolar ubicado a 20-60 μM en dirección hacia el modiolos de la CCI bajo estudio, de acuerdo a los protocolos establecidos por (Goutman et al., 2005) (Figura 6). El estímulo eléctrico fue aplicado a través de una pipeta de vidrio de tipo theta de 20-80 μM de diámetro. La posición de la pipeta fue luego ajustada hasta que se observaron corrientes postsinápticas en forma consistente. Se utilizó una fuente de corriente constante aislada (Square Pulse Stimulator, modelo S48 de Grass Technologies, West Warwick, RI U.S.A.) que fue activada a través de la computadora

de adquisición, utilizando la placa conversora analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los estímulos generados fueron de hasta 30 mA de amplitud y de 200-1000 μ s de duración.

3.5 Estimación del contenido cuántico

Del Castillo y Katz, desarrollaron adecuadamente la estrategia estadística para analizar la naturaleza estocástica del fenómeno de transmisión sináptica (Del Castillo and Katz, 1954a). Propusieron que un terminal está dotado de una cantidad (N) de paquetes de ACh, que cada uno tiene una probabilidad (p) de ser liberado en respuesta a un impulso nervioso y que cada cuanto es liberado independientemente de los demás, lo que significa que la liberación de uno no tiene incidencia sobre la liberación de los demás. Así, en un experimento en el que se hiciera una gran cantidad de repeticiones, el contenido cuántico o número promedio de cuantos liberados por repetición (m) estaría dado por N, p , y el número de veces que la respuesta consistió en 1, 2, 3, ...x cuantos sería descrito por una distribución Binomial. Debido a que en la mayoría de las aproximaciones experimentales, la determinación directa de los parámetros N o p es difícil o imposible, se toma ventaja de una serie de propiedades de la distribución de Poisson. Esta distribución es una aproximación a la distribución Binomial cuando p tiene valores pequeños. La diferencia crucial radica en el hecho de que no es necesario conocer N o p para describir una distribución de Poisson. Solo es necesario medir su producto, m , el número de cuantos liberados por repetición. Así, para una distribución de Poisson, el número esperado de respuestas conteniendo x cuantos es:

$$n_x = N \left(\frac{m^x}{x!} \right) e^{-m}$$

Donde n_x es el número de respuestas compuestas por x cuantos.

Bajo condiciones de baja probabilidad de liberación del neurotransmisor, en las que la amplitud de las respuestas sigue una distribución de Poisson, m puede ser determinado a partir del número de fallas (para distinguirlo del m calculado por otros métodos se denominará mf), N_0 . Cuando $x=0$, la ecuación de Poisson se reduce a:

$$n_0 = N e^{-m}$$

Luego de un arreglo de la ecuación, se puede calcular el contenido cuántico como:

$$mf = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)$$

Además, el contenido cuántico puede ser calculado a partir del análisis directo de las amplitudes de la relación entre la amplitud promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas (eIPSCs) durante el protocolo de 200 repeticiones (considerando las fallas) y la amplitud promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas espontáneas (sIPSCs) (Del Castillo and Katz, 1954a).

En este trabajo, la amplitud de las corrientes evocadas se midió como la diferencia entre la línea de base, medida 2 ms antes de la aplicación del estímulo y el pico de la eIPSC. Para estimar el m , se utilizó una frecuencia de estimulación baja (1 Hz).

3.6 Evaluación del efecto de drogas y toxinas sobre el contenido cuántico.

Para evaluar el efecto de las drogas y toxinas antagonistas y agonistas de distintos canales iónicos sobre la liberación del neurotransmisor se incubó la preparación en solución salina normal y se añadió la droga cuyo efecto se deseaba evaluar. Se estimó m antes y después de la adición de la droga a intervalos regulares de tiempo. Los porcentajes se calcularon como

$$: \% = \frac{m_{remanente}}{m_{inicial}} \cdot 100$$

Donde $m_{remanente}$ es el contenido cuántico después de transcurrido el tiempo de incubación y $m_{inicial}$ es el contenido cuántico medido antes de iniciar la incubación, tanto en la condición control como en presencia de la droga. En todos los casos en que se incubaron drogas o toxinas, se realizó un solo experimento por ratón. Pasando a una nueva preparación para cada repetición.

Protocolos de estimulación utilizados para el estudio de la Plasticidad de Corto Terminio (STP)

Los trenes de estimulación utilizados para inducir STP consistieron en ráfagas de 10 pulsos eléctricos con intervalos entre estímulos de 100, 50, 25 y 10 ms. Tanto para el análisis de la STP como para la estimación del tamaño del pool de vesículas fácilmente liberables, en cada pulso la amplitud de corriente (ΔI) fue calculada entre la línea de base 2 ms antes de la detección del artefacto de estimulación y 10 ms posteriores (8 ms desde el momento de la estimulación).

Análisis de los datos

Las corrientes sinápticas espontáneas y las evocadas por uno o dos pulsos de estimulación, fueron identificadas visualmente y analizadas utilizando el programa Minianalysis 6.0.3 (Synaptosoft, Decatur, GA, USA). Los tiempos de crecimiento y decaimiento ($\tau_{\text{crecimiento}}$ y $\tau_{\text{decaimiento}}$) de las corrientes se ajustaron a funciones monoexponenciales. Las respuestas a los trenes de estimulación fueron analizadas utilizando Clampfit 10.2 (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) o con rutinas hechas a medida con el programa Matlab R2008b (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). El análisis estadístico y los gráficos fueron elaborados con Matlab y Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

3.7 Drogas y Toxinas

Las soluciones stock de ω -Conotoxina GVIA, ω -Agatoxina IVA e iberiotoxina, fueron preparadas en agua destilada, almacenadas en alícuotas a -20°C . Las mismas fueron diluidas en la solución extracelular previo al uso. Las soluciones stock de las dihidropiridinas: Nifedipina, Bay-K 8644 y Nitrendipina fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO; concentración final $<0,1\%$, esta concentración de DMSO no tiene ningún efecto sobre los parámetros evaluados en el presente estudio), almacenadas en alícuotas a -20°C y diluidas en la solución extracelular antes de ser usadas. La ω -Conotoxina GVIA fue comprada en Alomone Labs (Jerusalem, Israel). La ω -Agatoxina IVA fue comprada en Peptides International (Louisville, Kentucky 40299, USA). El resto de las drogas y sales fueron compradas en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

4 Resultados

4.1 Caracterización de la transmisión sináptica entre las fibras eferentes del sistema medial olivococlear (MOC) y las células ciliadas internas (CCI) durante el desarrollo postnatal

4.1.1 Respuestas sinápticas evocadas por estimulación eléctrica

Con el fin de estudiar las propiedades biofísicas de la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal previo al comienzo de la audición, se utilizó la preparación de órgano de Corti extraída en forma aguda de ratones en diferentes edades postnatales antes del comienzo de la audición.

En un trabajo previo en el que se analizó el perfil farmacológico de las eIPSCs realizado en preparaciones de órgano de Corti de ratas por (Goutman et al., 2005) y se compararon sus propiedades biofísicas y farmacológicas con las del nACh $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen et al., 2001; Gomez-Casati et al., 2005), se demostró que estas eIPSCs registradas en las CCIs ante la estimulación eléctrica de los axones eferentes, son el resultado de la actividad de los axones de las neuronas eferentes MOC.

Con el fin de corroborar la identidad de las respuestas sinápticas evocadas por estimulación eléctrica en preparaciones de órgano de Corti del ratón, se registraron eIPSCs en las CCIs a dos potenciales de sostén. La dependencia con el voltaje de las eIPSCs coincidió con lo reportado para las corrientes acopladas del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y el canal de K^+ SK2 evocadas por ACh aplicada en forma exógena (Gomez-Casati et al., 2005) (Figura 7 B, círculos vacíos) y con lo reportado para las eIPSCs registradas en las CCIs de la rata (Goutman et al., 2005).

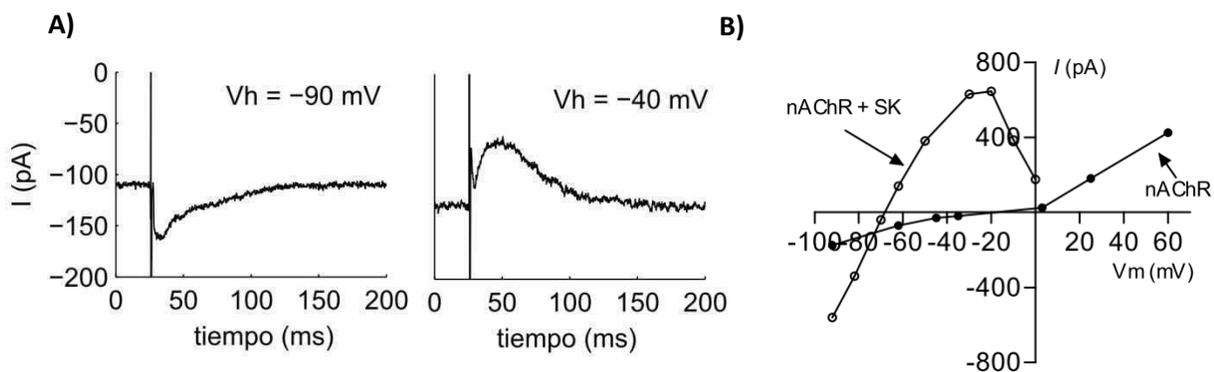


Figura 7: Identificación de las eIPSCs por su dependencia con el voltaje. Las corrientes sinápticas evocadas por estimulación eléctrica en la zona modiolar del órgano de Corti se identificaron en base a su relación característica con el voltaje. A) Trazos representativos de las eIPSCs mientras se sostuvo la célula ciliada a -90 mV o a -40 mV. B). Se muestra la relación entre el voltaje y la corriente producida por la activación del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ acoplado al canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} SK2 (círculos vacíos) o al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ aislado (círculos llenos). Extraído de (Gomez-Casati et al., 2005).

Debido a que las CClIs se mantienen en buenas condiciones durante períodos largos de tiempo (hasta 1 hora) a un potencial de membrana de -90 mV y que la relación entre la amplitud de las corrientes sinápticas y el ruido a este voltaje de sostén es elevada, todos los experimentos que se muestran a continuación fueron realizados a ese potencial. Dado que el potencial de reposo de las CClIs, es cercano a los -60 mV, esta sinapsis es de naturaleza inhibitoria. Para mantener la convención de nomenclatura, en este trabajo se conserva la denominación de IPSC (por su sigla en ingles: "*Inhibitory post synaptic currents*") para las corrientes sinápticas incluso cuando se registran solo corrientes entrantes.

En la Figura 8 se muestran registros, individuales y promediados, de las corrientes evocadas por estimulación eléctrica en cócleas extraídas de ratones de 6 y 10 días postnatales (P6 y P10). Un análisis cualitativo de los registros representativos muestra que hubo variaciones tanto en la cantidad de fallas de liberación como en la amplitud de las respuestas durante este período del desarrollo postnatal. Las respuestas sinápticas se clasificaron en: eventos sinápticos evocados con éxito (amplitud > a 5 pA) y fallas de liberación (amplitud < a 5 pA). El criterio se estableció considerando la mínima amplitud a partir de la cual se pueden identificar eventos sinápticos visualmente en forma unívoca.

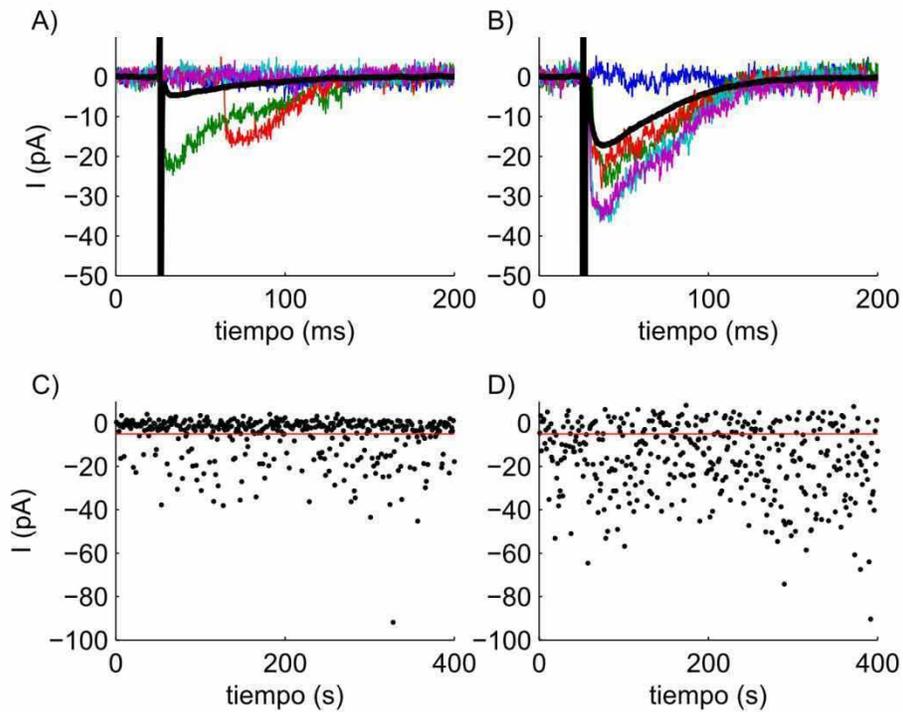


Figura 8: Respuestas sinápticas evocadas por estimulación eléctrica de las fibras MOC en ratones P5-7 y P9-11. Se muestran trazos representativos de las eIPSCs (frecuencia de estimulación: 1 Hz). El panel A) corresponde a respuestas registradas en el órgano de Corti de un ratón P6 y el B) a respuestas de un ratón P10. En color se muestran los trazos correspondientes a 5 respuestas individuales y en negro se muestra el promedio de 200 respuestas. Los paneles C) y D) corresponden a 400 respuestas evocadas a una frecuencia de 1 Hz en cócleas de ratones P6 y P10, respectivamente. Las líneas rojas marcan el umbral a partir del cual se consideraron respuestas sinápticas evocadas con éxito.

Para cuantificar el cambio observado en las respuestas, se comparó la amplitud de las respuestas evocadas en dos estadios postnatales: P5-7 y P9-11. Con ese fin se midieron 200 a 600 eventos sinápticos en cada una de las células registradas y se promediaron todas las corrientes evocadas, incluyendo las fallas. Se observó que la amplitud promedio de las eIPSCs aumentó significativamente de $6,9 \pm 0,9$ pA ($n=18$ células) en P5-7 a $20,8 \pm 2,3$ pA ($n=19$ células) en P9-11 (test de Student, $p < 0,0001$; Figura 9 A). Este aumento también se reflejó claramente en el corrimiento hacia la derecha de la curva de probabilidad acumulada de amplitudes (Figura 9 B).

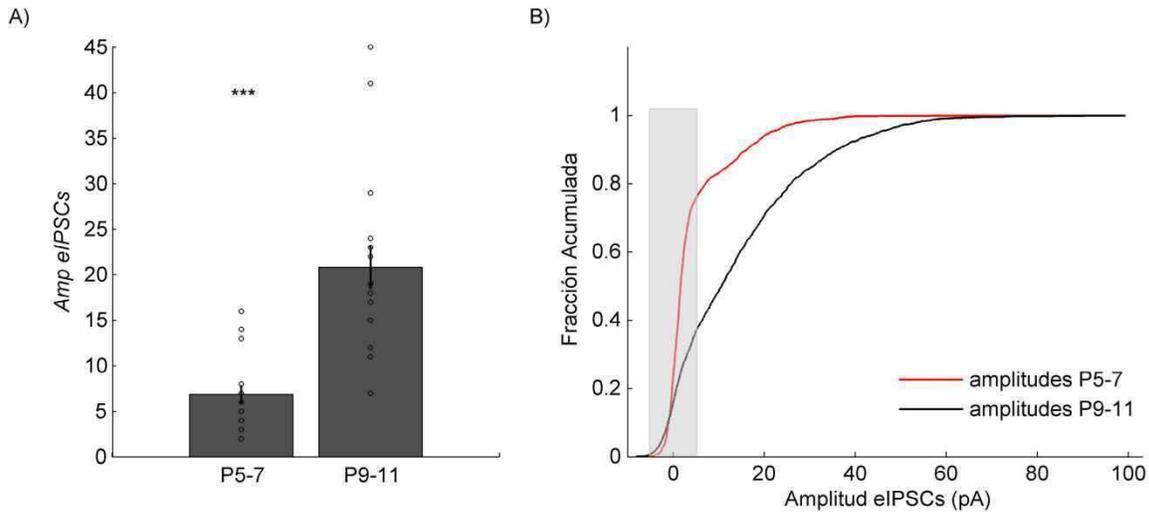


Figura 9: Amplitud de las respuestas evocadas durante el desarrollo postnatal. A) Valores de amplitud promedio de las respuestas evocadas por estimulación eléctrica medidos en cada célula. Cada Circulo representa el valor medido en una célula y las barras, la media \pm s.e.m. registrados en P5-7 y P9-11 (200-600 eventos por célula; $n=18$ y 19 células en P5-7 y P9-11, respectivamente, test de Student, $p<0,0001$). B) Fracción acumulada de la amplitud de las respuestas sinápticas evocadas. En rojo se muestra la distribución de las amplitudes correspondientes a eventos sinápticos registrados en células de ratones P5-7 y en negro las de P9-11 ($n=6$ células, 1800 eventos para P5-7 y $n=5$ células, 1800 eventos para P9-11). La caja gris indica el rango de amplitudes correspondiente a fallas de liberación.

Además, la comparación de las distribuciones de los eventos sinápticos mostró una disminución significativa en el porcentaje de fallas de liberación del $78 \pm 4\%$ en P5-7 ($n = 6$) al $34 \pm 4\%$ en P9-11 ($n = 5$) test de Student, $p<0,0001$).

Estos resultados muestran que la eficacia de la sinapsis MOC-CCI aumenta durante el desarrollo postnatal.

4.1.2 Respuestas sinápticas espontáneas

Las corrientes sinápticas espontáneas son producidas por la fusión de una vesícula a la membrana presináptica, lo que desencadena el volcado de su contenido a la brecha sináptica y la consecuente activación del receptor postsináptico. Dado que estos eventos tienen baja probabilidad de ocurrir y son independientes de la fusión de otras vesículas, la probabilidad de

que se fusionen espontánea y simultáneamente más de una vesícula es extremadamente baja (Fatt and Katz, 1952). Por estas razones, se asume que la amplitud promedio de las sIPSCs corresponde a la amplitud de la corriente producida por la liberación del contenido de una vesícula en la brecha sináptica (tamaño del cuanto) (Fatt and Katz, 1952; Del Castillo and Katz, 1954a).

La amplitud de las sIPSCs fue calculada como la diferencia de amplitud de corriente entre la línea de base, medida 30 ms antes del pico, y el máximo valor de corriente alcanzado durante el evento sináptico (pico). Las fases de crecimiento y decaimiento de las corrientes se ajustaron a funciones mono exponenciales a partir de las cuales se estimaron los tiempos característicos de cada fase ($\tau_{\text{crecimiento}}$ y $\tau_{\text{decaimiento}}$). El $\tau_{\text{crecimiento}}$ se calculó como el tiempo transcurrido, durante la fase de crecimiento, entre los puntos en que se alcanza el 10% y el 90% del pico. El $\tau_{\text{decaimiento}}$ se calculó como el tiempo transcurrido, durante la fase de decaimiento entre el 90% y el 37% de la amplitud de corriente correspondiente al pico.

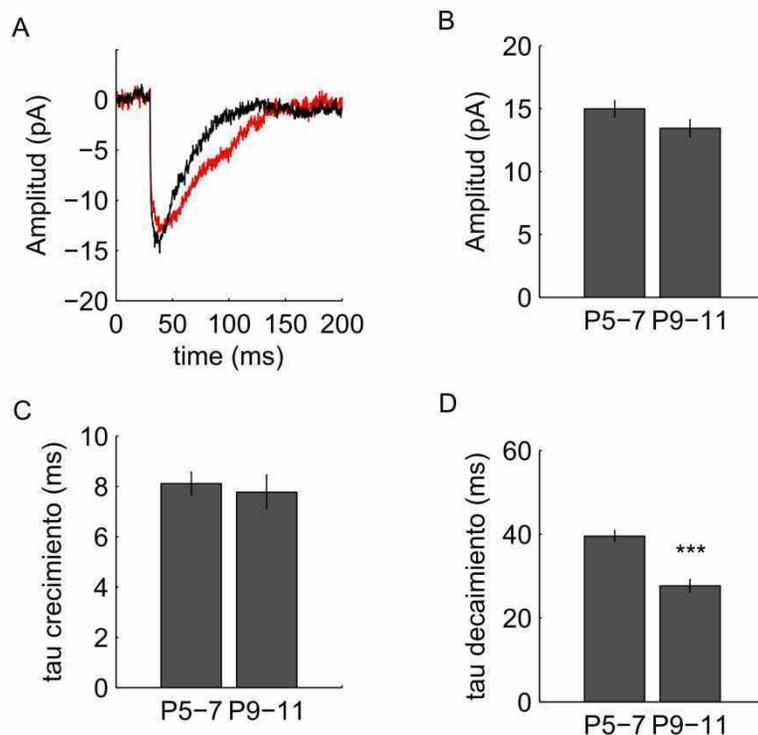


Figura 10: Corrientes sinápticas espontáneas en cócleas de ratones P5-7 y P9-11. A) Trazos promedio de 17 y 34 sIPSCs registradas en células ciliadas de ratones P6 (trazo rojo) y P9 (trazo negro), respectivamente. B) La

amplitud de las sIPSCs no cambió significativamente durante el período de desarrollo estudiado ($p=0.1459$). C) Los taus de crecimiento fueron similares en ambos estadios ($p=0.6886$). $n=30$ células, 1485 eventos, de ratones P5-7 y 14 células, 814 eventos, de P9-11. D) El tau de decaimiento de las sIPSCs registradas en cócleas de ratones P9-11 fue significativamente menor que las de P5-7 ($p<0.001$).

La amplitud de las sIPSC no cambió significativamente entre los dos grupos etarios estudiados ($15,0 \pm 0,6$ pA; $n= 27$ células, 1294 eventos y $13,4 \pm 0,7$ pA; $n=14$ células, 814 eventos para P5-7 y P9-11, respectivamente; Figura 10 B). Tampoco se encontraron variaciones significativas en el $\tau_{\text{crecimiento}}$ ($8,1 \pm 0,5$ y $7,8 \pm 0,7$ para P5-7 y P9-11 respectivamente, Test de Student, $p=0,6886$). Si bien se observó una disminución significativa del $\tau_{\text{decaimiento}}$ de las sIPSCs ($39,6 \pm 1,3$ ms y $27,7 \pm 1,5$ ms para P5-7 y P9-11 respectivamente, Test de Student, $p<0,001$), este no tendría influencia en las diferencias observadas en la amplitud de las respuestas sinápticas evocadas dado que a la frecuencia de estimulación utilizada (1Hz), la velocidad de decaimiento no incide sobre la amplitud de las respuestas. La frecuencia de aparición de sIPSCs fue de $0,15 \pm 0,04$ Hz para P5-7 y de $0,11 \pm 0,03$ para P9-11. No se encontraron diferencias significativas entre estos valores (test de Mann-Whitney, $p=0,5212$, $n=6$ y $n=4$ para P5-7 y P9-11, respectivamente).

Aunque los trabajos previos que reportan características de las sIPSCs de la sinapsis MOC-CCI realizaron sus mediciones a potenciales de sostén y en soluciones extracelulares levemente diferentes, las amplitudes y los parámetros cinéticos medidos en este trabajo resultaron similares a estos antecedentes (Glowatzki and Fuchs, 2000; Katz et al., 2004; Gomez-Casati et al., 2005; Goutman et al., 2005).

En conjunto, estos resultados muestran que el cambio observado en la fuerza de la sinapsis MOC-CCI no se debería a cambios en el tamaño del cuanto ni en la sensibilidad o en la actividad de los receptores postsinápticos.

4.1.3 Análisis del contenido cuántico (m) durante el desarrollo postnatal

El neurotransmisor es liberado cuando un potencial de acción arriba al terminal sináptico y activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV). El ingreso de Ca^{2+} incrementa fuertemente la probabilidad de que las vesículas ancladas a un sitio activo se fusionen en forma sincrónica a la membrana presináptica (Fatt and Katz, 1952; Del Castillo and Katz, 1954a). Cada vesícula contiene

una cantidad comparable de neurotransmisor, de manera que la respuesta postsináptica producida por la liberación de una sola vesícula, o respuesta cuántica (Q), es relativamente uniforme (Fatt and Katz, 1952).

En términos generales, todos aquellos procesos relacionados con la fusión sincronizada de vesículas a la membrana postsináptica determinan la probabilidad de que una vesícula sináptica vuelque su contenido a la brecha sináptica, mientras que los procesos relacionados con el llenado de las vesículas o con la modulación de la actividad de los receptores postsinápticos determinan la amplitud de la respuesta que produce la liberación del contenido de una sola vesícula sináptica (cuanto (Q), ver(Zucker and Regehr, 2002; Sudhof, 2004; Edwards, 2007). El contenido cuántico (m), el número promedio de vesículas liberadas cada vez que un potencial de acción arriba al terminal, se define como el producto entre el número total de sitios activos (N) y la probabilidad de cada vesícula de ser liberada (p) ($m = Np$). El m puede ser estimado en forma directa, calculando el cociente entre la amplitud promedio de las eIPSCs y de las sIPSCs ($m = \text{Amplitud media de las eIPSCs} / \text{Amplitud media de las sIPSCs}$; ver Métodos).

Cuando se analizó el m en P5-7 y P9-11 se observó un aumento significativo de 0.5 ± 0.1 en P5-7 a 1.5 ± 0.2 en P9-11 ($n=19$ y $n=18$ células, respectivamente; test de Student; $p<0.001$; Figura 11). Este resultado confirma que el aumento en las amplitudes de las respuestas sinápticas se explica principalmente por cambios en la presinapsis.

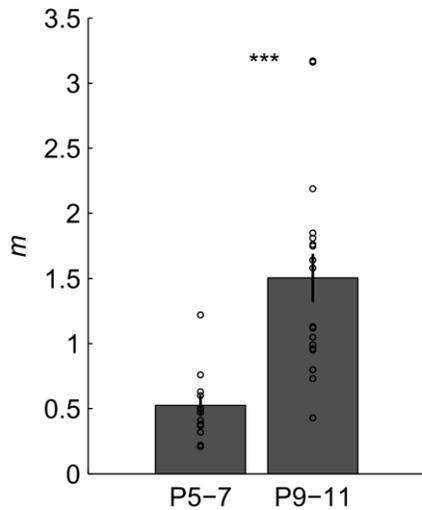


Figura 11: El contenido cuántico (m) aumenta durante el desarrollo postnatal. El m , estimado por el método directo (ver Materiales y Métodos), aumentó significativamente entre P5-7 y P9-11 ($n=19$ y $n=18$ células respectivamente; test de Student; $p<0,001$). Las estimaciones de la amplitud promedio de las eIPSCs fueron obtenidas de corrientes registradas durante protocolos de estimulación de 200 estímulos aplicados a una frecuencia de 1 Hz.

4.1.4 Sensibilidad de la liberación del neurotransmisor a los cambios en la concentración extracelular de $[Ca^{2+}]_e$ durante el desarrollo postnatal

En la mayoría de las sinapsis, como fue descrito inicialmente en la placa neuromuscular de la rana (Dodge and Rahamimoff, 1967), hay una relación no lineal entre la $[Ca^{2+}]_e$ y la cantidad de neurotransmisor liberado (Mintz et al., 1995; Borst and Sakmann, 1996; Wu et al., 1999; Bollmann et al., 2000; Schneggenburger and Neher, 2000; Rosato-Siri et al., 2002). Esta no-linealidad hace que pequeñas variaciones en la $[Ca^{2+}]_e$ en la actividad de los CCDVs presinápticos puedan tener un fuerte impacto sobre la transmisión sináptica.

Se estudió la relación entre la $[Ca^{2+}]_e$ y la liberación del neurotransmisor estimando el m en preparaciones bañadas con diferentes $[Ca^{2+}]_e$. Cada estimación se realizó a partir de un mínimo de 200 estímulos consecutivos aplicados a una frecuencia de 1Hz en cada $[Ca^{2+}]_e$. Las curvas se ajustaron a una función potencial ($m= A*[Ca^{2+}]_e^B$), de acuerdo al modelo propuesto para este

fenómeno (Dodge and Rahamimoff, 1967). En la figura 17 se muestran los valores de m medidos en cada $[Ca^{2+}]_e$ y los valores normalizados al valor del m obtenido en cada célula al incubar la preparación con $[Ca^{2+}]_e = 1,3$ mM. Para P5-7, el valor con el que se obtuvo el mejor ajuste al modelo fue de $B = 1 \pm 0,4$ para los valores crudos (Figura 12 A y B) y $B = 1,3 \pm 0,4$ para los valores relativizados ($n = 4-12$ células para cada $[Ca^{2+}]_e$; Figura 12 C). En cambio, la curva realizada en cócleas de ratones P9-11 ajustó mejor con $B = 2,4 \pm 0,7$ para los valores crudos (Figura 12 A y B) y con $B = 1,8 \pm 0,6$ para los valores relativizados ($n = 8-12$ células para cada $[Ca^{2+}]_e$; Figura 12 C). Los parámetros obtenidos a partir del ajuste realizado sobre cada pool de datos normalizados no difieren significativamente entre P5-7 y P9-11 (Criterio de Información de Akaike (AIC) = -4.070), indicando que la cooperatividad no cambia significativamente durante el período del desarrollo estudiado.

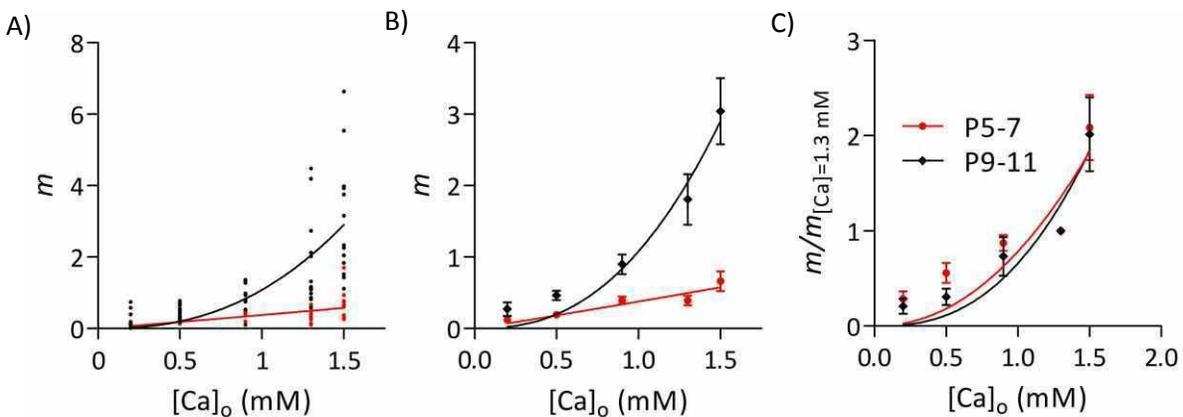


Figura 12: Relación entre el m y la $[Ca^{2+}]_e$. A) Valores de m para todas las concentraciones de Ca^{2+} utilizadas, medidos en cada una de las células registradas. B) Se muestran los mismos valores que en A promediados. Los puntos y las barras de error representan las medias \pm s.e.m. C) Los valores de m obtenidos para cada $[Ca^{2+}]_e$ se normalizaron a los valores de m obtenidos en $[Ca^{2+}]_e = 1,3$ mM. En todos los casos las líneas continuas representan el ajuste de los datos a una función potencial $m = A * ([Ca^{2+}]_e)^B$.

El agregado de Mg^{2+} en una concentración similar a la presente en la perilinfa que baña la parte basolateral del soma de las células ciliadas (0,9 mM), no produjo ningún cambio significativo en la sensibilidad de la liberación del neurotransmisor a los cambios en la $[Ca^{2+}]_e$ (AIC = -4,517). El mejor ajuste se obtuvo con $B = 2,5 \pm 0,7$ para los valores crudos de m y $B = 1,9 \pm 0,4$ para los valores normalizados ($n = 8-15$ células para cada $[Ca^{2+}]_e$; Figura 13).

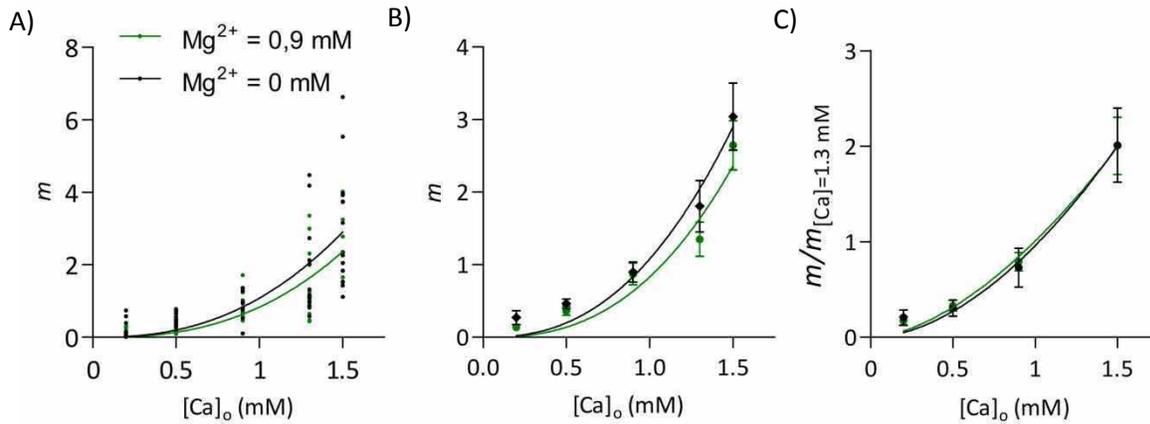


Figura 13: Relación entre el m y la $[Ca^{2+}]_e$ en presencia de Mg^{2+} . Valores crudos y relativizados del m para cada una de las $[Ca^{2+}]_e$ usadas en presencia (verde) y ausencia (negro) de $[Mg^{2+}]_e = 0,9$ mM. En A y B se muestran los valores crudos de m (desagregados y agregados, respectivamente) mientras que en B se muestran los valores normalizados respecto a los valores control de m medidos en $[Ca^{2+}]_e = 1,3$ (n = 8-15 células para $Mg^{2+} = 0,9$ y n = 8-13 para $Mg^{2+} = 0$).

4.2 Plasticidad de Corto Término en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo

4.2.1 Comparación de la STP en P5-7 y P9-11

Durante regímenes fisiológicos de actividad neuronal, la actividad sináptica está determinada por diversas formas de STP. La STP es el cambio que se produce en la eficiencia de la transmisión sináptica como consecuencia de la actividad precedente dentro de rangos de tiempo relativamente cortos (milisegundos). En algunas sinapsis, la actividad repetitiva produce procesos de facilitación y por lo tanto, un incremento de la fuerza sináptica, mientras que en otras, la fuerza sináptica decrece con la actividad repetitiva y predomina la depresión. En todos los casos, es evidente que varios procesos ocurren simultáneamente y el resultado es una combinación de facilitación y depresión altamente dependientes de la relación temporal existente entre los eventos sinápticos (Zucker and Regehr, 2002; Blitz et al., 2004; Deng and Klyachko, 2011; Fioravante and Regehr, 2011).

Desde la realización de trabajos fundacionales del estudio de la transmisión sináptica, se conocen fenómenos de STP asociados a la actividad repetitiva. En la placa neuromuscular, cuando dos estímulos son aplicados sucesivamente con un intervalo corto de tiempo entre pulsos, la amplitud del segundo potencial de placa (epp) está reducida en comparación al primero (Thies, 1965; Betz, 1970). En cambio, cuando los estímulos son aplicados en condiciones de baja probabilidad de liberación, por ejemplo habiendo aumentado la $[Mg^{2+}]_e$ y disminuido la $[Ca^{2+}]_e$, la respuesta al segundo pulso se ve aumentada (Del Castillo and Katz, 1954b; Thies, 1965; Katz and Miledi, 1968). A estos fenómenos se los denominó depresión por pulsos pareados (PPD) y facilitación por pulsos pareados (PPF), respectivamente. Esta clase de fenómenos se han observado en diversas preparaciones mostrando que la STP guarda una estrecha relación con el contenido cuántico siendo predominante la facilitación en aquellos sistemas o condiciones experimentales en los que m es bajo o la depresión, cuando m es alto (Debanne et al., 1996; von Gersdorff and Borst, 2002; Blitz et al., 2004).

Dado que la plasticidad de corto termino es uno de los determinantes de la función fisiológica de la sinapsis, se estudiaron los fenómenos de STP durante el desarrollo postnatal. Con el fin de inducir cambios en la fuerza sináptica se usaron protocolos de estimulación repetitiva de las fibras MOC. Los protocolos consistieron en trenes de 10 pulsos aplicados a frecuencias de 10, 20, 40 y

100 Hz (Figura 14). Se analizaron las amplitudes de las eIPSCs y la probabilidad de que un determinado pulso del tren evoque con éxito una corriente sináptica (P_x). Para comparar el cambio relativo producido por cada frecuencia de estimulación, las amplitudes promedio de las eIPSCs por cada pulso se normalizaron a la amplitud promedio de las corrientes en el primer pulso; S_x/S_1 .

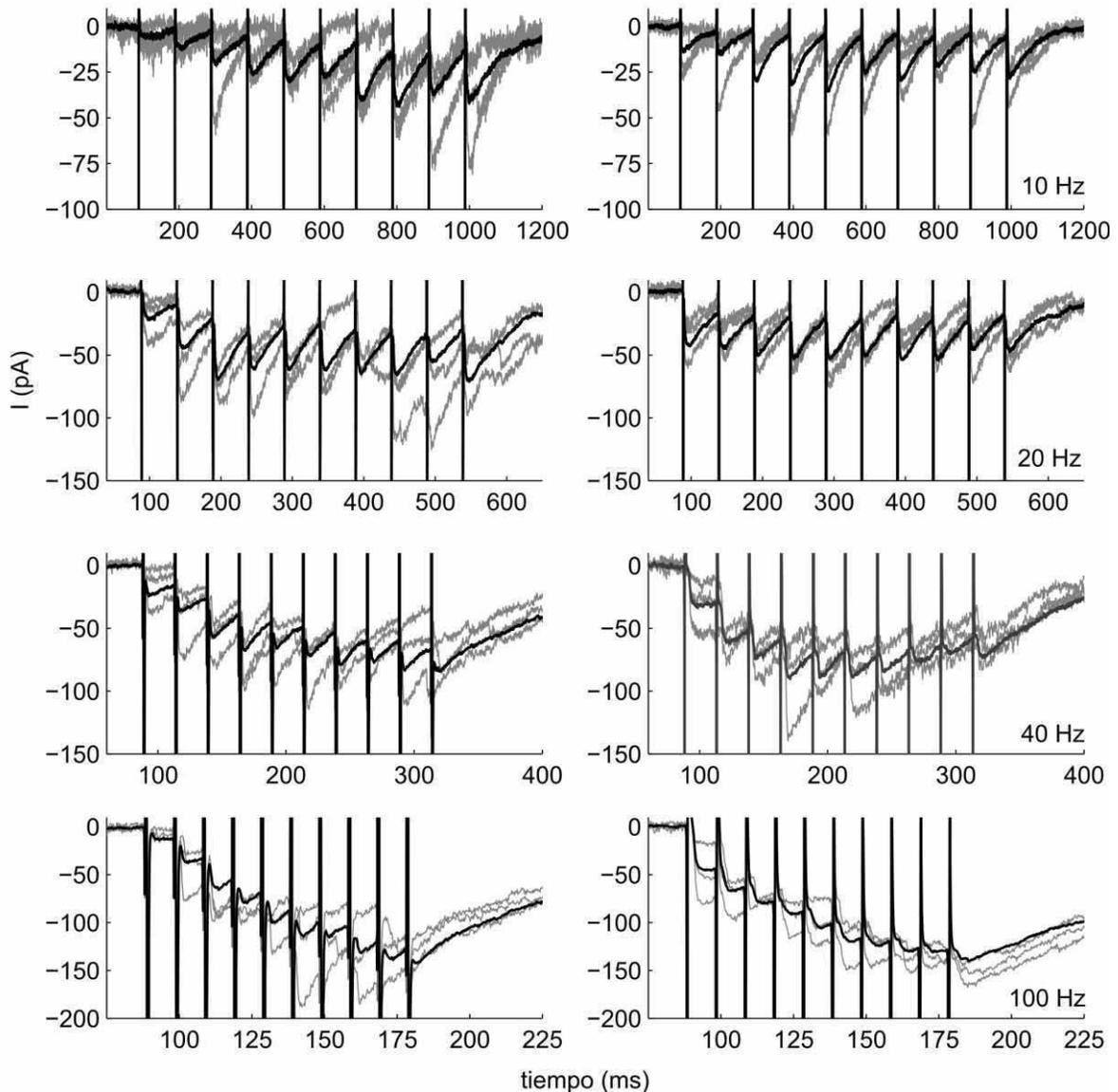


Figura 14: Trazos representativos de las respuestas evocadas por trenes de estimulación eléctrica de las fibras MOC. En gris se muestran trazos individuales y en negro, el promedio de diez registros consecutivos.

Los paneles de la izquierda corresponden a registros realizados en ratones P5-7 y los de la derecha, en P9-11; de arriba hacia abajo las frecuencias de estimulación fueron: 10, 20, 40 y 100 Hz, respectivamente.

Las diferentes frecuencias de estimulación modificaron tanto las amplitudes promedio de las eIPSCs evocadas por cada pulso de los trenes de estimulación como la probabilidad de evocar eventos sinápticos. Así, en aquellos casos en los que la respuesta promediada disminuyó su amplitud, se observó una disminución de las amplitudes individuales y en la probabilidad de observar eventos. El fenómeno inverso se observó en los casos en que la respuesta promediada aumentó su amplitud (Figura 14 y Figura 15). En ratones P5-7, la estimulación con trenes de bajas frecuencias (10 y 20 Hz) produjo un aumento en la amplitud de las eIPSCs (S_x/S_1) y en la probabilidad de liberación (P_x) que se mantuvo a lo largo de toda la duración del tren (Figura 20, círculos llenos). A mayores frecuencias de estimulación (40 y 100 Hz), se produjo un aumento seguido de una disminución tanto de S_x/S_1 como de P_x . En cambio, en las CCI de ratones del grupo P9-11 se observaron fenómenos de depresión tanto en la amplitud de las respuestas (S_x/S_1) como en la probabilidad de liberación (P_x), a todas las frecuencias de estimulación utilizadas.

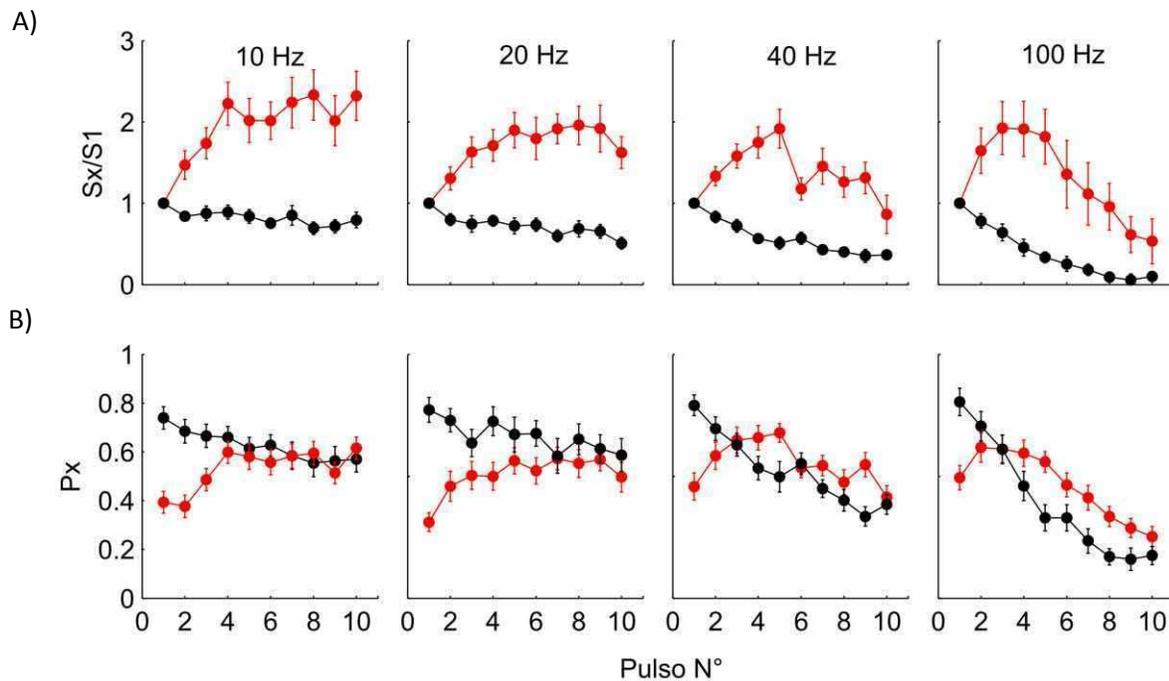


Figura 15: Cambios en las respuestas sinápticas evocadas por trenes de estimulación. A) Medias \pm s.e.m. de la amplitud normalizada de las corrientes evocadas por cada pulso de los trenes de estimulación en ratones de ambos grupos (S_x/S_1). B) Medias \pm s.e.m. de (P_x) la probabilidad de evocar con éxito una corriente sináptica ($n=18$ células para P5-7 y $n=20$ para P9-11; P5-7 rojo y P9-11, negro).

Para todas las frecuencias de estimulación utilizadas se observó que la probabilidad inicial era menor en los ratones P5-7 que en los P9-11. Este resultado es consistente con el cambio en el contenido cuántico, evaluado a una frecuencia de 1 Hz (ver sección 4.1.3), donde se evidenció un aumento en la eficacia de la sinapsis MOC-CCI en los ratones P9-11 con respecto a los P5-7.

Dado que para el análisis de la probabilidad de liberación no se consideran las amplitudes de las respuestas, las variaciones que se observan en este parámetro son consideradas indicadores de cambios en la presinapsis. En cambio, las variaciones observadas en las amplitudes, pueden estar influenciadas tanto por fenómenos presinápticos como por ejemplo, acumulación de calcio o cambio en la sensibilidad del sensor de Ca^{2+} , como por modificaciones en la postsinapsis.

Para determinar si existía correlación entre los cambios observados en P_x y los observados en S_x/S_1 , se realizó un análisis de correlación entre estas variables. Para cada pulso del tren se graficó el valor de P_x en función de S_x/S_1 y se ajustaron los datos a una función lineal. En ambos grupos (P5-7 y P9-11) se encontró un alto grado de correlación entre las variables analizadas para todas las frecuencias utilizadas (Figura 16).

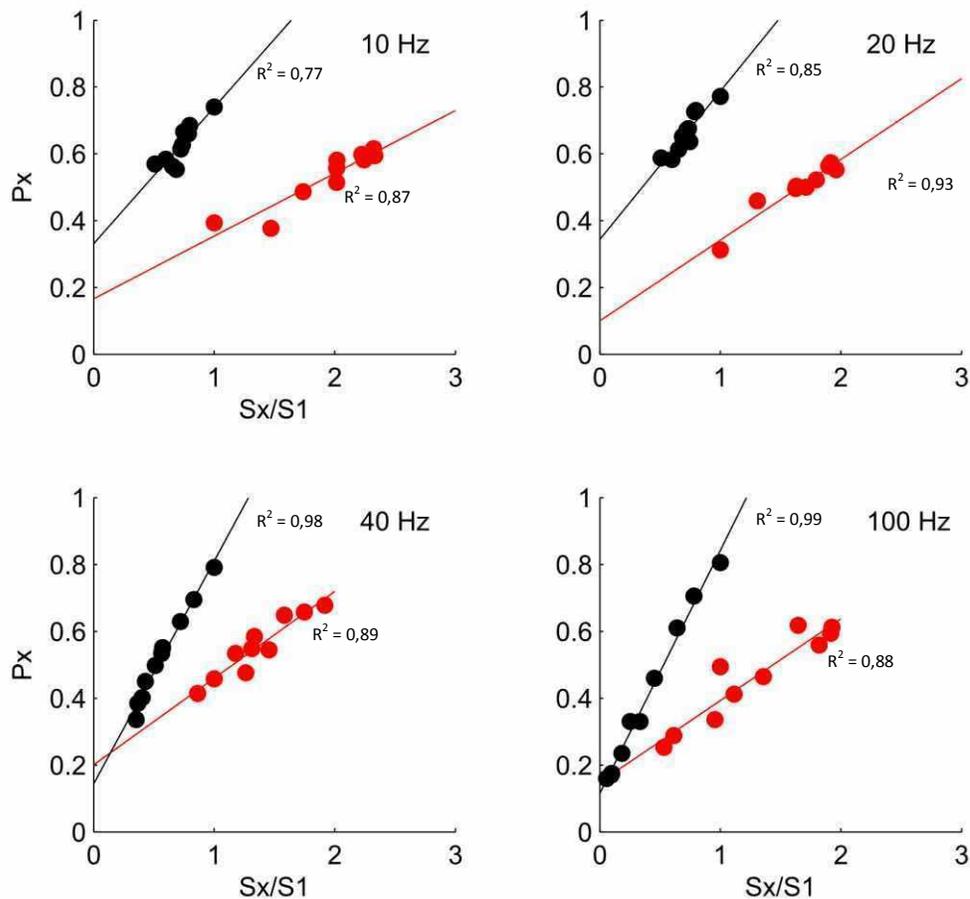


Figura 16: Análisis de la correlación entre las variables Px y Sx/S1. El análisis de correlación se hizo ajustando los datos a funciones lineales por el método de cuadrados mínimos, en cada caso se muestra el valor de R^2 correspondiente y la representación gráfica del modelo que mejor ajustó a los datos. Para todas las frecuencias se muestra la correlación entre las dos variables en ratones P5-7 (rojo) y P9-11 (negro).

Aunque no se puede establecer una relación causal a partir de la correlación existente, estos datos apoyan la hipótesis de que las principales causas del cambio observado a lo largo del desarrollo postnatal en la sinapsis MOC-CCI actúan sobre Px y por lo tanto son de origen presináptico.

Hasta aquí los resultados muestran que entre los períodos P5-7 y P9-11 existe un cambio en la eficacia de liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI. Asimismo, revelan que, durante el mismo período, tiene lugar un cambio drástico en el tipo de STP que desarrolla esta sinapsis pasando de un régimen de facilitación a uno de depresión.

4.2.2 STP en la sinapsis eferente transitoria a las CCI en ratas

Dado que el único antecedente de STP en la sinapsis eferente transitoria a las CCI reporta que existe facilitación de corto término en ratas de edades entre P7 a P11 (Goutman et al., 2005), se decidió evaluar la STP en cócleas de ratas en P10 de esa especie para determinar si se trataba de diferencias en las condiciones experimentales usadas en cada laboratorio o de diferencias entre especies. El análisis de S_x/S_1 y de P_x mostró que en ratas P10, la sinapsis eferente presenta facilitación de la respuesta sináptica y que la magnitud de los aumentos en las amplitudes de las eIPSCs producidos por las diferentes frecuencias de estimulación son similares a los reportados previamente por (Goutman et al., 2005) (Figura 17).

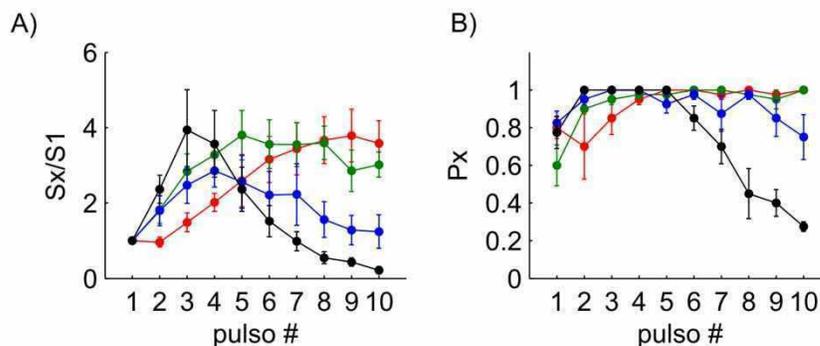


Figura 17: STP en ratas P10. A) Amplitudes de las corrientes sinápticas evocadas por cada pulso del tren en cada una de las frecuencias utilizadas (Rojo: 10 Hz, Verde: 20Hz, Azul: 40 Hz, Negro: 100 Hz). B) Probabilidad de que cada pulso del tren evoque una corriente sináptica. El código de colores indica las mismas frecuencias que en A. Los puntos representan las medias \pm s.e.m. (n=4 células en A y B)

4.2.3 Relación entre el contenido cuántico y el tipo de plasticidad de corto término

Existe una importante cantidad de antecedentes que muestran que los cambios en el contenido cuántico inciden directamente sobre el tipo de STP que presenta una sinapsis (Thies, 1965; Debanne et al., 1996; Schneggenburger et al., 1999; Holohean and Magleby, 2011). En términos generales, es aceptado que en las sinapsis que presentan una mayor eficacia de liberación predomina la depresión. Sin embargo, se ha demostrado que, en determinadas condiciones experimentales, un aumento en la eficacia de liberación en el cáliz de Held puede ser acompañado de una predominancia de la facilitación (Kushmerick et al., 2006) y en condiciones normales, pueden haber cambios en la STP sin cambio en el m (Iwasaki and Takahashi, 2001). Por otro lado,

experimentos realizados en rodajas de hipocampo mostraron que incluso en condiciones en que la probabilidad de liberación se ve disminuida, se mantienen los niveles de depresión de corto término normales (Hefft et al., 2002).

Con el fin de determinar si el cambio observado en la STP en la sinapsis MOC-CCI era producido por cambios a nivel presináptico que modifican el m , se realizaron experimentos en los cuales se manipuló el m por medio de cambios en la $[Ca^{2+}]_e$ y se evaluó en cada caso el tipo de STP.

En la Figura 18 A y B se muestra el efecto de aumentar la $[Ca^{2+}]_e$ de 1,3 mM a 1,5 mM en la solución utilizada para bañar las cócleas extraídas de ratones P5-7. El cambio en la concentración de este ion produjo un incremento significativo en el m (panel izquierdo; test de Student de medidas pareadas, $p < 0.01$; $n = 10$ células). Por otro lado, el análisis de la variación de S_x/S_1 a lo largo de un tren de 10 pulsos aplicados a una frecuencia de 100 Hz, reveló un cambio en el tipo de STP (panel derecho). Al estar bañada con una solución con $[Ca^{2+}]_e = 1,3$ mM (círculos llenos) la sinapsis mostró un patrón de facilitación seguido por depresión mientras que al aumentar la $[Ca^{2+}]_e$ predominó la depresión (círculos vacíos).

En forma consistente con el efecto producido en las cócleas de los ratones P5-7, una reducción de 200 μ M en la $[Ca^{2+}]_e$ en cócleas de ratones P9-11 produjo el efecto inverso. El m disminuyó significativamente (Figura 18 C) y la STP pasó de un régimen de depresión a uno de facilitación, seguido por depresión hacia la parte final del tren (Figura 18 D, círculos vacíos).

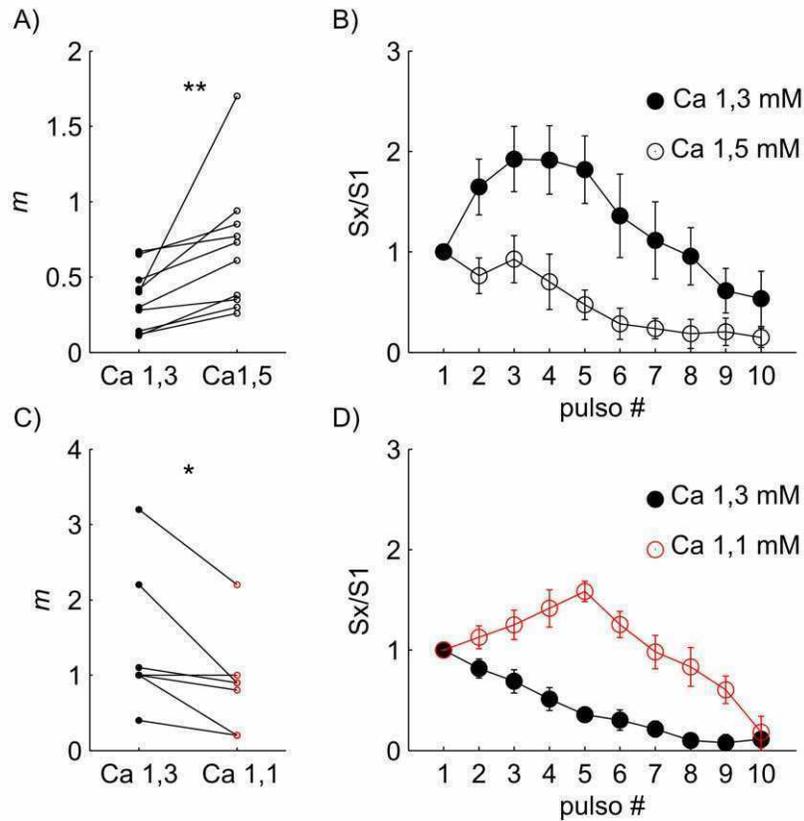


Figura 18: El patrón de STP resultó sensible a las modificaciones en la Ca^{2+}_e en ambos estadios postnatales estudiados. A) En las cócleas de ratones P5-7 el m aumentó significativamente ($p < 0.01$; $n = 10$ células) al incrementar la $[Ca^{2+}]_e$ de 1,3 mM a 1,5 mM. B) Las medias \pm s.e.m. de $Sx/S1$ obtenidas durante trenes de estimulación aplicados a preparaciones incubadas en soluciones salinas normales con $[Ca^{2+}]_e = 1,3$ mM (círculos llenos; $n = 12$ células) y $[Ca^{2+}]_e = 1,5$ mM (círculos vacíos; $n = 5$ células). Los valores de $Sx/S1$ disminuyeron significativamente (ANOVA de dos vías; medidas repetidas $p < 0,05$, $F = 6,144$ para el factor $[Ca^{2+}]_e$). C) En P9-11, el m disminuyó significativamente ($p < 0,05$; test de student; $n = 7$ células) al cambiar la concentración extracelular de Ca^{2+} de 1,3 a 1,1 mM. D) Medias \pm s.e.m. de $Sx/S1$ obtenidas durante trenes de estimulación aplicados a preparaciones incubadas en soluciones salinas normales con $[Ca^{2+}]_e = 1,3$ mM (círculos llenos; $n = 10$ células) y $[Ca^{2+}]_e = 1,1$ mM (círculos vacíos; $n = 7$ células). Los valores de $Sx/S1$ aumentaron significativamente al disminuir la $[Ca^{2+}]_e$ (ANOVA de dos vías; medidas repetidas $p < 0,001$, $F = 50,58$).

En conjunto, estos datos sugieren que los cambios observados en la STP podrían deberse en parte a los cambios que se producen a nivel de la liberación del neurotransmisor (i.e., contenido cuántico) durante el desarrollo postnatal de la sinapsis MOC-CCI.

4.2.4 Dependencia de la STP con el contenido cuántico inicial.

Debido a que esta sinapsis tiene un bajo contenido cuántico ($m = 0.5 \pm 0.1$ en P5-7 y $m = 1.5 \pm 0.2$ en P9-11), la amplitud de las respuestas individuales es muy variable entre eventos. Con el fin de determinar si existe una relación entre la eficiencia de la liberación del neurotransmisor y el tipo STP a nivel de eventos individuales, se analizaron las amplitudes de las eIPSC en cada repetición. La relación entre la amplitud del primer pulso y el cociente entre la amplitud del segundo y la del primero (PPR por sus siglas en inglés “*paired-pulse ratio*”) para cada trazo individual, mostró que existe una relación entre la cantidad de neurotransmisor liberado y el tipo de plasticidad que desarrolla la sinapsis incluso a nivel de pares de eventos. En la Figura 19 se muestra el cambio en la proporción de pares de eventos en los que hay facilitación. El alto porcentaje de eventos de baja amplitud inicial seguidos de facilitación fue remplazado por un porcentaje alto de eventos con amplitudes mayores seguidos de depresión sináptica (PPR<1). En P5-7 el $50,3 \pm 1,4\%$ del total de los pares analizados resultó tener un PPR > 1 mientras que en P9-11 este valor fue del $26,6 \pm 1,1\%$ ($p < 0,0001$; $n=10$ y $n=11$ para P5-7 y P9-11, respectivamente).

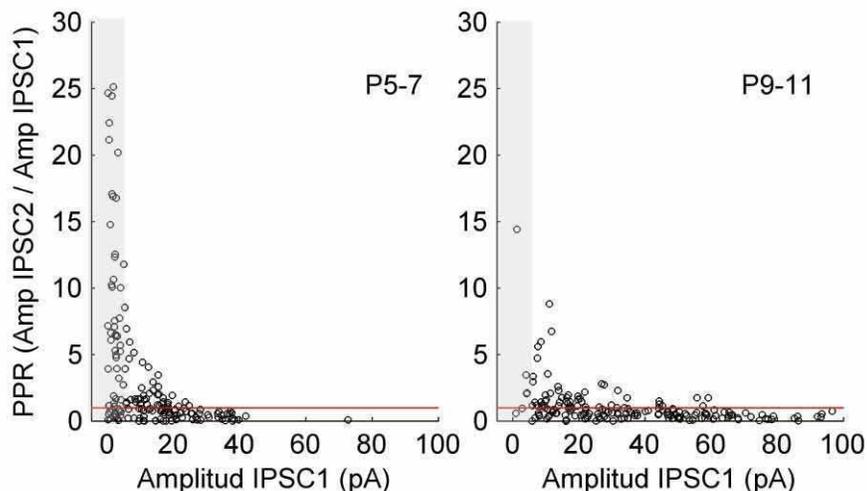


Figura 19: Relación entre la amplitud del primer pulso y el PPR. En el panel de la izquierda se muestran los datos de preparaciones de P5-7 y a la derecha los de P9-11 ($n=10$ y 11 células, respectivamente; 170 eventos para cada grupo). El intervalo de tiempo entre estímulos fue de 10 ms. En rojo se marca el punto en el cual

no hay diferencias de amplitud entre el primero y el segundo pulso (PPR = 1). El sombreado gris indica el área correspondiente a aquellos eventos con amplitud menor a 5 pA (fallas de liberación).

4.2.5 Estimación del tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas

El tamaño de la respuesta sináptica depende, entre otros factores, del tamaño del pool de vesículas sinápticas listas para ser liberadas (RRP, por su sigla en inglés “readily releasable pool”). Para estimarlo, se usó la estrategia de “vaciado” del terminal mediante estimulación eléctrica del axón. Este consiste en aplicar un protocolo de estimulación de los axones tal que induzca la liberación de todas las vesículas del pool hasta alcanzar una condición estacionaria en la que solo se liberen aquellas vesículas que reabastezcan el terminal (Schneggenburger et al., 1999). Para ello, se utilizaron trenes de estimulación de 50 pulsos a 100 Hz. Este protocolo induce la liberación de todas las vesículas que, antes del inicio del protocolo, están listas para ser liberadas y es suficientemente largo como para alcanzar la condición estacionaria. En la Figura 20 se muestran trazos representativos de las respuestas sinápticas evocadas por este protocolo de estimulación. Una vez alcanzada la condición estacionaria, solamente se liberan aquellas vesículas que cumplieron con todo el proceso de reciclado y reabastecen el RRP (Sudhof, 2004; Rizzoli and Betz, 2005).

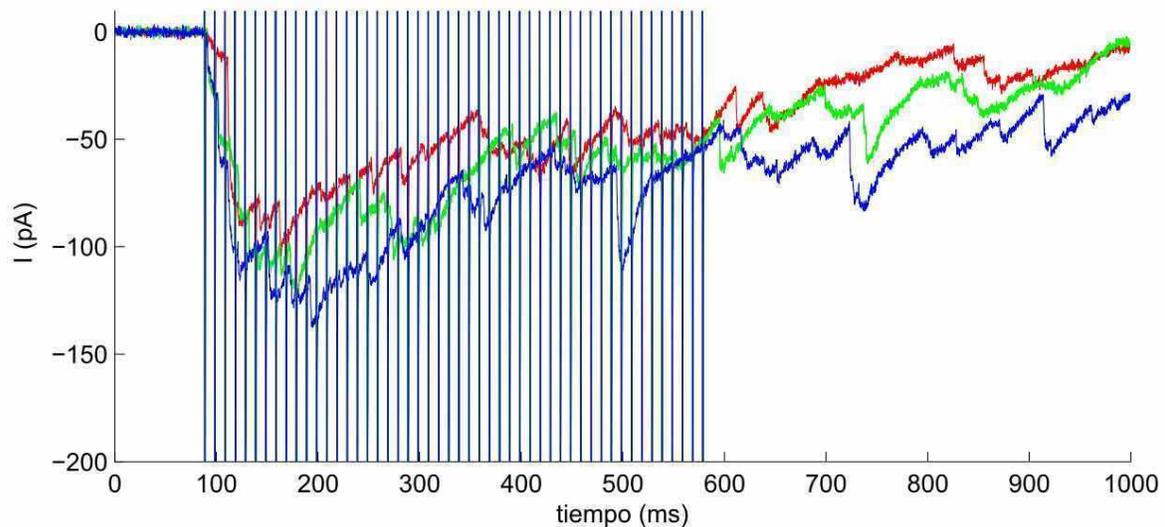


Figura 20: Trazos representativos de las corrientes sinápticas evocadas al aplicar el protocolo de 50 pulsos a 100 Hz usado para estimar el tamaño del RRP. La tasa de liberación disminuye durante el transcurso del tren hasta alcanzar una tasa de liberación constante. Se muestran tres trazos superpuestos (uno en cada color).

El tamaño del pool se determinó graficando la amplitud acumulada de las corrientes sinápticas evocadas en cada uno de los pulsos del tren (Figura 21) y ajustando la parte final de la curva a una función lineal. La regresión se realizó a partir de los últimos 20 puntos de la curva, donde la linealidad se cumple para todas las células en las que se registró. El punto de la ordenada al origen corresponde a la amplitud de corriente que se produciría si en un instante se volcara la brecha sináptica el contenido de todas las vesículas del pool. El cociente entre la ordenada al origen y el tamaño del cuanto (estimado como la amplitud promedio de las sIPSCs) es igual al número de vesículas que conforman el RRP.

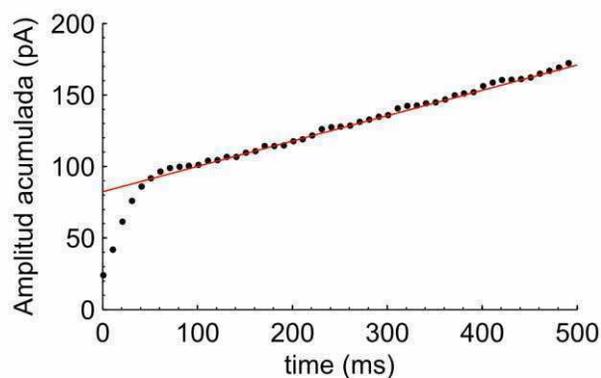


Figura 21: Estimación del tamaño del RRP en la sinapsis MOC-CCI. Amplitud acumulada de las corrientes sinápticas evocadas por cada uno de los pulsos del protocolo utilizado para estimar el tamaño del RRP en una preparación de órgano de Corti de ratones P6.

En el caso que se muestra en la figura, el tamaño del RRP es de 82,3 pA: Al dividir este valor por el tamaño del cuanto medido en el grupo P5-7 (15 pA), corresponde a 5,5 vesículas sinápticas.

4.2.6 Tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas durante el desarrollo

Se estimó el tamaño del RRP para cada uno de los grupos estudiados usando la metodología descrita más arriba. En la Figura 22 A se muestran los tamaños de RRP, expresados en valores de corriente, obtenidos en 10 células de ratones P5-7 y en 7 de P9-11. En la Figura 22 B se muestran

los valores que resultan de dividir los valores obtenidos a partir de las regresiones para el tamaño del RRP por el tamaño del cuanto (amplitud de la sIPSC). Se obtuvo un aumento significativo en el tamaño del RRP de $4,7 \pm 1$ vesículas en P5-7 a $10,7 \pm 2,3$ vesículas en P9-11 ($n = 10$ y 7 células para P5-7 y P9-11, respectivamente; test de Student, $p < 0,001$).

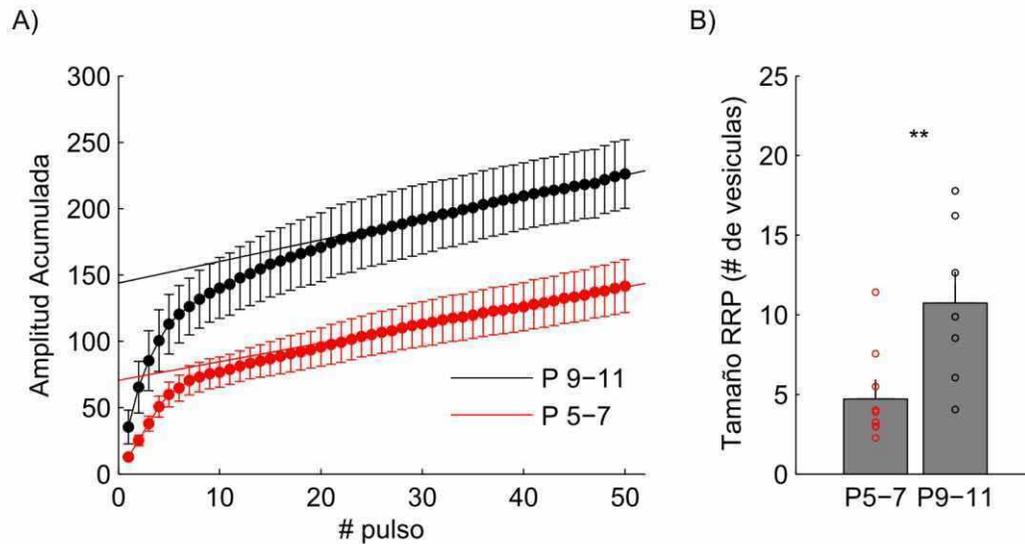


Figura 22: Comparación del tamaño de los RRP estimados en cada uno de los estadios postnatales estudiados. En el panel A) se muestra la amplitud acumulada promedio de las respuestas medidas para cada pulso del tren de estimulación. Las líneas continuas roja y negra representan las regresiones lineales correspondientes a P5-7 y a P9-11, respectivamente. B) Los círculos representan los tamaños del RRP medidos en cada célula. Las barras representan las medias \pm s.e.m. ($n = 10$ para P5-7, círculos rojos y $n = 7$ para P9-11, círculos negros; test de Student, $p < 0,01$).

Experimentos realizados en el cáliz de Held en los cuales se interfirió con el reabastecimiento de vesículas al RRP, demostraron que la dinámica del reciclado de vesículas determina no solo el tamaño de las eIPSCs sino también el tipo de STP que muestra una sinapsis (Hosoi et al., 2007).

Con el fin de determinar si durante el periodo del desarrollo estudiado se producen cambios que incidan en la eficiencia de la sinapsis MOC-CCI para mantener constante el RRP, se compararon las pendientes obtenidas a partir del análisis de la fase de liberación estacionaria alcanzada durante la aplicación de protocolos de estimulación de alta frecuencia. Como en el caso particular mostrado en la Figura 21, al analizar las amplitudes de las corrientes evocadas durante la aplicación del tren de estimulación, se observó una fase lineal en todas las células en que se registró. La pendiente de

esta fase está determinada por la tasa con que se reabastece de vesículas el RRP. En P5-7 la tasa promedio de recuperación es de $9,4 \pm 1,2$ vesículas/s mientras que en P9-11 fue de $12,2 \pm 0,7$ vesículas/s. La diferencia no resultó estadísticamente significativa (test de Student, $p=0,1035$; $n=10$ y $n=7$ para P5-7 y P9-11, respectivamente, Figura 23).

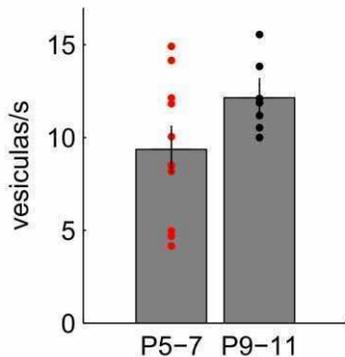


Figura 23: Comparación de las tasas de reabastecimiento del RRP. Los valores individuales de las pendientes obtenidas para cada ajuste se muestran en círculos rojos (P5-7) y negros (P9-11). Las barras indican los valores medios correspondiente a cada grupo (media \pm s.e.m.).

En conjunto, estos resultados muestran que entre los períodos postnatales 5-7 y 9-11 el número de vesículas disponibles para ser liberadas ante la llegada de un potencial de acción aumenta y que los cambios producidos durante este período no inciden sobre la eficiencia de la sinapsis para reabastecer el RRP.

4.2.7 Estimación de la probabilidad de liberación de cada sitio activo

Con el fin de obtener una estimación de la probabilidad de que cada sitio activo libere una vesícula (Pr), se calculó el cociente entre la cantidad de vesículas que se liberan en promedio cada vez que se estimula eléctricamente la fibra eferente (m) y el número de vesículas listas para ser liberadas (tamaño del RRP). Con esta aproximación, se obtuvo un valor de Pr para cada célula en que se estimó el tamaño del RRP (Figura 24). No se observó una diferencia significativa entre las Pr estimadas en ratones P5-7 y los P9-11 (test de Student, $p=0,3265$). En P5-7 la Pr fue: $0,23 \pm 0,03$ ($n=10$ células) mientras que en P9-11 fue: $0,18 \pm 0,04$ ($n=7$ células).

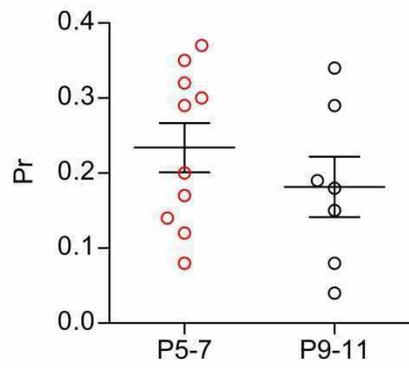


Figura 24: Estimación de la probabilidad de liberación de una vesícula sináptica asociada a cada sitio activo. A partir de los m y los tamaños de RRP estimados para cada célula se calculó la Pr (m /tamaño RRP). Valores de cada célula (círculos rojos: P5-7 y negros: P9-11), Las barras muestran las medias \pm s.e.m.

4.3 Canales de iónicos que sostienen y/o modulan la liberación del neurotransmisor

4.3.1 Canales de Ca^{2+} que median la liberación del neurotransmisor en P9-11

Para abordar el objetivo de la determinación de los tipos de CCDVs que sostienen la liberación del neurotransmisor, en primer lugar se comprobó si, en las condiciones experimentales utilizadas, era posible evocar la transmisión sináptica en forma reproducible durante períodos de tiempo suficientemente largos como para evaluar el efecto de las toxinas antagonistas de los CCDV. Además, se evaluó si los protocolos utilizados para determinar el m inducían, per se, algún tipo de plasticidad o cambio en las respuestas sinápticas. Para ello se realizaron estimaciones del m cada 5 minutos, durante experimentos de hasta 60 minutos de duración. Cada estimación del m se hizo a partir de 200 estímulos consecutivos aplicados a una frecuencia de 1 Hz. En la Figura 25 se muestran estimaciones de m a diferentes tiempos.

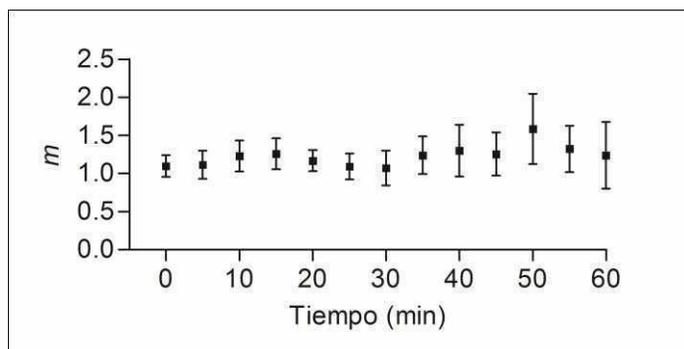


Figura 25: El contenido cuántico se mantiene estable a lo largo del tiempo de experimentación. Se estimó el m cada 5 minutos durante 60 minutos. Con el protocolo de estimulación de 1 Hz, el valor del m se mantuvo estable durante 60 minutos. ($n=14$ -4CCIs en cada tiempo; $p=0,9930$ ANOVA de una vía).

En la Figura 25 se muestra que durante la aplicación de los protocolos de estimulación el contenido cuántico se mantuvo constante durante, por lo menos, 60 minutos ($t=30$ min: $m = 1,1 \pm 0,2$; $n=8$; $t=60$ min: $m = 1,2 \pm 0,4$; $n=4$). Para obtener una estimación del m independiente de las amplitudes de las IPSC, se utilizó el método de fallas ($mf = \log N/N_0$; ver métodos). Las estimaciones de m realizadas por el método de fallas a lo largo del tiempo fueron similares a las obtenidas por el método directo (30 min, $mf = 1,0 \pm 0,3$; 60 min, $mf = 1,4 \pm 0,7$).

Los dos tipos de CCDVs que más comúnmente median la liberación del neurotransmisor en sinapsis de mamíferos son los del tipo P/Q y N (Reid et al., 2003; Snutch, 2005; Catterall, 2011). Estos CCDV pueden ser fácilmente distinguidos por su sensibilidad a la toxina de la araña *Agelenopsis aperta*, ω -Agatoxina IVA 200 nM (ω -Aga) y a la toxina del caracol marino *Conus geographus*, ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx), que bloquean específicamente los canales del tipo P/Q y N, respectivamente (Olivera et al., 1994; Mintz et al., 1995; Randall and Tsien, 1995; Doering and Zamponi, 2003). Para estudiar los tipos de canales que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis eferente transitoria a las CCI estudiamos el efecto de las toxinas antes mencionadas sobre el contenido cuántico de la liberación de ACh.

La amplitud de las eIPSCs se redujo marcadamente luego de 15 minutos de incubación en solución extracelular con ω -Aga 200 nM, mientras que las amplitudes de las sIPSCs se mantuvieron sin cambios significativos respecto al control (control, $11,8 \pm 0,6$ pA; ω -Aga200 nM, $11,1 \pm 0,8$ pA; $p=0,1279$; Figura 27). Bajo esta condición, el m se redujo al $44,6 \pm 6,8$ / del m_{inicial} ($0,9 \pm 0,1$; $p<0,001$ $n=6$ células, Figura 28). Consistentemente, el porcentaje de fallas de liberación aumentó de un $40,0 \pm 6,8$ a un $70,5 \pm 5,1$ / ($p<0,001$, 6 células). El m , estimado por el método de fallas (mf) se redujo de $mf = 1,1 \pm 0,3$ (control) a $mf = 0,4 \pm 0,1$ (ω -Aga). No se probaron mayores concentraciones dado que se ha demostrado en diversas preparaciones que una concentración de ω -Aga de 200 nM es suficiente para bloquear completamente las corrientes del tipo P y Q o P/Q (Mintz et al., 1992; Randall and Tsien, 1995; Katz et al., 1997; Bourinet et al., 1999). Además, se ha demostrado que concentraciones más altas de esta toxina tienen efectos inespecíficos sobre los CCDVs del tipo N (Sidach and Mintz, 2000).

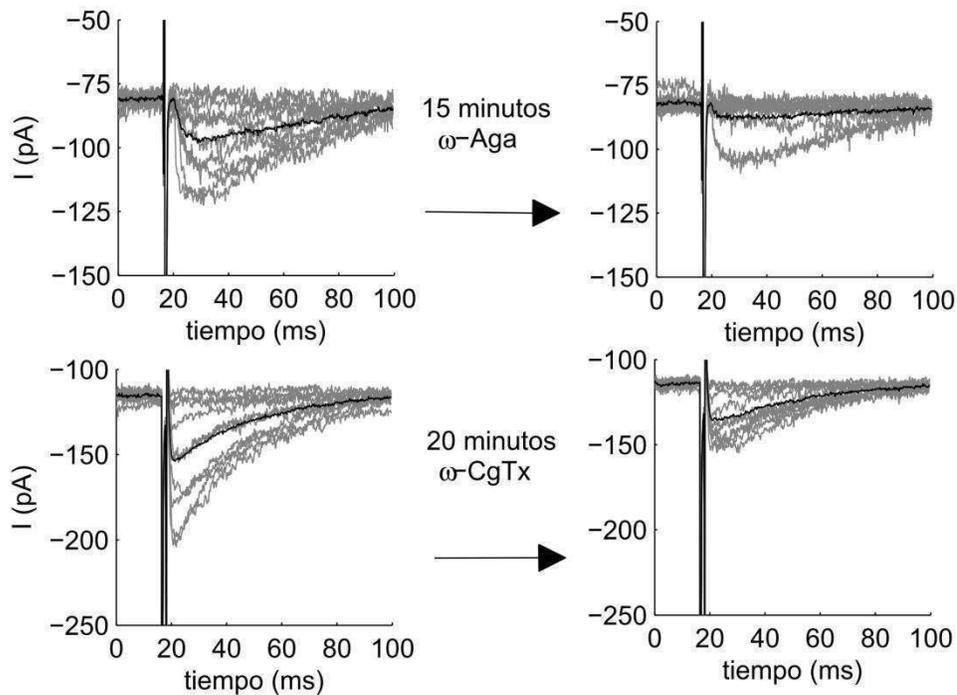


Figura 26: Trazos representativos de las corrientes sinápticas registradas antes y después de incubar las preparaciones con solución extracelular a la que se le agregó ω -CgTx 300 nM o ω -Aga 200 nM. En gris se muestran 10 trazos individuales superpuestos para cada una de las condiciones mientras que en negro se muestra el trazo que resulta de promediar los anteriores.

También se evaluaron los efectos del antagonista de los CCDVs del tipo N, la ω -CgTx, sobre la liberación del neurotransmisor. Esta toxina no afectó la amplitud de las sIPSCs (control, $13,4 \pm 0,9$ pA; ω -CgTx300 nM, $13,0 \pm 0,9$ pA; $p=0,4095$; 1002 eventos, 7 células; Figura 27). En este caso, la liberación del neurotransmisor también fue bloqueada parcialmente luego de 20 minutos de incubación con ω -CgTx300 nM. El m se redujo a un $55,8 \pm 15,2\%$ del valor inicial ($m_{\text{inicial}} = 1,1 \pm 0,5$; $p < 0,01$; $n=6$ células; Figura 28). De forma consistente con este resultado, el porcentaje de fallas de liberación se incrementó de un $37,8 \pm 9,8$ a un $49,7 \pm 13,2\%$ ($p < 0,05$; 6 células) y mf se redujo de $0,9 \pm 0,2$ (control) a $0,6 \pm 0,2$ (ω -CgTx300 nM). Como en otros trabajos se había reportado el bloqueo de los CCDV del tipo N a concentraciones mayores de ω -CgTx (Boland et al., 1994; Katz et al., 1997), se probó el efecto de ω -CgTx 1 μ M sobre el m . Esta concentración no produjo una mayor reducción ($p=0,5644$, con respecto a la reducción observada al usar ω -CgTx 300 nM, $n = 3$ células).

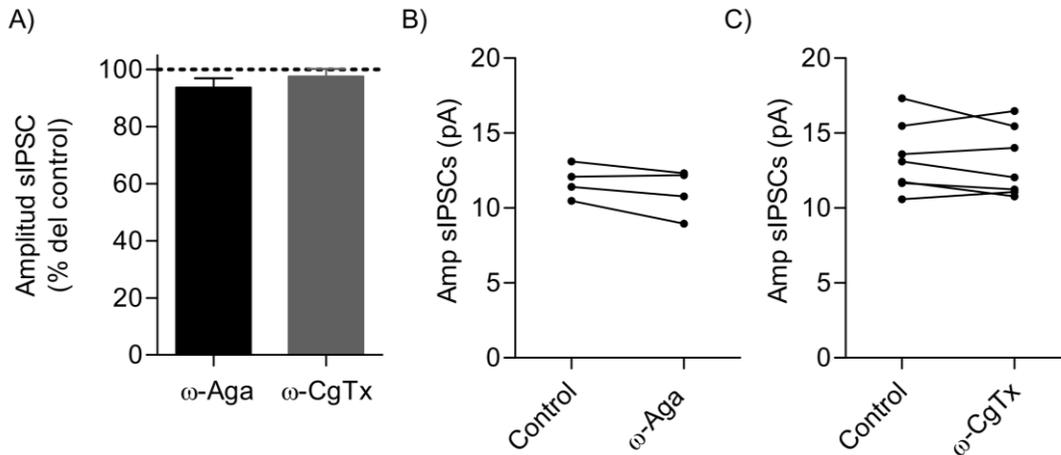


Figura 27: Amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas en presencia y ausencia de los antagonistas de los CCDV, ω -Conotoxina GVIA 300 nM y ω -Agatoxina IVA 200 nM. A) Amplitud de las sIPSCs, / de la amplitud medida antes de incubar con la toxina. Ninguna de las dos toxinas modificó significativamente la amplitud de las sIPSCs ($p=0.4095$; 1002 eventos, 7 células). Amplitud de las sIPSCs medida en cada una de las células registradas antes y después de incubar con ω -Aga y ω -CgTx (B y C, respectivamente).

Cuando se aplicaron ambas toxinas (ω -Aga y ω -CgTx), se bloqueó completamente la neurotransmisión. La aplicación de ω -Aga 200 nM y ω -CgTx 300 nM, en forma simultánea o secuencial, produjo la disminución casi total de la liberación de ACh. Como se muestra en la Figura 28, en presencia de ambas toxinas, m se redujo a un $3,9 \pm 0,4$ / del valor inicial ($m_{\text{inicial}} = 0,8 \pm 0,2$, $p < 0,0001$, $n = 6$ células). Consistentemente, el contenido cuántico, evaluado por el método de fallas disminuyó de $mf = 0,8 \pm 0,3$ (control) a $mf = 0,07 \pm 0,01$ (ω -Aga y ω -CgTx).

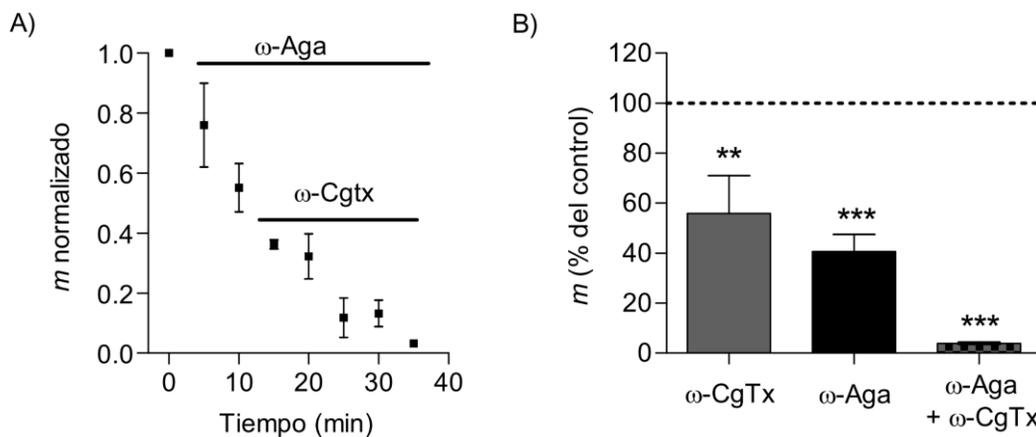


Figura 28: Efecto de ω -Aga y ω -CgTx sobre el m en ratones P9-11. A) Curso temporal del efecto de la aplicación secuencial de ω -Aga 200 nM y ω -CgTx 300 nM sobre el m . B) Contenido cuántico remanente luego de la incubación con ω -CgTx 300 nM (gris), ω -Aga 200 nM (negro) y ambas toxinas (gris y negro). Las barras corresponden a las medias \pm s.e.m. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

En conjunto, estos resultados muestran que el Ca^{2+} que entra a través de los CCDVs del tipo N y P/Q sostiene la liberación de ACh y que, el aporte de otros tipos de CCDVs (como por ejemplo los del tipo R o L) a este proceso, si existiera, sería despreciable. Sin embargo, como los canales del tipo L están presentes en la cóclea (Platzer et al., 2000; Waka et al., 2003; Brandt et al., 2005; Layton et al., 2005; Knirsch et al., 2007) y además se ha demostrado que pueden participar en el proceso de liberación en muchas sinapsis rápidas bajo ciertas condiciones experimentales o del desarrollo (Catterall, 2000; Flink and Atchison, 2003; Perissinotti et al., 2008, Sugiura 1997), se investigó si tenían algún rol en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI.

4.3.2 Los canales de Ca^{2+} del tipo L modulan negativamente la neurotransmisión en P9-11

Los CCDVs del tipo L sostienen la liberación gradual de neurotransmisor y hormonas y, aunque están presentes en muchos tipos de sinapsis, en condiciones normales, no sostienen la liberación en sinapsis químicas rápidas (Reid et al., 2003; Catterall, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que sí participan de este proceso durante procesos de reinervación (Katz et al., 1996) y/o desarrollo (Sugiura and Ko, 1997) de la sinapsis neuromuscular y también en determinadas condiciones experimentales (Urbano et al., 2001; Flink and Atchison, 2003; Perissinotti et al., 2008). Además, se ha demostrado que estos canales están involucrados en la modulación de la liberación del neurotransmisor por activación de conductancias dependientes de Ca^{2+} (Robitaille et al., 1993; Marrion and Tavalin, 1998; Prakriya and Lingle, 1999; Sun et al., 2003; Berkefeld et al., 2006; Loane et al., 2007; Muller et al., 2007a; Fakler and Adelman, 2008; Grimes et al., 2009; Marcantoni et al., 2010) o por activación de cascadas de segundos mensajeros que, eventualmente, también modulan la entrada de Ca^{2+} al terminal sináptico (Sugiura and Ko, 1997; Jensen et al., 1999).

Los CCDVs del tipo L son muy sensibles a concentraciones micromolares de las dihidropiridinas (DHPs) que los modulan negativamente, como la nifedipina o la nitrendipina, o que los modulan positivamente como el Bay-K (Brown et al., 1984; Doering and Zamponi, 2003; Catterall, 2011). Por

ello, para estudiar la participación de este tipo de CCDVs en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCIs, se probaron los efectos de la Nifedipina, nitrendipina y el Bay-K sobre las respuestas sinápticas.

Después de incubar durante 5 minutos la preparación de cóclea con Nifedipina 3 μ M, la amplitud de las eIPSCs aumentó marcadamente y el porcentaje de fallas de liberación disminuyó de un $28,7 \pm 7,1 /$ al $8,1 \pm 3,7 /$ en ausencia y presencia de Nifedipina, respectivamente ($p < 0,01$, $n = 7$ células). No se observó efecto de esta droga sobre la amplitud de las sIPSCs ($p = 0.3654$; 7 células, 1670 eventos; Figura 30). En presencia de esta droga el m aumentó al $195.2 \pm 22.6 /$ del valor inicial ($m_{\text{inicial}} = 1.5 \pm 0.2$; $n = 7$ células; $p < 0.0005$; Figura 31).

Por otro lado, en presencia de Nitrendipina 10 μ M también se produjo un incremento en la amplitud de las eIPSCs acompañado por una disminución del porcentaje de fallas de liberación de un $41,0 \pm 9,6 /$ a un $24,8 \pm 8,9 /$ en ausencia y presencia de Nitrendipina, respectivamente ($p < 0,005$, 5 células). Esta droga redujo levemente la amplitud de las sIPSCs, pasando de $14,6 \pm 1,2$ pA en la condición control a $11,5 \pm 0,3$ en presencia de la droga ($p < 0,05$; $n = 5$ células, 642 eventos; Figura 30). Esto sugiere que, además de actuar sobre los CCDVs del tipo L, esta DHP, a una concentración de 10 μ M, podría estar también afectando a los receptores postsinápticos nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ presentes en esta sinapsis (Elgoyhen et al., 2001; Gomez-Casati et al., 2005). De todas maneras, cuando se normalizó la amplitud promedio de las eIPSCs respecto a la de las sIPSCs para estimar el m , se observó que la cantidad de neurotransmisor liberado aumentó al $206,1 \pm 31,6 /$ del valor inicial después de 5 minutos de incubar la preparación con este antagonista ($m_{\text{inicial}} = 1.0 \pm 0.2$; $p < 0.05$; $n = 5$ células). En la Figura 29 se muestran registros representativos del efecto de las DHP sobre las respuestas sinápticas evocadas por estimulación eléctrica.

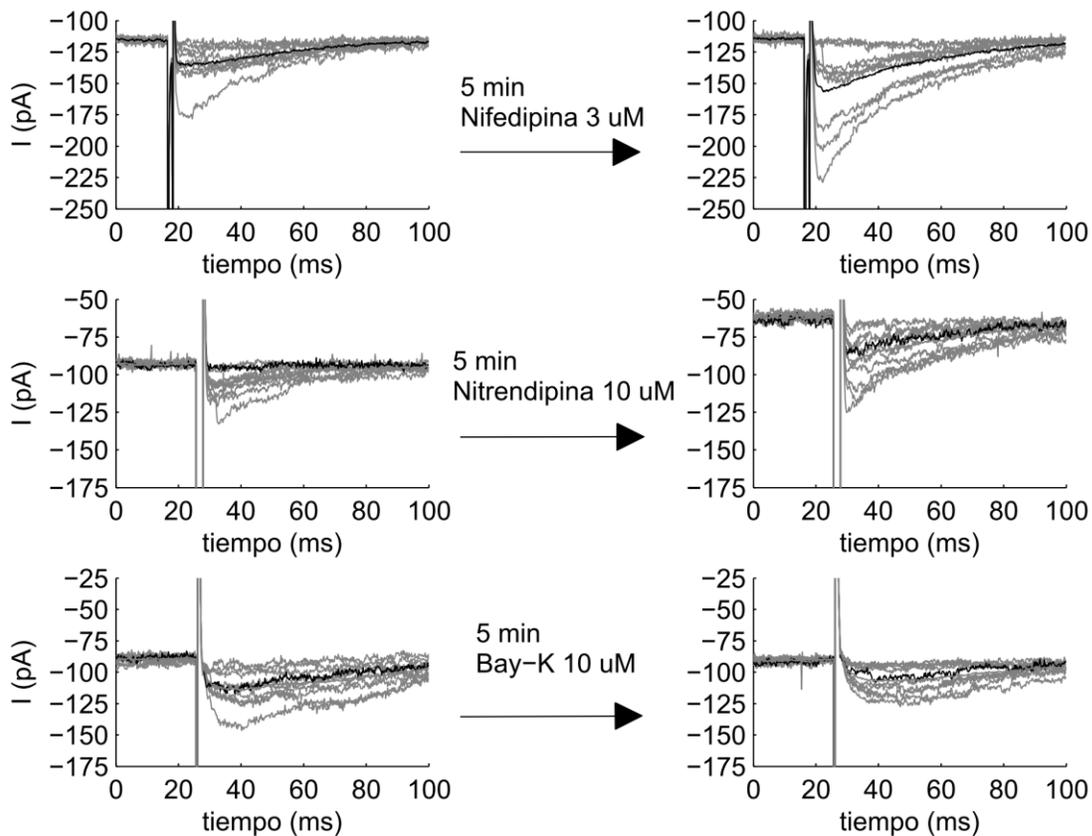


Figura 29: Trazos representativos del efecto de las DHP sobre las respuestas sinápticas evocadas en cócleas de ratones P9-11. Se muestran registros representativos de los efectos de la incubación con: A) Nifedipina 3 μM , B) Nitrendipina 10 μM y C) Bay-K 10 μM . En gris se muestran respuestas individuales y en negro el trazo que resulta de promediar las anteriores.

Cuando la preparación se incubó con Bay-K, una DHP que aumenta la cantidad de corriente que pasa a través de los CCDVs del tipo L debido a que estabiliza su estado abierto (Brown et al., 1984; Doering and Zamponi, 2003; Catterall, 2011), se observó un aumento en el porcentaje de fallas de liberación de un $20,2 \pm 3,5$ a un $35,3 \pm 6,6$ / en ausencia y presencia de la droga, respectivamente ($p < 0,05$; $n = 4$ células). El m , estimado por el método de fallas pasó de $0,9 \pm 0,2$ (control) a $0,6 \pm 0,2$ (Bay-K). El agregado de Bay-K a la solución extracelular no produjo cambios significativos en la amplitud de las sIPSCs ($p = 0,1291$, $n = 4$ células, 831 eventos; Figura 30). Consistentemente con el efecto positivo que tuvieron los antagonistas de los CCDVs sobre la liberación, el Bay-K produjo

una disminución del m al 50.2 ± 5.6 / del valor inicial ($m_{\text{inicial}} = 1,4 \pm 0,1$; $p < 0.01$; $n = 4$ células; Figura 31).

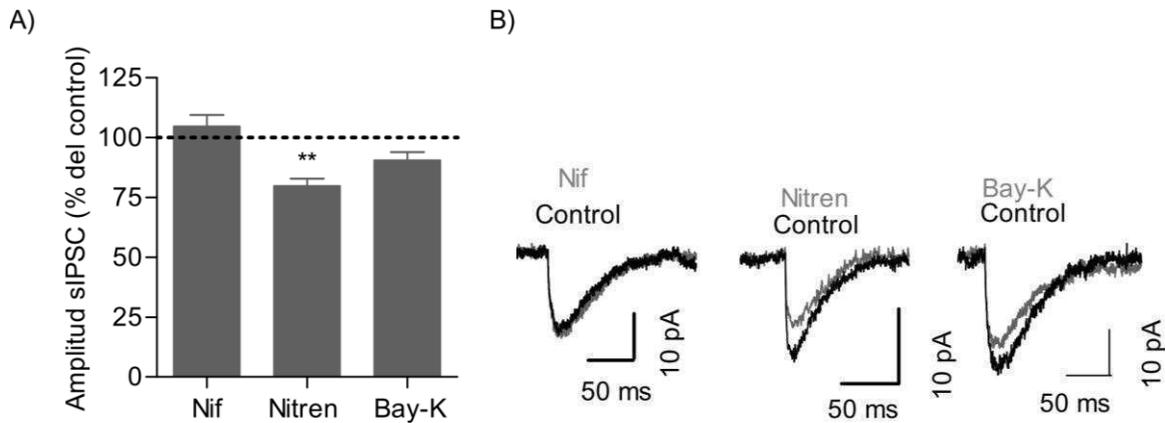


Figura 30: Efecto de las DHPs sobre la amplitud de las sIPSCs. A) Amplitud de las sIPSCs (porcentaje respecto a la amplitud medida en la condición control). B) Trazos representativos de las sIPSCs registradas en presencia y ausencia de cada una de las drogas. ** $p < 0,01$.

El hecho de que los antagonistas de los CCDV del tipo L, Nitrendipina y Nifedipina, produjeran un aumento de la cantidad de neurotransmisor liberado y que el agonista, Bay-K, produjera una disminución, sugiere que el Ca^{2+} que entra al terminal sináptico a través de los CCDVs del tipo L, de alguna manera, modula negativamente la liberación del neurotransmisor. Esta inhibición se puede atribuir a que el Ca^{2+} entrando a través de los CCDV del tipo L active una cascada de segundos mensajeros (Sugiura and Ko, 1997; Jensen et al., 1999) o a que active una conductancia de K^+ dependiente del Ca^{2+} que acelere la repolarización del potencial de acción, disminuyendo así la cantidad total de iones Ca^{2+} que entran al terminal sináptico por impulso nervioso (Storm, 1987; Marcantoni et al., 2010).

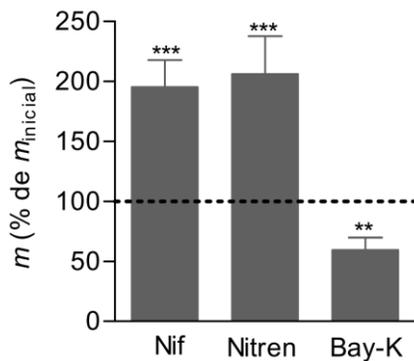


Figura 31: Efecto de las DHPs sobre el contenido cuántico. Porcentaje del m inicial luego de incubar las preparaciones con Nifedipina (3 μ M), Nitrendipina (10 μ M) y Bay-K (10 μ M). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

4.3.3 Los canales de K^+ del tipo BK también modulan negativamente la cantidad de neurotransmisor liberado en la sinapsis eferente transitoria MOC-CCI

Considerando que se ha demostrado que los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y de voltaje contribuyen a la repolarización del potencial de acción (Storm, 1987) y que modulan la liberación del neurotransmisor en una variedad de sistemas (Petersen and Maruyama, 1984; Robitaille et al., 1993; Raffaelli et al., 2004), se decidió investigar si este tipo de canales estaba también involucrado en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI.

Para evaluar la participación de los canales BK, se incubó la preparación de cóclea con Iberitoxina (IbTx), un antagonista específico de estos canales (Galvez et al., 1990). Después de 5 minutos de incubación con IbTx 100 nM se observó una disminución, e incluso la desaparición, de las fallas de liberación ($14,2 \pm 5,5 /$ a un $4,1 \pm 3,2 /$ de fallas respecto al total de estímulos aplicados, en ausencia y presencia de IbTx, respectivamente; $p < 0,01$; 7 células). La amplitud de las sIPSCs no fue modificada por el tratamiento con IbTx 100 nM ($p = 0,1812$; $n = 7$ células; 2559 eventos; Figura 32 B y C). En presencia de IbTx, el m aumentó al $243,8 \pm 45 /$ del valor inicial ($m_{inicial} = 2.2 \pm 0.7$; $p < 0.0001$, $n = 7$ células; Figura 32 D). En la Figura 32 A se muestran registros representativos de las respuestas sinápticas evocadas luego de incubar la preparación con IbTx 100 nM.

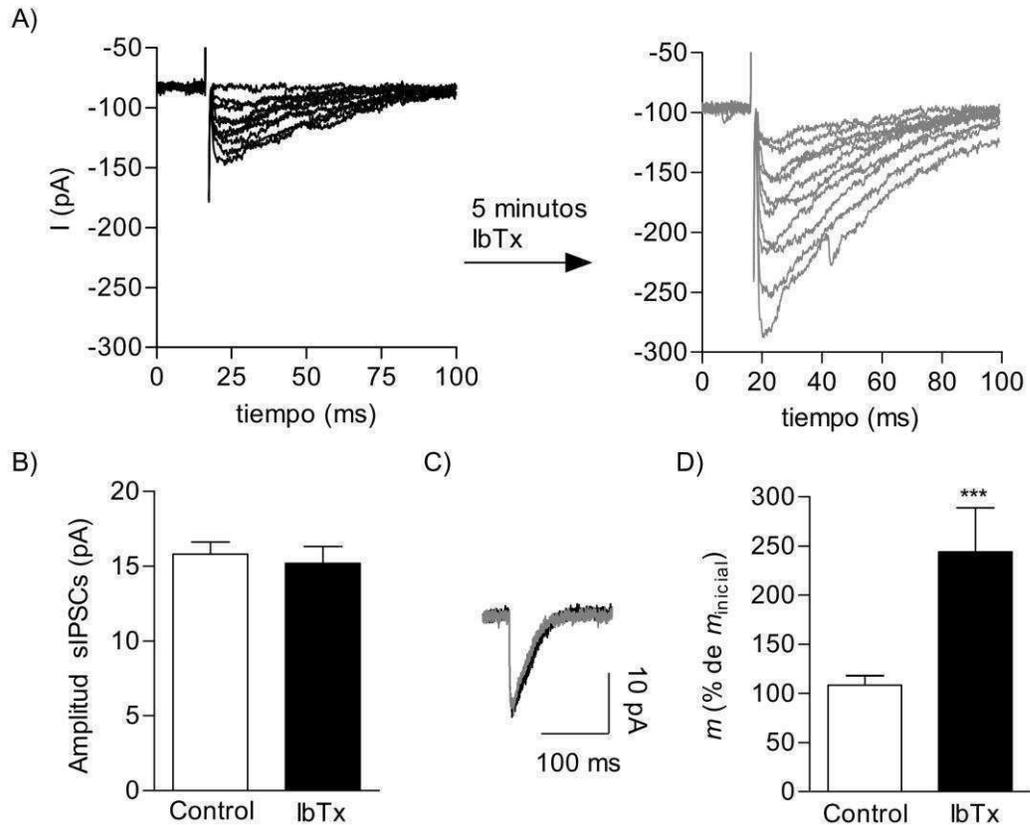


Figura 32: Efecto del antagonista de los canales BK sobre las corrientes sinápticas. A) Trazos representativos de los registros realizados en la condición control (izquierda) y luego de 5 minutos de incubación con IbTx (derecha). B) Amplitud de las sIPSCs. Las barras representan las medias \pm s.e.m. C) trazos representativos de las sIPSCs registradas antes (negro) y después (gris) de la incubación con la toxina. D) Contenido cuántico estimado después de 5 minutos de incubar la preparación con solución salina o con solución de salina más la toxina. Se muestran los porcentajes respecto al valor inicial ($m_{inicial} = 2.2 \pm 0.7$; $p < 0.0001$, $n = 7$ células).

Estos resultados demuestran que la actividad de los canales BK reduce la cantidad de neurotransmisor liberado por impulso nervioso en la sinapsis MOC-CCI.

4.3.4 Los CCDVs del tipo L están acoplados funcionalmente a los canales BK en la sinapsis MOC-CCI

La observación de que tanto los antagonistas de los CCDVs del tipo L como los antagonistas de los canales BK incrementaban la cantidad de neurotransmisor liberado por impulso nervioso (m) sugería que, como se demostró en otras preparaciones (Prakriya and Lingle, 1999; Sun et al., 2003;

Grunnet and Kaufmann, 2004; Berkefeld et al., 2006), podría existir alguna forma de acoplamiento funcional entre estos dos tipos de canales iónicos. Para poner a prueba esta hipótesis, evaluamos el efecto de la Nifedipina sobre el m en preparaciones preincubadas con IbTx 100nM para bloquear la actividad de los canales BK. En esta condición, el agregado de Nifedipina 3 μ M no fue capaz de incrementar la cantidad de neurotransmisor liberado ($m_{\text{inicial}} = 1,7 \pm 0,5$; IbTx, $m = 3,3 \pm 0,7$; IbTx + Nifedipina, $m = 3,0 \pm 0,6$; $n = 6$ células; test de Student pareado comparando los valores de m en presencia de IbTx y de IbTx + Nifedipina, $p = 0.1550$; Figura 33 A).

Del mismo modo, cuando se bloquearon los CCDVs del tipo L incubando la preparación con Nifedipina 3 μ M, el agregado posterior de IbTx 100 nM no fue capaz de incrementar la cantidad de neurotransmisor liberado ($m = 1,3 \pm 0,1$; Nifedipina, $m = 2,5 \pm 0,4$; Nifedipina + IbTx, $m = 2,5 \pm 0,5$; $n = 6$ células; $p = 0.6868$, test de Student pareado comparando los valores de m en presencia de Nifedipina y de Nifedipina + IbTx; Figura 33 B).

Los siguientes experimentos se realizaron para determinar si la incapacidad de aumentar todavía más la liberación del neurotransmisor aplicando secuencialmente los antagonistas de los canales BK o de los CCDVs del tipo L, era causada por el acople funcional de estos dos canales o simplemente por saturación de la liberación evocada eléctricamente. En primer lugar, se preincubó la preparación con IbTx 100 nM en solución con $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,3$ mM y luego se incrementó $[\text{Ca}^{2+}]_e$ a 1,5 mM. Como se muestra en la Figura 33 C, el contenido cuántico aumentó de $1,6 \pm 0,3$ en la solución control (Ca^{2+} 1,3 mM) a $3,9 \pm 0,5$ cuando se agregó IbTx 100 nM (IbTx + Ca^{2+} 1,3 mM) y luego a $6,4 \pm 0,2$ (Figura 33 A).

Finalmente, si los canales L y BK están funcionalmente acoplados, el tratamiento con IbTx, además de ocluir el efecto del antagonista (Nifedipina), debería impedir que el modulador positivo (Bay-K) ejerza su efecto inhibitorio sobre la liberación. Al incubar la preparación con IbTx, el agregado de Bay-K al baño no fue capaz de producir cambios significativos sobre el contenido cuántico (control, $m = 1,2 \pm 0,3$; IbTx, $m = 2,6 \pm 0,8$; IbTx + Bay-K, $m = 2,5 \pm 0,6$; $n = 7$ células; $p = 0.7344$; test de Student pareado comparando los valores de m en presencia de IbTx y de IbTx + Bay-K; Figura 33 D).

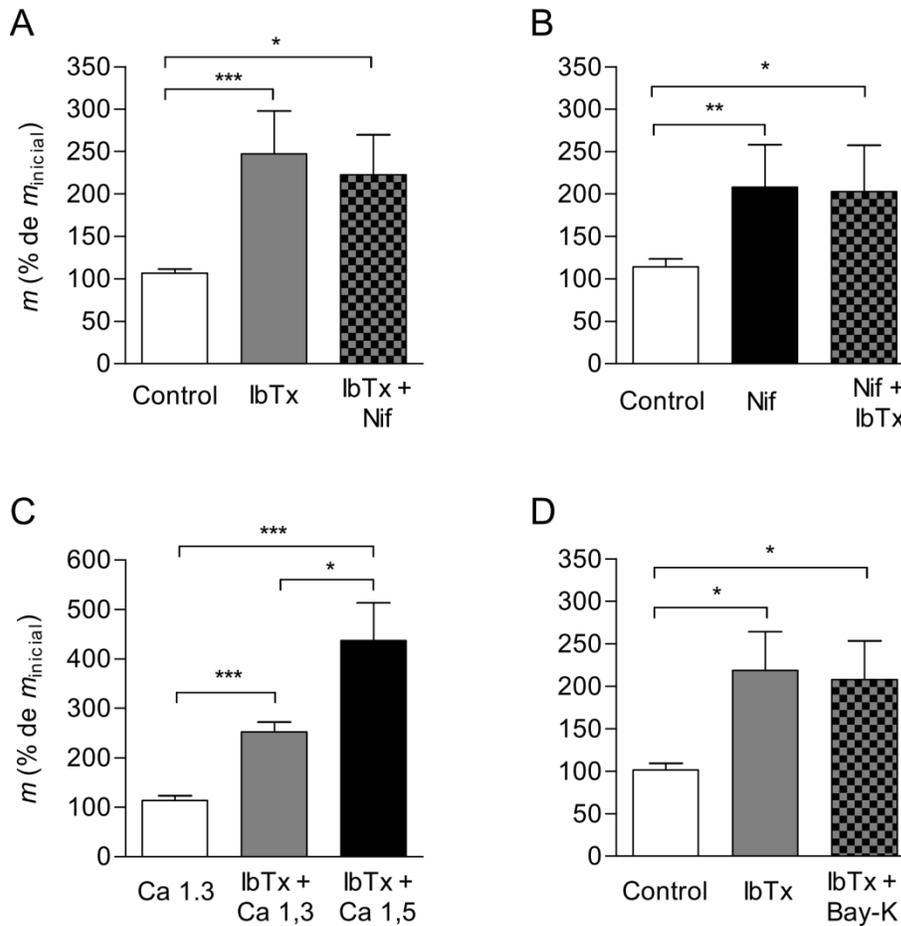


Figura 33: Los CCDV del tipo L y los canales BK están acoplados funcionalmente. A) La preincubación con IbTx 100 nM suprimió la capacidad de la Nifedipina de aumentar el m . B) A la inversa, la preincubación con Nifedipina, suprimió la capacidad de la IbTx de incrementar la liberación de ACh. C) Después de preincubar la preparación con IbTx fue posible incrementar el contenido cuántico aumentando la $[Ca^{2+}]_e$. D) El agregado de Bay-K a la solución extracelular no modificó significativamente m si previamente se habían bloqueado los canales BK. En todos los casos, las barras indican la media \pm s.e.m. del / de m respecto al m_{inicial} . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En conjunto, estos datos sugieren que existe un acoplamiento funcional entre los CCDV del tipo L y los canales de K^+ del tipo BK. Este mecanismo aceleraría la repolarización del potencial de acción disminuyendo la cantidad de calcio que ingresa al terminal sináptico, disminuyendo así la cantidad de ACh que es liberada por cada impulso nervioso. Por otro lado, estos datos muestran que el calcio que entra al terminal a través de los CCDV del tipo N y P/Q no es capaz de activar a los canales BK. Si el Ca^{2+} proveniente de estos canales fuera capaz de activar a los canales BK, luego de

bloquear los CCDVs del tipo L, se debería haber observado un incremento en la liberación del neurotransmisor al agregar IbTx a la solución extracelular.

4.3.5 Canales de Ca^{2+} que median la liberación del neurotransmisor en el período P5-7

Los cambios encontrados en las propiedades de la transmisión sináptica en los períodos postnatales 5-7 y 9-11 (*m*, RRP y STP, ver Secciones 4.1 y 4.2) sugieren que durante este período se producirían también modificaciones a nivel de la maquinaria de liberación del neurotransmisor. Dado que en diversos sistemas se caracterizaron cambios en los tipos de CCDV que median la liberación asociados a cambios en la eficacia de las sinapsis (Scholz and Miller, 1995; Iwasaki and Takahashi, 1998; Rosato Siri and Uchitel, 1999; Iwasaki et al., 2000; Momiyama, 2003), nos interesó investigar si los CCDV que sostienen y/o modulan la liberación en el período P5-7 son los mismos que en P9-11.

Con el fin de determinar si los CCDV del tipo N participan del proceso de liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI durante los días postnatales 5 a 7, incubamos las preparaciones de cóclea con la toxina ω -Conotoxina GVIA (Figura 34). En P5-7, la incubación con ω -CgTx 300 nM no produjo cambios significativos sobre el contenido cuántico. Luego de haber incubado la preparación durante 20 minutos con la toxina, el valor de *m* fue de $102,4 \pm 13,0$ / de su valor inicial (m_{inicial} , $0,5 \pm 0,1$; $p=0,5970$; $n=5$ células; Figura 35). Consistentemente, el contenido cuántico estimado por el método de fallas tampoco se modificó significativamente ($mf = 0,4 \pm 0,1$ y $0,5 \pm 0,1$ en ausencia y presencia de ω -CgTx 300 nM, respectivamente, $p=0,5220$, $n=5$ células). De igual modo, no se encontraron diferencias en el porcentaje de fallas registrado en cada condición (control, $68,2 \pm 4,9$ / y ω -CgTx, $65,4 \pm 5,5$ / de fallas de liberación respecto al total de estímulos aplicados, $p=0,6706$, $n=5$ células).

En este estadio, la toxina tampoco modificó en forma significativa amplitud de las sIPSCs lo que indica que tampoco afectó el tamaño del cuanto de ACh ni a los receptores postsinápticos. La amplitud de las sIPSCs en preparaciones bañadas con solución salina normal fue de $13,4 \pm 2,2$ pA ($n= 5$ células, 466 eventos) y luego de 20 minutos de incubación con ω -CgTx 300 nM fue de $11,8 \pm 1,0$ pA ($n = 5$ células, 209 eventos; test de Student, $p= 0,3375$; Figura 34).

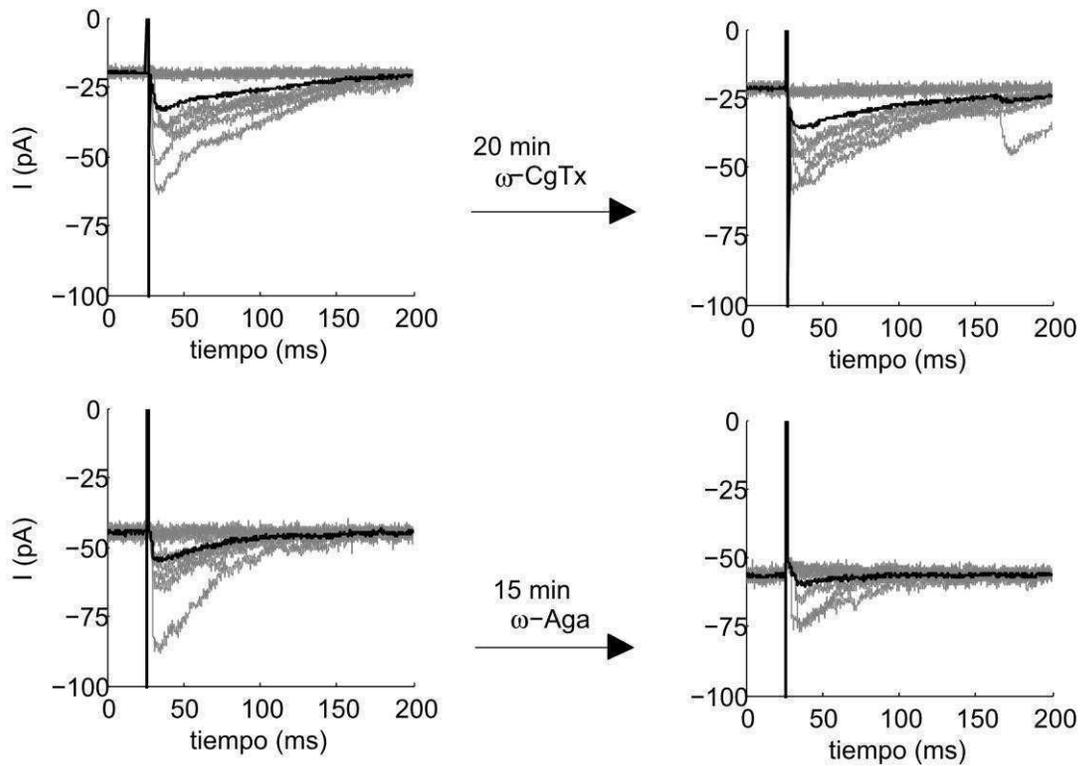


Figura 34: Efecto de los antagonistas de los CCDV del tipo N y P/Q sobre las corrientes sinápticas evocadas en ratones P5-7. Trazos representativos del efecto producido por la aplicación de ω -Conotoxina GVIA y ω -Agatoxina IVA sobre las eIPSCs en preparaciones de cóclea de ratones P5-7. En gris se muestran trazos individuales y en negro el promedio de 200 respuestas.

Igual que en P9-11, en esta franja etaria, la incubación con ω -Aga 200 nM disminuyó fuertemente la amplitud de las eIPSCs sin efectos significativos sobre la amplitud de las sIPSCs (Figura 34). En la condición control, la amplitud media de las sIPSCs fue de $13,4 \pm 1,3$ pA ($n= 5$ células, 217 eventos) y de $12,3 \pm 1,2$, luego de 15 minutos de incubación con la toxina ($n= 5$ células, 83 eventos; test de Student, $p = 0,1401$; Figura 34). El contenido cuántico disminuyó a un $36,7 \pm 6,5$ / de su valor inicial ($m_{\text{inicial}} = 0,4 \pm 0,1$; $n= 5$ células; Figura 35) en presencia de ω -Aga 200 nM. De igual modo, mf disminuyó de $0,33 \pm 0,05$ a $0,07 \pm 0,02$ en presencia de la toxina ($p<0,01$; $n=5$ células) y el porcentaje de fallas de liberación aumentó del $72,0 \pm 3,7$ / al $93,5 \pm 2,3$ / ($p<0,01$; $n=5$ células).

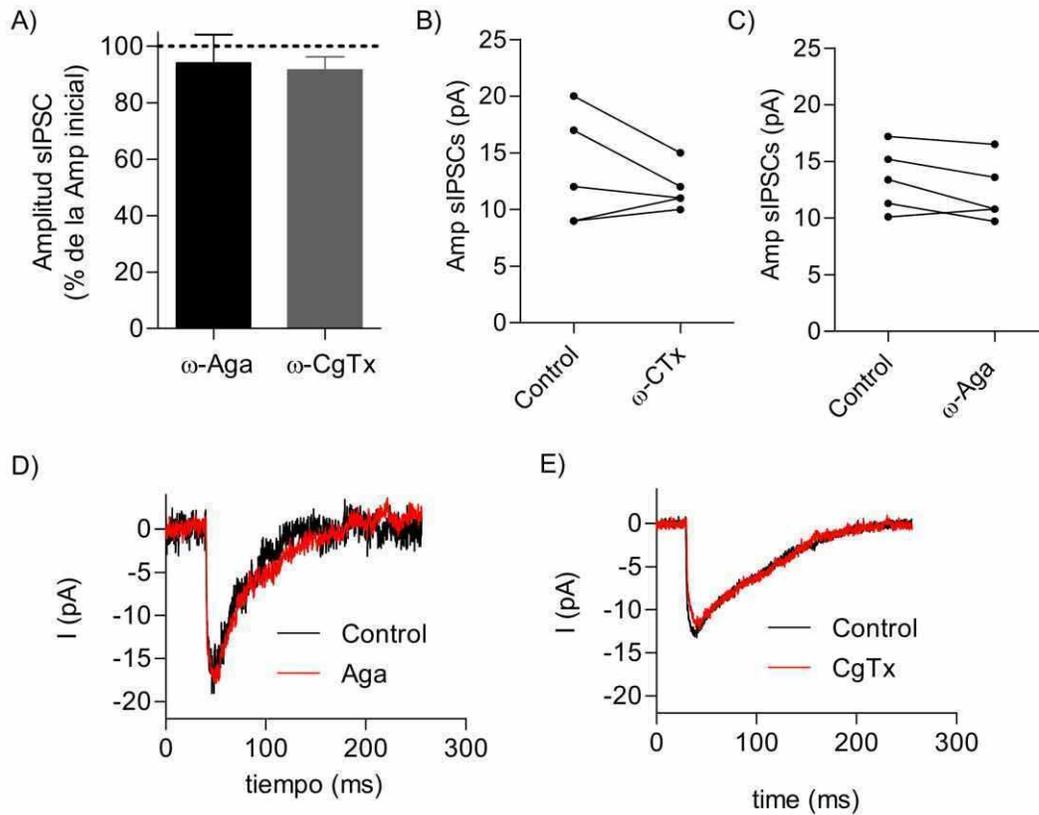


Figura 35: Las toxinas antagonistas de los CCDV no modifican la amplitud de las sIPSCs. A) Amplitud de las sIPSCs, / de la amplitud medida antes de incubar con la toxina correspondiente. B) Amplitudes de las sIPSCs promedio registradas en cada célula, antes y después de incubar durante 20 minutos con ω -Conotoxina GVIA 300 nM (n=5 células, $p=0,3375$, test de Student pareado). C) Amplitudes promedio de cada célula incubada con ω -Agatoxina IVA 200 nM (n=5 células, $p=0,1042$, test de Student pareado). D) Trazos representativos de sIPSCs registradas antes (trazos negros) y después de la incubación con ω -Aga y E) idem (D) con ω -CgTx .

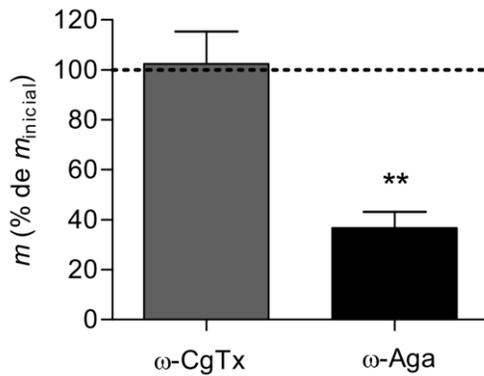


Figura 36: Efecto de las toxinas ω -CgTx y ω -Aga sobre el contenido cuántico en P5-7. Las barras representan el porcentaje de m remanente después de la incubación con cada toxina respecto al valor inicial (medias \pm s.e.m.). ** $p < 0,01$.

Los resultados expuestos en esta sección muestran que durante el período P5-7 la liberación del neurotransmisor es parcialmente sostenida por CCDVs del tipo P/Q. Muestran, además, que en este estadio del desarrollo los CCDV del tipo N no están involucrados en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCIs.

4.3.6 Canales de Ca^{2+} del tipo L en el período P5-7

Dado que al bloquear los CCDV del tipo P/Q queda aún un porcentaje remanente de liberación del $\sim 40\%$, se evaluó si los CCDV del tipo L (que no sostienen, pero sí modulan, la liberación en P9-11; ver sección 4.3.2), participaban en la liberación del neurotransmisor en ratones P5-7. Con este objetivo, se evaluó el efecto de las DHP Nifedipina y Bay-K sobre la liberación de ACh. La incubación de las preparaciones de cóclea con Nifedipina $3 \mu\text{M}$, aumentó significativamente el mal $161,2 \pm 20,9 /$ del valor inicial ($m_{inicial} = 0,9 \pm 0,1$; test de student; $p < 0,01$; $n = 5$ células; Figura 39). Los valores de m , estimados por el método de las fallas también se vieron incrementados significativamente ($mf = 0,99 \pm 0,14$ y $1,7 \pm 0,23$ en ausencia y presencia de Nifedipina $3 \mu\text{M}$, $p < 0,01$; $n = 5$ células). En esta franja etaria, la droga tampoco tuvo efecto sobre la amplitud de las sIPSCs (test de Student; $p = 0,3627$; $n = 5$ células; 560 eventos; Figura 38). Consistentemente con el aumento en el contenido cuántico, la proporción de fallas de liberación pasó del $39,0 \pm 4,5 /$ en la condición control ($n = 5$ células) al $20,2 \pm 4,3 /$, 5 minutos después del agregado de Nifedipina $3 \mu\text{M}$ al medio extracelular ($p < 0,05$; $n = 5$ células).

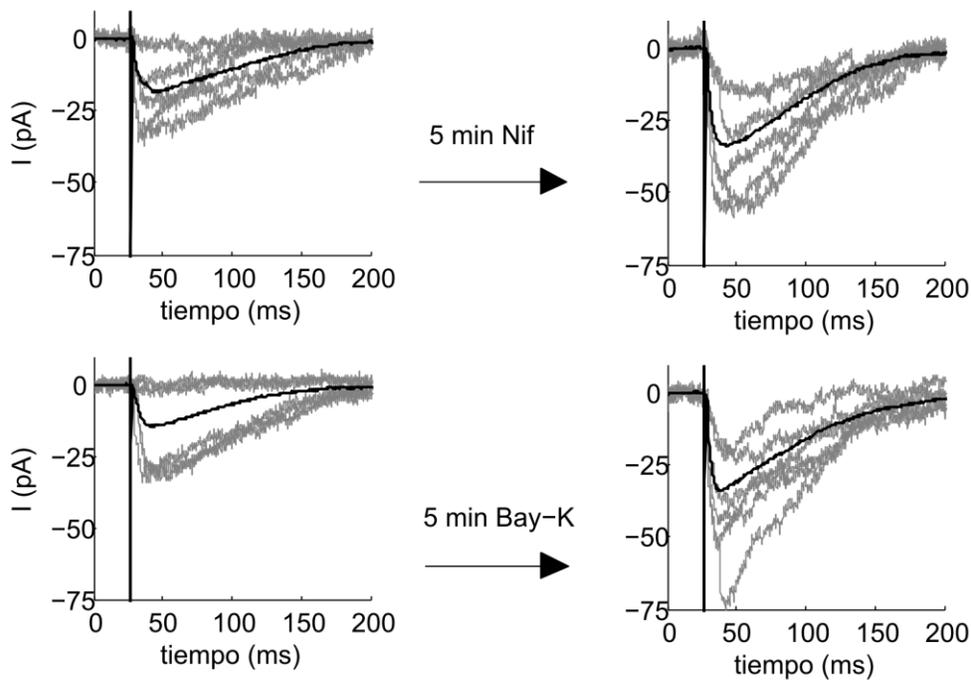


Figura 37: Efecto de las DHPs sobre la liberación evocada en la sinapsis MOC-CCIs de ratones P5-7. Trazos representativos del efecto de las DHPs, Nifedipina y Bay-K sobre las eIPSCs. En el panel superior se muestran 5 trazos individuales (gris) y el promedio de 200 eIPSCs evocados por estimulación eléctrica a una frecuencia de 1Hz (negro), antes y después de la incubación con Nifedipina (panel superior) y con Bay-K (panel inferior).

Sorprendentemente, y contrariamente a lo que ocurrió en las sinapsis MOC-CCI de los ratones P9-11 (ver sección 4.3.2, Figura 31), el tratamiento con el agonista de los CCDV del tipo L también produjo un aumento significativo del m , que llegó al $294,0 \pm 26,3 /$ del valor medido antes de la incubación con la droga ($m_{\text{inicial}} = 0,83 \pm 0,11$; test de Student; $p < 0,0001$; $n = 6$ células; Figura 39). Las estimaciones realizadas por el método de fallas fueron consistentes con las realizadas por el método directo, $mf = 0,88 \pm 0,13$ y $2,12 \pm 0,26$ en ausencia y presencia de la droga, respectivamente ($p < 0,01$; $n = 6$ células). Esta droga, también produjo una disminución significativa en la proporción de fallas de liberación pasando del $44,2 \pm 4,8 /$ en solución extracelular normal al $16,1 \pm 3,0 /$ en solución extracelular con Bay-K $10 \mu\text{M}$ ($n = 6$ células, control y Bay-K).

En las preparaciones de cóclea de ratones P5-7, de la misma manera que en los ratones P9-11, el agregado de Bay-K $10 \mu\text{M}$ al baño extracelular, no afectó la amplitud de las sIPSCs (test de Student; $p = 0,1763$; $n = 6$ células; células; 1299 eventos; Figura 38).

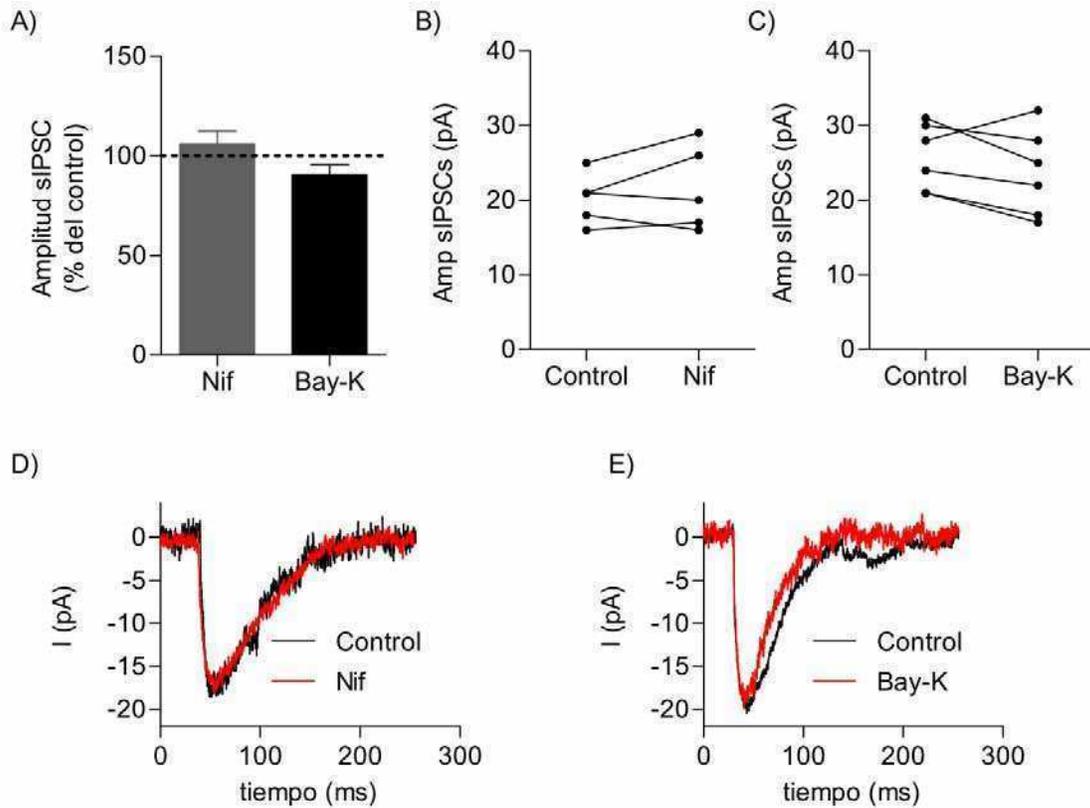


Figura 38: Efecto de las DHPS sobre las corrientes sinápticas espontáneas en ratones P5-7. A) Amplitud de las sIPSCs ($\%$ de la amplitud medida en la condición control). B) Amplitud de las sIPSCs, se muestran los valores medidos en cada célula, antes y después de incubar durante 5 minutos con Nifedipina $3 \mu\text{M}$ y con Bay-K $10 \mu\text{M}$ (C). Trazos representativos de sIPSCs registradas antes (trazos negros) y después de la incubación con Nifedipina (D) y con Bay-K (E).

Al comparar los porcentajes de aumento producidos por la Nifedipina y por el Bay-K, se observó que el efecto del Bay-K sobre el m fue significativamente mayor que el de la Nifedipina (test de Student, $p < 0,01$).

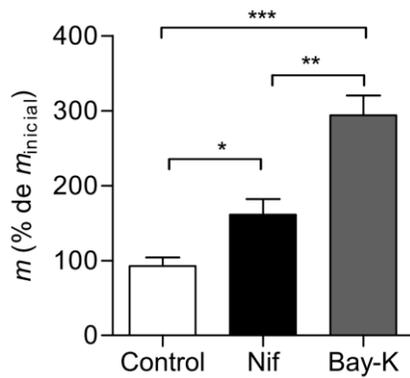


Figura 39: Efecto de las DHPs, Nifedipina y Bay-K sobre el contenido cuántico en ratones P5-7. Se muestra el porcentaje del m inicial luego de la incubación de la preparación con solución salina, en presencia o ausencia de la droga. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estos resultados sugieren que en la sinapsis MOC-CCI en esta etapa del desarrollo postnatal, los CCDV del tipo L no sólo estarían regulando negativamente la liberación de ACh como ocurre en P9-11, sino que podrían también estar sosteniéndola.

La incubación con Bay-K produjo además un incremento de la frecuencia de las sIPSCs en P5-7 pero no en P9-11. Como se muestra en la Figura 40, luego de 5 minutos de incubación con esta DHP, la frecuencia de eventos espontáneos resultó significativamente mayor que la de los controles (ANOVA de una vía, $n=4$ células).

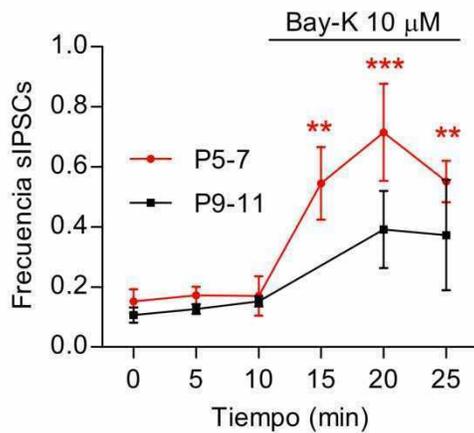


Figura 40: Efecto del Bay-K sobre la frecuencia de sIPSCs en cócleas de ratones P5-7 (rojo) y P9-11 (negro). Los puntos representan las medias \pm s.e.m. La frecuencia de sIPSCs se midió en intervalos de 100-200 segundos. ANOVA de una vía, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.7 Modulación de la liberación de ACh por canales de K^+ del tipo BK

Luego se procedió a estudiar si también en esta etapa del desarrollo los canales de K^+ del tipo BK estaban involucrados en la regulación de la liberación de ACh. Con este fin, evaluamos el efecto de la iberitoxina (IbTx) sobre la transmisión sináptica en preparaciones de cóclea de ratones P5-7. En forma similar a los resultados obtenidos en P9-11, cuando se trataron las preparaciones en P5-7 con IbTx se observó un aumento significativo del m , que alcanzó el $193,0 \pm 11 /$ del valor inicial ($m_{\text{inicial}} = 0,4 \pm 0,2$; test de Student: $p < 0,0001$; $n = 5$ células; Figura 41). Consistentemente, el porcentaje de fallas de liberación disminuyó del $64,2 \pm 6,7 /$ a $53,4 \pm 6,0 /$ luego de la incubación con la toxina ($p < 0,01$, $n = 5$ células). Al igual que la evaluación por el método directo, el análisis por el método de fallas evidenció un aumento del mf . Este último fue de $0,49 \pm 0,11$ y $0,67 \pm 0,10$ en ausencia y presencia de la toxina, respectivamente (test de Student, $p < 0,05$; $n = 5$ células). Además, no se observaron cambios en la amplitud de las sIPSCs por el agregado de IbTx (Test de Student, $p = 0,5291$; $n = 5$ células, 569 eventos; Figura 41 C)

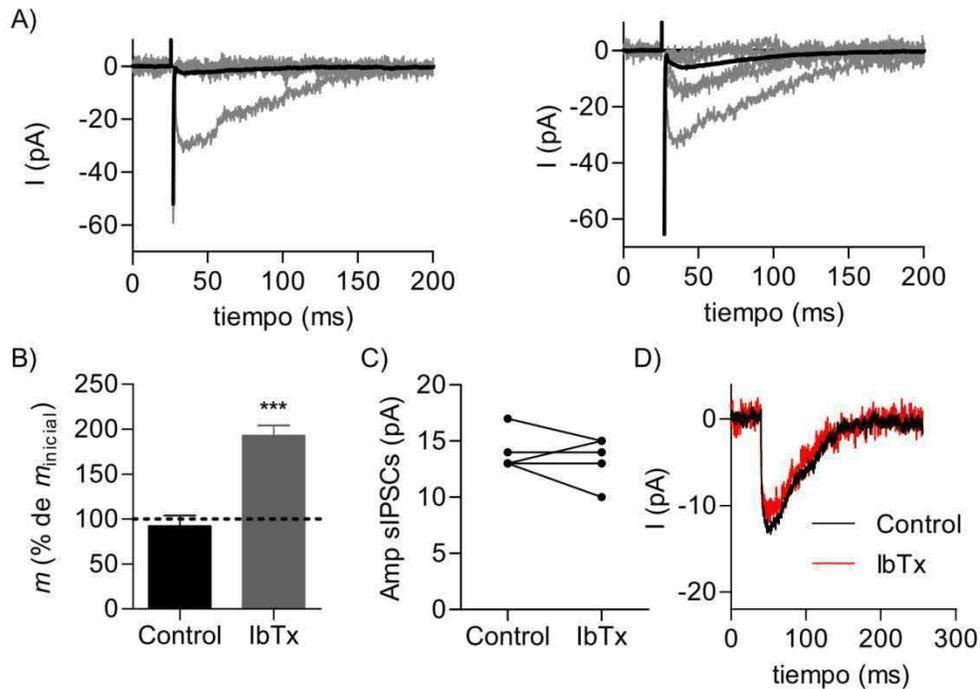


Figura 41: Efecto del antagonista de los canales BK sobre la transmisión sináptica en cócleas de ratones P5-7. A) Trazos representativos de las corrientes evocadas por los protocolos de estimulación de 1 Hz utilizados para la estimación del m antes (izquierda) y después (derecha) de incubar con IbTx 100 nM. B) Aumento del m producido por el tratamiento con IbTx 100 nM. Las barras representan las medias \pm s.e.m. del m relativizado al valor inicial. C) Amplitud de las sIPSCs promedio de cada célula medido antes y después del tratamiento con IbTx 100 nM. El tratamiento no produjo efectos significativos sobre la amplitud de las sIPSCs ($p=0,5291$; $n=5$ células, 569 eventos). D) Trazos representativos de sIPSCs registradas antes (negro) y después de incubar la preparación con IbTx 100 nM durante 5 minutos.

Estos resultados sugieren que en P5-7, tanto los CCDV del tipo L como los canales de K^+ del tipo BK, modulan negativamente la liberación de ACh. Para determinar si los canales del tipo L contribuyen efectivamente con el proceso de liberación del neurotransmisor, es necesario bloquear los otros procesos que pudieran estar obscureciendo la interpretación de los resultados de estos experimentos. Para ello habría que bloquear los otros canales que contribuyen a la liberación (CCDV del tipo P/Q) y los canales del tipo BK que son los que estarían ejerciendo la acción inhibitoria activada por el flujo de Ca^{2+} a través de los CCDVs del tipo L. En esta condición, si los canales del tipo L contribuyen a la liberación, el agregado de Nifedipina o Bay-K debería tener un efecto directo sobre la neurotransmisión y por lo tanto, su interpretación sería más sencilla.

4.4 Relación entre la STP y los canales que median y/o modulan la liberación del neurotransmisor

4.4.1 Relación entre la STP y el contenido cuántico

Como se observó al modificar la $[Ca^{2+}]_e$, la STP cambia en función del m , predominando la depresión cuando el m aumenta y la facilitación cuando este parámetro disminuye. Por lo tanto, es esperable que cambios en los canales que determinan la cantidad de Ca^{2+} que entra al terminal y su localización en relación a los sitios activos, sean determinantes del tipo de STP. Además, los cambios en la concentración de este ion, utilizados en la serie de experimentos mostrados en la sección 4.2.3 pueden alterar el proceso de transmisión sináptica en diferentes niveles, desde la cantidad de calcio que entra y alcanza al sensor de calcio hasta el ciclo de reciclado de vesículas en el terminal sináptico. Por estas razones se realizaron experimentos en los que se evaluó el tipo de STP en condiciones en las que se alteró el m usando dos toxinas, ω -Aga e IbTx, que actúan en diferentes niveles del proceso de liberación: 1) regulando la cantidad de Ca^{2+} que entra al terminal desde el medio extracelular (ω -Aga) y 2) regulando la duración del potencial de acción presináptico (IbTx) con lo cual se regula el tiempo durante el cual entra Ca^{2+} al terminal sináptico. Para realizar este estudio, se aplicaron protocolos de 10 estímulos a una frecuencia de 100 Hz en ausencia y presencia de cada una de las toxinas. En la Figura 42 se muestran los gráficos de la amplitud de la respuesta sináptica normalizada (S_x/S_1) vs el número de pulso, donde se pueden observar los cambios en el tipo de STP producidos por la incubación con cada una de las dos toxinas utilizadas. Se marcaron con asteriscos los pulsos en los que se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

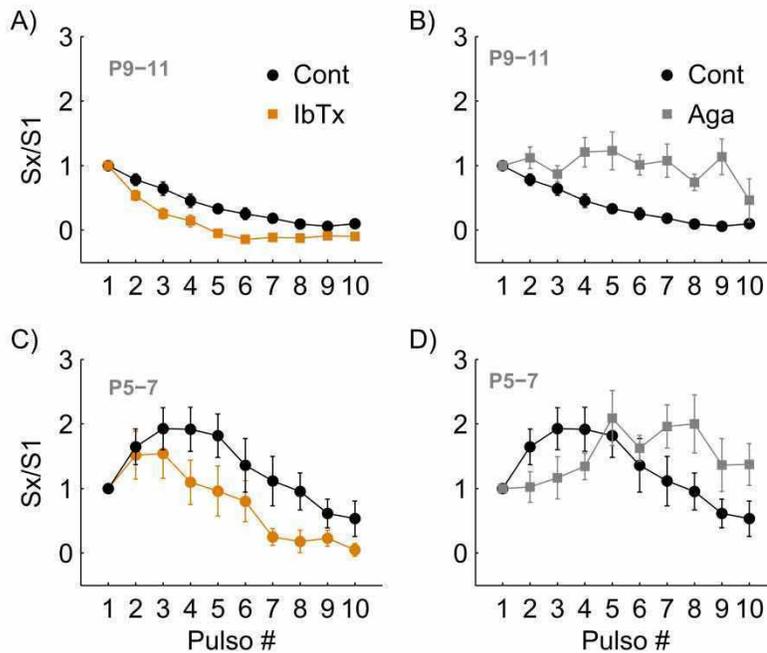


Figura 42: El patrón de STP se ve modificado cuando se incubó la preparación con toxinas que alteran el m . En todos los casos se muestran las amplitudes de corriente normalizadas para cada pulso del tren, en cada tratamiento (control o toxina). A) y C) Efecto de la IbTx sobre la STP en ratones de P9-11 y P5-7, respectivamente. B) y D) Efecto de la ω -Agatoxina IVA sobre la STP en ratones de P9-11 y P5-7, respectivamente.

El aumento del m producido por el agregado de IbTx a la solución extracelular estuvo acompañado de una mayor tendencia a la depresión cuando se aplicaron los trenes de 10 pulsos a una frecuencia de 100 Hz en preparaciones de ambos grupos. Este fenómeno se expresó como una disminución en la amplitud de las corrientes sinápticas evocadas por los sucesivos estímulos del tren (ANOVA de dos vías, pulso y toxina; $F_{(1,9)} = 45,47$; $p < 0,0001$ para el factor toxina en P9-11; $n = 9$ células; $F_{(1,9)} = 3,518$; $p = 0,0029$ para el mismo factor en P5-7; $n = 9$ células. Figura 42 A y D). El efecto contrario se produjo en P9-11 al disminuir el m incubando la preparación con ω -Aga 200 nM. En este caso, la disminución del m estuvo acompañada por un aumento en las corrientes evocadas por los estímulos sucesivos (ANOVA de dos vías, $F_{(1,9)} = 108,8$; $p < 0,0001$. Figura 42 B). En el caso de P5-7, la incubación con esta toxina indujo un retraso en la aparición de la facilitación en el transcurso del tren (ANOVA de dos vías; $F_{(1,9)} = 3,518$; $p = 0,003$ $n = 7$ células).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que en la sinapsis MOC-CCI, la STP es sensible a cambios en la eficiencia de liberación inicial y que los cambios en el patrón de STP durante el desarrollo postnatal se deben a los cambios que ocurren en el contenido cuántico de la liberación durante este período (ver sección 4.2.3, Figura 18). Sin embargo no son compatibles con el hecho de que la probabilidad de liberación de cada sitio (P_r) se mantenga constante durante este periodo (sección 4.2.7).

4.5 Rol de la α -sinucleína (α -sin) en la transmisión sináptica

Las sinucleínas son pequeñas proteínas solubles que se expresan principalmente en el tejido nervioso y en algunas clases de tumores. Esta familia está compuesta por α -, β - y γ - sinucleína, proteínas que contienen entre 127 y 140 aminoácidos, con un 55 y 62% de homología de secuencia. Una característica estructural típica de las sinucleínas es la presencia de un motivo repetitivo de aminoácidos (KTKEGV) en los primeros 87 residuos y regiones ácidas en el extremo carboxilo-terminal. Los miembros de la familia de las sinucleínas son naturalmente proteínas no plegadas. En los últimos años, esta familia recibió mucha atención debido a que uno de sus miembros, la α -sinucleína se vinculó a enfermedades neurodegenerativas por razones tanto genéticas como neuropatológicas (Venda et al., 2010).

En 1997, estudios genéticos de un pequeño número de familias griegas e italianas con aparición temprana de la enfermedad de Parkinson reveló la presencia de una mutación puntual en el gen de la α -sin (generando un cambio de alanina a treonina en la posición 53 (Polymeropoulos et al., 1997). El rol de la α -sin en la enfermedad fue apoyado por más evidencias cuando se encontró una segunda mutación puntual, de alanina a prolina en la posición 30, que también fue asociada a la aparición temprana de los síntomas (Kruger et al., 1998).

Aunque estas mutaciones solo se han encontrado en unas pocas familias, estudios que abordaron la relación entre α -sin y la enfermedad de Parkinson resultaron clave cuando demostraron que los cuerpos de Lewy (LBs: inclusiones proteicas que caracterizan a este tipo de desordenes neurodegenerativos) no solo se encuentran enriquecidos en esta proteína en casos familiares sino también en casos esporádicos (Spillantini and Goedert, 2000). Asimismo, se demostró que la α -sin es el principal componente en las inclusiones proteicas de todas las enfermedades neurodegenerativas que presentan LBs. Estas evidencias llevaron a la clasificación de todas las patologías caracterizadas por agregados de α -sin como "*Sinucleinopatías*" destacando la importancia de esta proteína en los procesos neurodegenerativos (Spillantini and Goedert, 2000).

Experimentos realizados en ratones con un mutación nula en el gen de la α -sin, mostraron transmisión sináptica normal durante la aplicación de protocolos de baja frecuencia y duración pero una disminución en su capacidad de sostener la transmisión sináptica al aplicar trenes de estimulación prolongados y en el reabastecimiento de vesículas listas para ser liberadas desde el

grupo de vesículas de reserva (Cabin et al., 2002). Consistentemente con un rol de la α -sin en la regulación del tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas en el terminal presináptico, la supresión de la expresión de α -sin usando oligonucleótidos antisentido en cultivos primarios de neuronas hipocampales disminuyó la disponibilidad de vesículas sinápticas en el pool de reserva (Murphy et al., 2000).

Recientemente se demostró que, en neuronas del hipocampo, la exocitosis de vesículas sinápticas está disminuida en ratones que sobreexpresan la α -sin humana (Yavich et al., 2004). Resultados similares se encontraron al transfectar neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de ratones con α -sin (Nemani et al., 2010). Por otro lado, la sobreexpresión de α -sin en neuronas del hipocampo afectó el reciclado de vesículas sinápticas después de la exocitosis, causando una reducción del tamaño del pool de vesículas (Yavich et al., 2004). Estudios recientes demostraron que todas las sinucleínas se expresan en los axones de las neuronas eferentes que inervan a las células ciliadas de la cóclea de mamíferos (Akil et al., 2008). Además, se mostró la existencia de una correlación entre el desarrollo temprano de presbiacusia y una menor expresión de α -sin en estas neuronas (Park et al., 2011).

4.5.1 Corrientes sinápticas espontáneas

Con el fin de determinar si la α -sinucleína participa en el proceso de liberación en la sinapsis MOC-CCI se analizaron ratones que portan una variante nula del gen de la α -sinucleína. No se observaron diferencias significativas en la amplitud promedio de las corrientes sinápticas espontáneas (test de Student, $p < 0,2245$) ni en su cinética de crecimiento ($p < 0,4960$) y decaimiento (Figura 43; $p < 0,3040$; KO, $n = 13$ células, 751 eventos; WT, $n = 12$ células, 834 eventos).

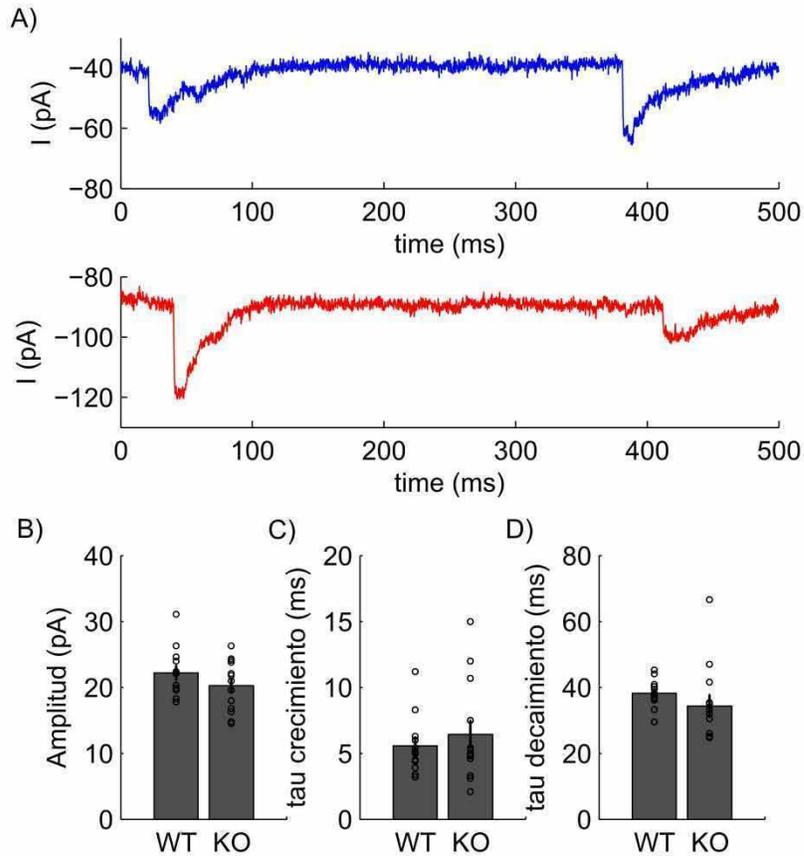


Figura 43: Análisis de las sIPSCs en ratones +/+ y -/- para el gen de la α -sinucleína. A) Trazos representativos de las sIPSCs registradas en ambos genotipos (azul: +/+, rojo: -/-). Análisis cuantitativo de las corrientes, B) Amplitudes de corriente registradas en cada célula. C) y D) Taus de crecimiento y decaimiento de las sIPSCs. En todos los casos los círculos representan el promedio registrado en cada célula y las barras indican promedios \pm s.e.m. de todas las células registradas.

4.5.2 Corrientes sinápticas evocadas y contenido cuántico

Para estudiar las eIPSCs se utilizaron protocolos de estimulación de las fibras MOC a una frecuencia de 1 Hz. Se estimó el contenido cuántico en cada genotipo por el método directo usando los protocolos de 200 pulsos a 1 Hz utilizados previamente (ver Métodos). No se encontraron diferencias significativas entre genotipos (Figura 44). En los ratones WT el m fue de $2.0 \pm 0,4$ mientras que en los ratones KO el valor fue de $1,9 \pm 0,4$ (test de Student, $n = 12$ células WT y $n = 13$ células KO, $p=0,9151$).

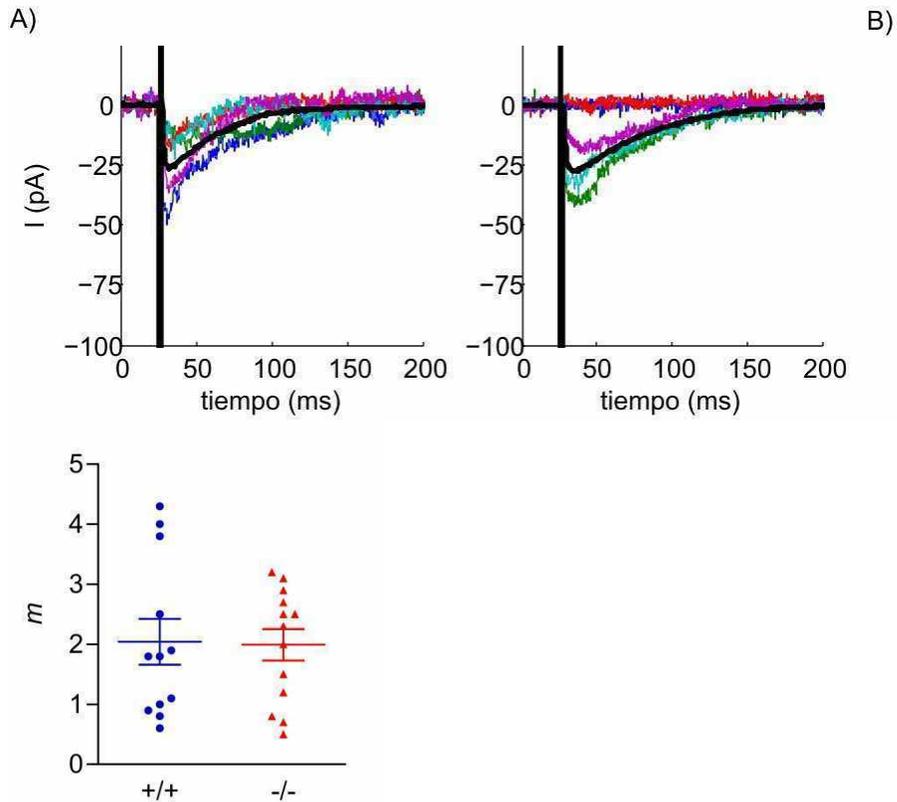


Figura 44: Análisis de las corrientes evocadas y el contenido cuántico en ratones WT y KO para la α -sinucleína. A) Trazos representativos superpuestos de las corrientes evocadas por estímulos aplicados a una frecuencia de 1Hz en ratones WT (izquierda) y KO (derecha). Para cada genotipo se muestran cinco trazos individuales (colores) y el promedio de 200 eIPSCs (negro).

En conjunto, estos resultados sugieren que el proceso de llenado y exocitosis de las vesículas sinápticas no se encuentra alterado en los ratones que no expresan α -sin. Por otro lado, la carencia de α -sin no tiene efectos significativos sobre el contenido cuántico de la liberación al ser evocada a una frecuencia de 1 Hz.

4.5.3 Plasticidad de Corto Término

Para evaluar si la α -sin tenía algún rol en la liberación de ACh en condiciones de actividad sináptica más exigentes se usaron trenes de estimulación con frecuencias de 25, 50 y 100 Hz. Para analizar las amplitudes medias normalizadas se utilizó ANOVA de dos factores para medidas repetidas (factores: genotipo y número de estímulo). En ningún caso se encontraron diferencias

significativas entre genotipos ($p = 0,5705$ para 25 Hz, $p = 0,6977$ para 50 Hz y $p = 0,0941$; $n = 13$ células WT y 10 células KO; Figura 45). Cada protocolo se repitió entre 10 y 20 veces por célula.

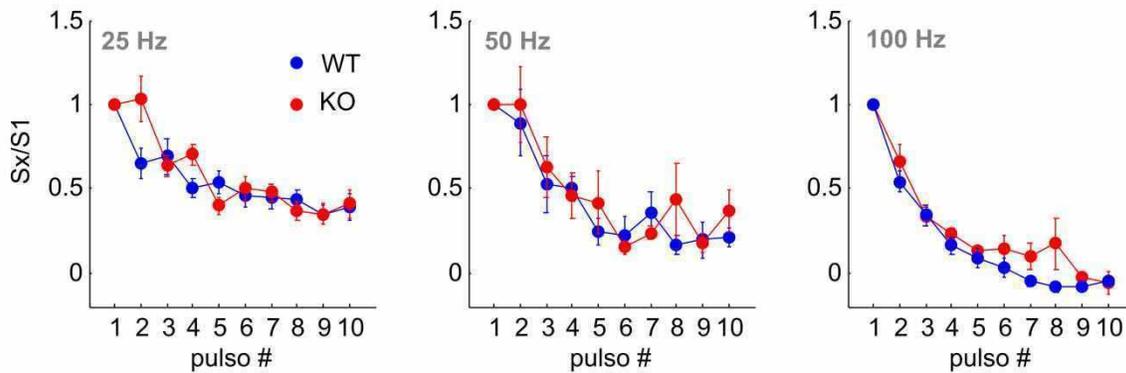


Figura 45: STP. Amplitud normalizada de las corrientes evocadas por cada estímulo de los trenes aplicados (S_x/S_1). Ninguna de las frecuencias de estimulación utilizadas produjo cambios significativos en este parámetro. Los puntos representan las medias \pm s.e.m. de S_x/S_1 medidos en cada uno de los pulsos de los trenes aplicados.

A partir de estos resultados se concluye que, para los regímenes de actividad sináptica estudiados (1, 25, 50 y 100 Hz), la carencia de la α -sin no produce cambios en la eficiencia de la sinapsis MOC-CCI.

5 Discusión

El estudio del curso temporal de los eventos que suceden durante la maduración postnatal del sistema auditivo muestra que ocurren una gran cantidad de cambios anatómicos, biofísicos y fisiológicos desde el nacimiento hasta el comienzo de la audición (ver: (Eatock and Hurley, 2003)). Los cambios anatómicos que ocurren en la inervación de las células ciliadas junto a los observados a nivel de las propiedades eléctricas de estas células, sugieren que la maduración del sistema auditivo periférico involucra importantes transformaciones a nivel de la fisiología sináptica (para extensas revisiones del tema: (Pujol R, 1998; Fritzscht et al., 2002; Simmons, 2002; Eatock and Hurley, 2003)). En este sentido, se ha demostrado que en el órgano de Corti existen importantes cambios en la vías aferente (Beutner and Moser, 2001; Johnson et al., 2009) y eferente durante el desarrollo postnatal (Katz et al., 2004; Marcotti et al., 2004; Roux et al., 2011).

Desde el día del nacimiento hasta el día postnatal 8, la sensibilidad de las CCI a la ACh aplicada en forma exógena se incrementa aproximadamente 37 veces, luego hacia P13, va disminuyendo a valores comparables a los de P0 hasta desaparecer completamente durante la tercera semana postnatal (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Esto va acompañando por un lado, de la retracción de las fibras eferentes (Simmons et al., 1996; Simmons, 2002) y por el otro, de la desaparición de la expresión de dos proteínas postsinápticas fundamentales de las sinapsis MOC-CCIs, a saber, la subunidad nAChR $\alpha 10$ y el canal SK2 (Katz et al., 2004). Consecuentemente con estos cambios, es posible detectar eventos sinápticos mediados por el receptor nAChR $\alpha 9\alpha 10$ solamente entre P1 y P14 (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Utilizando inmunofluorescencia y un antagonista colinérgico de alta afinidad biotinilizado, se demostró que el receptor se localiza en las sinapsis axosomáticas formadas por los terminales de las fibras MOC y las CCIs desde el primer día de vida (Roux et al., 2011). Aunque los mRNA de ambas subunidades del receptor colinérgico se pueden encontrar en las CCIs desde el día embrionario (E) 21 (Morley and Simmons, 2002), no es posible registrar corrientes evocadas por ACh antes de P0. Por otro lado, recién a partir de P1 se encuentran acopladas al canal de potasio SK2, momento del desarrollo en que la sinapsis eferente comienza a ser inhibitoria. Estos reportes, junto a los datos anatómicos disponibles desde hace décadas (para revisiones ver: (Fritzscht et al., 2002; Simmons, 2002)) muestran que la sinapsis eferente transitoria se ensambla durante los últimos días embrionarios; alcanza su funcionalidad durante los primeros días postnatales y se desensambla durante la tercera semana postnatal. Estos cambios tan drásticos en un período tan corto del desarrollo postnatal, hacen que este sistema sea un excelente modelo para el estudio del desarrollo molecular, biofísico y fisiológico de una sinapsis.

En el presente trabajo se abordó el estudio de diferentes aspectos del desarrollo funcional de la sinapsis transitoria entre las fibras eferentes olivocoleares y las células ciliadas internas (MOC-CCIs) antes del comienzo de la audición. Los resultados obtenidos muestran que durante el período que va desde el día postnatal 5 hasta el 11, la sinapsis MOC-CCI atraviesa importantes cambios a nivel de la presinapsis, los cuales podrían modificar la codificación de la información entre las fibras MOC y las CCIs. Estos cambios consisten en alteraciones en la eficiencia de la transmisión sináptica y también en cambios en el tipo de plasticidad de corto término que se observan ante la actividad repetitiva a frecuencias entre 10 y 100 Hz.

5.1 La eficiencia de liberación de ACh aumenta durante el desarrollo postnatal

El análisis de las corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas (eIPSCs) mostró que entre P5-7 y P9-11 se produce un aumento de la fuerza sináptica representado por un aumento en la amplitud de las respuestas evocadas por estimulación eléctrica de las fibras MOC. Dado que la amplitud de las respuestas sinápticas está determinada por factores pre y postsinápticos, se analizaron ambos componentes. En trabajos previos, se mostró la existencia de cambios a nivel de la presinapsis analizando la proporción de células en las que es posible registrar corrientes sinápticas evocadas por la aplicación de una solución extracelular con una concentración alta de K^+ (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Sin embargo, la metodología implementada en esos casos solo permitió detectar la presencia o ausencia de contactos sinápticos funcionales sin proveer información cuantitativa acerca del proceso de neurotransmisión.

El análisis de la cantidad de vesículas sinápticas liberadas por cada estímulo que invade el terminal sináptico, o contenido cuántico (m), reveló que durante el periodo que transcurre entre P5 y P11 ocurre un aumento de aproximadamente 3 veces en la eficiencia de esta sinapsis para liberar neurotransmisor (sección 4.1.3). Este dato indica que la diferencia observada en las amplitudes de las eIPSCs entre los dos grupos etarios estudiados, se debe a fenómenos de naturaleza presináptica. Los valores de m medidos en este trabajo son esencialmente iguales a los medidos por (Goutman et al., 2005) en experimentos realizados en la preparación de órgano de Corti extraídos de ratas.

Cuando se analizaron las corrientes sinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) se vio que durante estos períodos del desarrollo ocurre un cambio en la cinética de estas corrientes mientras que la amplitud de las mismas no se vio modificada. Esto indica que, o existieron cambios que se

compensaron mutuamente, o no hubo modificaciones en el tamaño del cuanto ni en la sensibilidad del receptor postsináptico, confirmando que el cambio observado en la amplitud de las respuestas evocadas se debe a modificaciones presinápticas y no a fenómenos postsinápticos.

La diferencia observada a nivel de la cinética podría deberse a cambios en la expresión de la acetilcolinesterasa (AChE), ya que esta enzima es la responsable de la terminación del evento sináptico (Fonnum, 1973; Aldunate et al., 2004). En la sinapsis neuromuscular de Zebrafish, se vio que los tiempos de decaimiento registrados en los embriones son hasta 3 veces más largos que los registrados algunos días más tarde en las larvas. Esto ocurre debido a que, durante el desarrollo, hay un aumento en la cantidad de AChE presente en la brecha sináptica (Nguyen et al., 1999). Por otro lado, el acople funcional que existe entre el nAChR y el canal de K^+ del tipo SK en las células ciliadas de la cóclea es un determinante muy importante de la cinética de las corrientes sinápticas (Oliver et al., 2000). Cualquier cambio en los buffers intracelulares o en el acople entre estos canales podría ser la causa de los cambios en la cinética de las sIPSCs. Finalmente, dados los cambios anatómicos que ocurren en la inervación eferente durante este periodo del desarrollo (Simmons et al., 1996; Simmons, 2002), otro factor a tener en cuenta son las modificaciones en la morfología de la brecha sináptica. Estas modificaciones podrían generar diferencias en el espacio por el que puede difundir la ACh luego de ser volcada al espacio sináptico, alterándose así la cinética de las respuestas sinápticas.

5.2 La plasticidad de corto término (STP) cambia de facilitación a depresión entre P5-7 y P9-11

En este trabajo se mostró que durante el periodo que transcurre entre el día postnatal 5 y el 11 existe una transformación del tipo de STP en la sinapsis MOC-CCI, pasando de facilitación a depresión de corto término. Este cambio acompaña los cambios descritos a nivel de la eficiencia de liberación. En P5-7, se observó un aumento de la amplitud de las respuestas sinápticas durante el transcurso de un tren de estimulación representado por un incremento de S_x/S_1 . En frecuencias relativamente bajas (10 y 20 Hz), el aumento fue sostenido mientras que con trenes de 40 y 100 Hz, se observó un aumento seguido de una disminución. Sin embargo, en P9-11, solo se observó una disminución de S_x/S_1 durante el transcurso de los trenes independientemente de la frecuencia de estimulación usada (10, 20, 40 y 100 Hz). La variación de la probabilidad de evocar corrientes (P_x) durante el transcurso de un tren de estimulación, demuestra que el cambio es de

naturaleza presináptica. Pero además, la fuerte correlación encontrada entre P_x y S_x/S_1 , indica que la variación observada se explica principalmente por fenómenos de naturaleza presináptica (sección 4.2.1).

Este tipo de transformaciones en el patrón de STP durante el desarrollo han sido observadas en otros sistemas, a saber, la corteza visual entre dos y cuatro semanas después del nacimiento (Chen and Roper, 2004; Frick et al., 2007), el cerebelo durante el mismo período (Pouzat and Hestrin, 1997), en el hipocampo (Scullin et al., 2010) y en el cáliz de Held entre los días postnatales 7 y 14 (Taschenberger and von Gersdorff, 2000; Iwasaki and Takahashi, 2001). En esa preparación, también se documentaron los cambios en la fisiología de las conexiones sinápticas realizando registros de *patch-clamp* in vivo (Crins et al., 2011).

La relación entre los cambios en el contenido cuántico y la STP se conoce desde los primeros estudios de transmisión sináptica con regímenes de actividad repetitiva (Liley, 1956; Thies, 1965) y fue descrita en diferentes preparaciones (Bolshakov and Siegelbaum, 1995; Debanne et al., 1996; Choi and Lovinger, 1997; Pouzat and Hestrin, 1997). La relación que se observa entre el aumento en el contenido cuántico y la depresión de corto término, se explica habitualmente como una mayor depleción del RRP debido a la mayor cantidad de neurotransmisor liberado por los primeros estímulos del tren (Zucker and Regehr, 2002). El resultado obtenido al evaluar el tipo de STP en condiciones de mayor y menor probabilidad de liberación (secciones 4.2.3 y 4.4.1) sugiere una relación de este tipo, sin embargo, como se discutirá en detalle más abajo, el aumento del m en el paso de P5-7 a P9-11 se explica principalmente por un aumento en la cantidad de vesículas listas para ser liberadas y no por un aumento en la probabilidad de liberación (secciones 4.2.6 y 4.2.7). Por lo tanto, es posible descartar la depleción del RRP como principal causa del tipo de STP observada en P9-11.

El único reporte previo de plasticidad sináptica en la sinapsis eferente transitoria a las CCI (Goutman et al., 2005) indica que, en ratas P7-P11, se observa una predominancia de la facilitación de corto término, lo cual contradice los resultados obtenidos en este trabajo. De hecho, cuando se repitieron los experimentos en ratas, se obtuvo un resultado esencialmente igual al reportado por Goutman (sección 4.2.2). Aunque, en este trabajo no se analizó la STP en ratas de otras edades, trabajos previos han demostrado la existencia de diferencias en los momentos del desarrollo en que se forman las principales estructuras del oído de ratas y ratones (Fritsch and Nichols, 1993), lo cual sugiere que podría existir un retraso en la maduración de la inervación eferente MOC en las

ratas respecto a la de los ratones. Esta diferencia en los tiempos de maduración entre ratas y ratones, explicaría las diferencias observadas en la STP de estas especies.

5.3 La relación entre la $[Ca^{2+}]_e$ y el m no se ve modificada

En este trabajo se determinó que la relación entre la $[Ca^{2+}]_e$ y el m es supralineal y sigue una relación potencial como la descrita por (Dodge and Rahamimoff, 1967). El mejor ajuste a este modelo se obtuvo con potencias de entre 2 y 2,5 para ambos estadios sin que existan diferencias significativas entre estos valores. El hecho de que no se hayan encontrado diferencias en las curvas obtenidas para ambos estadios sugiere que no se producen modificaciones en la cooperatividad del sensor de Ca^{2+} para disparar la fusión de vesículas ni en su afinidad por este ion. Cabe mencionar que los valores de cooperatividad medidos en la sinapsis MOC-CCI caen dentro del rango más bajo de los reportados para sinapsis de mamíferos, los cuales varían entre 2 y 5 (Mintz et al., 1995; Borst and Sakmann, 1996; Takahashi et al., 1996; Wu et al., 1999; Rosato-Siri et al., 2002)

Dado que la falta de Mg^{2+} en las soluciones utilizadas para bañar las preparaciones es una condición alejada de lo fisiológico y determinante de la función sináptica (Del Castillo and Katz, 1954c; Dodge and Rahamimoff, 1967), se probó el efecto de agregar concentraciones fisiológicas de este ion en el medio. Cuando se analizó la relación entre el m y la $[Ca^{2+}]_e$ en presencia de $[Mg^{2+}]_e = 0,9$ mM, no se observaron diferencias respecto a la curva realizada en ausencia de Mg^{2+} . Considerando las concentraciones de Mg^{2+} usadas para producir corrimientos muy leves en la mencionada curva en la placa neuromuscular de la rana (de 0,5 a 2 mM para producir un cambio detectable (Dodge and Rahamimoff, 1967)), es posible pensar que el cambio en la $[Mg^{2+}]_e$ de 0 a 0,9 mM no haya sido suficiente para producir cambios significativos en la curva de m versus $[Ca^{2+}]_e$.

5.4 El tamaño del RRP se duplica durante el desarrollo postnatal

El tamaño del RRP (pool de vesículas listas para ser liberadas) se estimó a partir de la aplicación de trenes de estimulación de alta frecuencia (100 Hz) en cada uno de los estadios estudiados. A partir de este análisis se pudo ver que, en la sinapsis MOC-CCI, durante el paso de P5-7 a P9-11, ocurre un incremento de más de 2 veces en la cantidad de vesículas que conforman el RRP (ver sección 4.2.6). Este aumento es comparable en magnitud al aumento registrado en el m (sección 4.1.3) y

es similar a los aumentos observados durante el mismo periodo del desarrollo postnatal en el cáliz de Held (Taschenberger and von Gersdorff, 2000; Iwasaki and Takahashi, 2001).

Como el mantenimiento del RRP es un determinante de la funcionalidad de la sinapsis, se estimó la tasa de reabastecimiento del RRP. Cuando se aplican protocolos de estimulación de alta frecuencia suficientemente largos, una vez alcanzado el estado estacionario (fase lineal del grafico de amplitudes acumuladas de las eIPSCs (Figura 21 sección 4.2.5), la liberación que se observa corresponde a aquellas vesículas que atravesaron todos los pasos necesarios para reabastecer el RRP (Schneppenburger et al., 1999; Fioravante and Regehr, 2011). A partir de la tasa de liberación observada en esa fase, se estimó la tasa de reabastecimiento del RRP. No se observaron cambios en la velocidad con que la sinapsis se reabastece de vesículas sinápticas listas para ser liberadas, lo cual coincide con observaciones realizadas en el cáliz de Held, en donde no se observaron cambios en la tasa de reabastecimiento entre los días postnatales 7 y 14 (Iwasaki and Takahashi, 2001).

Dado que el receptor postsináptico muestra un alto grado de desensibilización (Elgoyhen et al., 2001; Gomez-Casati et al., 2005), una posible limitación de este método sería que se produzca un aplanamiento de la fase lineal de la curva de amplitudes acumuladas y por lo tanto se sobreestime el tamaño del RRP. Sin embargo, dado que se observó una fase lineal claramente definida en todas las células registradas, es posible descartar este efecto.

5.5 La probabilidad de liberación de cada sitio activo se mantiene constante

En esta sinapsis, la probabilidad de liberación de cada sitio activo (Pr) fue estimada a partir del cociente entre el número de vesículas que se liberan en promedio (m) y el tamaño del RRP (N) (sección 4.2.7). Cuando se compararon los valores obtenidos en P5-7 y en P9-11 para la probabilidad de liberación de cada sitio, no se encontraron diferencias entre estadios Pr (0,23 y 0,18, respectivamente). Este resultado es consistente con que los aumentos del m y del N tengan magnitudes similares (Figura 11 y Figura 22) e indica que el aumento observado en el m se debe a un cambio en la cantidad de vesículas listas para ser liberadas y no a un cambio en la eficiencia para liberarlas una vez que llega un potencial de acción al terminal sináptico.

Los valores registrados en este trabajo son similares a los obtenidos en otras preparaciones. En el modelo propuesto por Bollmann et al., 2000 en el cáliz de Held, a partir de datos obtenidos en experimentos de liberación de Ca^{2+} enjaulado y electrofisiología, la probabilidad de liberación de

cada sitio tiene un valor de 0,2. En ese caso, la estimación fue realizada usando incrementos transitorios de la concentración de Ca^{2+} en el terminal que alcanzaban $40 \mu\text{M}$. En la misma preparación, (Schneppenburger et al., 1999) se obtuvo un valor similar usando diferentes abordajes experimentales. En particular, cuando aplicaron el método que se implementó en este trabajo, con una $[\text{Ca}^{2+}]_e = 2 \text{ mM}$ obtuvieron un valor aproximado de $\text{Pr} = 0,21$. Aunque los valores de Pr son de magnitudes comparables, en el cáliz de Held ocurre una situación diferente. En esa preparación, se observa un aumento del tamaño del RRP acompañado de una disminución de Pr y la consecuencia es que el m se mantiene constante durante el transcurso de la segunda semana postnatal. En un trabajo muy reciente, realizado en sinapsis del cerebelo (Valera et al., 2012), también se obtuvieron valores de Pr similares a los obtenidos en la presente tesis, 0,24 en $[\text{Ca}^{2+}]_e = 2,5 \text{ mM}$ y 0,1 en $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,5 \text{ mM}$.

5.6 CCDVs que sostienen la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI

5.6.1 La liberación en P9-11 es sostenida por los CCDVs del tipo N y P/Q

En P9-11, una fracción cercana al 50% de la liberación de ACh resultó sensible a la ω -Agatoxina IVA, antagonista de los CCDV del tipo P/Q, mientras que una fracción similar resultó sensible a la ω -Conotoxina GVIA, antagonista de los CCDV del tipo N (Catterall, 2011). La aplicación simultánea de ambos antagonistas produjo una disminución, casi total, de la liberación de neurotransmisor indicando que los canales del tipo N y P/Q son los principales responsables de sostener la liberación en este estadio del desarrollo postnatal (sección 4.3.1). Estos canales median la neurotransmisión en diversas sinapsis, su contribución relativa varía entre sinapsis (Reid et al., 2003; Catterall, 2011) y entre estadios postnatales (Iwasaki and Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000; Ishikawa et al., 2005). La combinación supra lineal de los efectos de los antagonistas de CCDVs sobre la liberación es considerada como una consecuencia de la cooperatividad del Ca^{2+} en el proceso de liberación del neurotransmisor (Reid et al., 2003). El hecho de que los efectos de la ω -CgTx y de la ω -Aga en cócleas de ratones P9-11 se sumen casi linealmente (sección 4.3.1) tiene sentido a la luz de la baja cooperatividad del Ca^{2+} medida en la sinapsis MOC-CCI (sección 4.1.4).

5.6.2 En P5-7 la neurotransmisión es parcialmente sostenida por los CCDVs del tipo P/Q y, probablemente, también por los del tipo L.

Cuando se incubaron cócleas de ratones P5-7 con ω -CgTx, no se produjeron modificaciones en el m , indicando que los canales del tipo N no están involucrados en la transmisión sináptica en este estadio. En contraste, la aplicación de ω -Aga indujo una disminución de la cantidad de ACh liberada similar a la observada en P9-11, lo cual indica que los canales del tipo P/Q tienen una participación aproximadamente constante en el proceso de neurotransmisión durante todo el periodo del desarrollo estudiado (sección 4.3.5).

En P5-7, la aplicación de Bay-K, agonista de los CCDVs del tipo L, induce un aumento de la liberación del neurotransmisor (sección 4.3.6) mientras que en P9-11 produce una disminución (sección 4.3.2). Este resultado sugiere que los canales del tipo L cumplen funciones diferentes en P5-7 y en P9-11. Es posible que estos canales contribuyan a la liberación del neurotransmisor en P5-7 y que pierdan esta función en el paso a P9-11. Por otro lado, la incubación de cócleas de ratones P5-7 con Bay-K, produjo un aumento de la frecuencia de las sIPSCs. Este resultado apoya aún más la hipótesis de que los canales del tipo L contribuirían a la liberación de ACh en este estadio (sección 4.3.6). Si la hipótesis de que la participación de los CCDVs del tipo L en la liberación de ACh es cierta, esta estaría oscurecida por la participación de los canales de K^+ del tipo BK y la liberación mediada por canales P/Q, ya que el bloqueo de los canales L estaría produciendo una disminución de la liberación y al mismo tiempo un aumento, por no activarse los canales BK. Para demostrar en forma concluyente la participación de los CCDVs del tipo L en la liberación de ACh, habría que bloquear los canales P/Q (para prevenir liberación que no esté mediada por los CCDV del tipo L), los canales BK (para prevenir una posible modulación positiva) y, en esa condición, bloquear los canales L. De esta forma sería posible hacer evidente el efecto que tengan las DHP, agonistas y antagonistas, sobre la liberación de ACh.

5.7 Modulación de la liberación de ACh por acción de los CCDVs del tipo L y los canales de K⁺ del tipo BK

5.7.1 Acople funcional de los CCDVs del tipo L y los canales de K⁺ del tipo BK en P9-11

El hallazgo de que tanto el bloqueo de los CCDVs del tipo L como el de los canales de K⁺ del tipo BK sean capaces de incrementar la cantidad de neurotransmisor liberado (secciones 4.3.2 y 4.3.3), sugiere que ambos tipos de canales están involucrados en un mecanismo de inhibición de la neurotransmisión. Los experimentos de oclusión del efecto de las DHPs sobre la liberación, y el inverso, de oclusión del efecto de IbTx por las DHP, muestran que los CCDV del tipo L afectan la liberación a través de la activación de los canales BK.

Se ha demostrado que la activación de los canales BK puede modular la duración del potencial de acción (Storm, 1987) y, consecuentemente, la liberación del neurotransmisor (Storm, 1987; Lingle et al., 1996; Prakriya and Lingle, 1999). Investigaciones en distintos tipos neuronales demostraron que la activación de los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, del tipo BK, necesita del paso de iones a través de alguno de los diferentes tipos de CCDVs: del tipo L (Storm, 1987; Prakriya and Lingle, 1999), del tipo P/Q (Prakriya and Lingle, 1999; Edgerton and Reinhart, 2003; Womack et al., 2004) y del tipo N (Marrion and Tavalin, 1998). Además, la mayor eficacia del BAPTA, en comparación con el EGTA, para bloquear el acople entre estos tipos de canales sugiere que las distancias entre los canales BK y los CCDV son del orden de decenas de nm (Lancaster and Nicoll, 1987; Storm, 1987; Roberts, 1993; Muller et al., 2007a). Por otro lado, estudios de proteómica muestran que en el cerebro de los mamíferos, varios subtipos de las subunidades α_1 y β de los CCDVs co-inmunoprecipitan con canales del tipo BK (Berkefeld et al., 2006) dado que forman complejos proteicos de muy alto peso molecular. Por espectrometría de masas, los autores de ese trabajo mostraron que las subunidades α_1 corresponden a los subtipos Ca_v 1.2 y Ca_v 2.1 (tipos L y N, respectivamente). (Berkefeld et al., 2006; Berkefeld and Fakler, 2008). Cuando la actividad de los complejos fue estudiada con la técnica de "Patch-Clamp", que permite una gran resolución temporal de las corrientes registradas, se pudo ver que al activar el complejo con pulsos despolarizantes se obtienen respuestas bifásicas. Esto se debe a que la entrada de Ca²⁺ produce primero una corriente entrante rápida y luego, la corriente de K⁺ produce una corriente saliente más lenta. Toda la respuesta tiene un curso temporal de menos de 1 ms y, de manera similar a lo

observado en neuronas, es insensible al agregado de EGTA al medio intracelular pero es sensible al agregado de BAPTA (Berkefeld et al., 2006).

A partir de los resultados presentados en la sección 4.3.4 y los antecedentes que se mostraron más arriba, se postula que los canales de K^+ del tipo BK están acoplados funcionalmente con los CCDVs del tipo L en el terminal presináptico de las fibras eferentes MOC. En este complejo funcional, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales L activaría a los canales BK induciendo una hiperpolarización de la membrana. En particular, como la activación de los canales se produciría durante el potencial de acción, la actividad de los canales BK aceleraría la fase de repolarización disminuyendo así la cantidad de ACh liberada por impulso nervioso que invade el terminal.

5.7.2 Funcionalidad de los canales L y BK en P5-7

La observación de que tanto la Nifedipina (una DHP antagonista) como el Bay-K (una DHP agonista que estabiliza el estado abierto del canal) produjeran un aumento de la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCIs de ratones P5-7, sugiere que los CCDVs del tipo L participan en más de un proceso en este estadio del desarrollo (sección 4.3.6). Por otro lado, al bloquear los canales BK con IbTx se produce un aumento de la liberación de ACh de una magnitud comparable al producido por la Nifedipina (sección 4.3.7). Esto puede ser producido por un acople funcional entre estos dos canales, como el demostrado para P9-11. Por otro lado, el hecho de que tanto el agonista como el antagonista de los CCDVs del tipo L produzcan un aumento de las respuestas sinápticas evocadas, sugiere que estos canales podrían además estar sosteniendo la liberación de ACh. Este fenómeno podría ser posible si los canales del tipo L estuvieran suficientemente cerca de algún sitio activo o la concentración de buffers presentes en el terminal permitieran la difusión del Ca^{2+} a través de una distancia lo suficientemente grande. Cambios en los tipos de CCDVs durante el desarrollo postnatal

Los resultados expuestos en este trabajo muestran que en la sinapsis eferente transitoria a las CCIs, en P5-7, la liberación de ACh no es sensible a la ω -CgTx pero sí es sensible en P9-11, indicando que los CCDVs del tipo N adquieren funcionalidad en la liberación del neurotransmisor durante este periodo. Sin embargo, el caso de los CCDVs del tipo P/Q es diferente ya que en ambos periodos una fracción mayor al 50% del neurotransmisor liberado es sensible a la ω -Aga (sección 4.3).

Existen antecedentes de cambios en la identidad de los canales que sostienen la liberación del neurotransmisor en diferentes sistemas. En la placa neuromuscular de los mamíferos, los tipos de corrientes de calcio que sostienen la liberación pasa de ser una mezcla compuesta por canales del tipo N y P/Q, durante el desarrollo postnatal (Rosato-Siri et al., 2002), a ser casi exclusivamente del tipo P/Q, en individuos adultos (Katz et al., 1997). En esa preparación, las corrientes del tipo L no tienen participación en condiciones normales. Sin embargo, si se inducen lesiones y se evalúa su participación en condiciones de reinervación de las fibras musculares, se observa que entre un 40 / y un 60 / de la liberación del neurotransmisor es sensible a antagonistas de los canales del tipo L (Katz et al., 1996). En el sistema nervioso central, en el sistema dopaminérgico estriatal, una fracción de la liberación del neurotransmisor es sensible a la ω -CgTx. Sin embargo, la fracción sensible disminuye a lo largo del desarrollo postnatal (Momiya, 2003). En sinapsis del cerebelo, durante el desarrollo postnatal temprano, la transmisión sináptica depende de corrientes del tipo N y P/Q. Sin embargo, la fracción sensible a ω -CgTx pasa, de ser más del 50 / del total, a \sim 0 / entre los días postnatales 5 y 19 (Iwasaki et al., 2000). Los mismos autores reportaron un resultado similar para sinapsis del tálamo y el cáliz de Held en el tallo encefálico (Iwasaki and Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000). Sin embargo, en sinapsis de la corteza occipital las fracciones del total de la liberación sensibles a ω -Aga IVA y a ω -CgTx se mantienen constantes entre los días postnatales 10 y 40 (Iwasaki et al., 2000). Estudios hechos en la placa neuromuscular (Rosato-Siri et al., 2002), en el cáliz de Held (Fedchyshyn and Wang, 2005) y en el cerebelo (Mintz et al., 1995) mostraron que los diferentes tipos de CCDV pueden acoplarse de manera diferente a la maquinaria de liberación.

5.8 Cambios en la función de los CCDVs del tipo L

Aunque la contribución de estos CCDVs a la liberación del neurotransmisor normalmente está asociada a sinapsis caracterizadas por una liberación tónica del neurotransmisor (Matthews and Fuchs, 2010) y no es común en sinapsis fásicas (Catterall, 2011), existen situaciones particulares en las que este fenómeno fue observado. En la placa neuromuscular, durante el proceso de reinervación posterior a una lesión, se observó que la liberación del neurotransmisor es sensible a la Nitrendipina, otra DHP antagonista de los CCDVs del tipo L (Katz et al., 1996; Sugiura and Ko, 1997). La sinapsis eferente transitoria a las CCI, no solo está presente en el desarrollo sino que existen evidencias que sugieren que reaparece durante procesos de desnervación inducidos farmacológicamente (Puel et al., 1995) y durante el envejecimiento, cuando una proporción de las

células ciliadas pierde paulatinamente su funcionalidad (Lauer et al., 2012). Dado que las neuronas del sistema MOC comparten el origen embriológico con las neuronas motoras del nervio facial (Bruce et al., 1997; Karis et al., 2001) y la expresión de algunas moléculas clave para su desarrollo (Sanes and Lichtman, 2001; Osman et al., 2008), es posible especular que durante este período, la sinapsis eferente transitoria atraviesa una fase de liberación del neurotransmisor mediada por CCDVs del tipo L, similar a la que atraviesan las neuronas motoras durante el desarrollo (Sugiura and Ko, 1997) o cuando se reinervan las fibras musculares luego de una lesión (Katz et al., 1996; Sugiura and Ko, 1997).

El hecho de que la liberación de ACh en ratones P9-11 se bloquee casi completamente ante la aplicación conjunta o secuencial de los antagonistas específicos de los CCDVs del tipo P/Q y del tipo N (sección 4.3.1), muestran que en este estadio el Ca^{2+} que entra al terminal a través de los CCDVs del tipo L no es capaz de sostener la liberación de ACh. Sin embargo, la entrada a de Ca^{2+} a través de estos canales modula este proceso mediante la activación de los canales BK (sección 4.3.4). Esto sugiere que existe una gran compartimentalización del Ca^{2+} en el terminal sináptico lo que favorecería que este ion cumpla diferentes funciones en forma independiente.

En el cáliz de Held se demostró que la relación espacial existente entre los CCDVs que sostienen la liberación y las vesículas sinápticas cambia a lo largo del desarrollo postnatal (Fedchyshyn and Wang, 2005). Los autores mostraron que durante la maduración de la sinapsis, la distancia entre los CCDVs se acorta, este fenómeno se ve reflejado en una disminución de la efectividad del EGTA para impedir la neurotransmisión. Este cambio hace que la neurotransmisión pase de requerir la superposición de varios microdominios de Ca^{+2} (producidos por la apertura sincrónica de varios canales) a necesitar nanodominios de Ca^{2+} donde uno o pocos canales son suficientes para disparar la fusión de vesículas ubicadas en la proximidad de la boca del canal (Fedchyshyn and Wang, 2005; Kochubey et al., 2009). Además, es posible que la sinapsis exprese, en forma variable a lo largo del desarrollo postnatal, diferentes cantidades y/o tipos de proteínas capaces de unir Ca^{2+} como ocurre en el cáliz de Held donde se ha documentado la variación de la parvalbumina durante el desarrollo (Felmy and Schneggenburger, 2004) y su rol en la transmisión sináptica (Muller et al., 2007b). Si en la sinapsis eferente transitoria ocurriera una situación similar, sería posible que el Ca^{2+} que entra al terminal a través de los CCDVs del tipo L difunda la distancia necesaria para disparar la liberación de ACh durante una fase “inmadura” (P5-7) y no sea capaz de hacerlo durante una fase “madura” (P9-11).

5.9 Relación entre el cambio en la STP y los CCDVs que sostienen la liberación de ACh

Si la Pr no aumenta pero si lo hace el tamaño del RRP, es posible descartar a la depleción del RRP como causante del cambio de facilitación a depresión observado durante el periodo estudiado. Si bien las diferencias halladas a nivel de las corrientes de Ca^{2+} que sostienen la liberación en P9-11 y P5-7 no producen cambios en la probabilidad de liberar neurotransmisor, es posible que diferencias en la sensibilidad a la inactivación u otras formas de modulación de los CCDVs dependientes de la actividad incidan sobre el tipo de STP. De hecho, aunque pueden ser modificadas por las subunidades accesorias, la cinética de inactivación de los canales del tipo L es más lenta que la de los canales del tipo N (Tsien et al., 1988). Por otro lado, trabajos realizados expresando canales en neuronas en cultivo demostraron que mutaciones puntuales diseñadas para alterar la modulación por Ca^{2+} de los CCDVs del tipo P/Q son capaces de modificar fuertemente la STP (Mochida et al., 2008). Estos antecedentes permiten especular que la modulación de los CCDVs dependiente de actividad podría ser diferente en los dos grupos estudiados debido a los diferentes tipos de CCDVs que sostienen la liberación del neurotransmisor y, por lo tanto, generar diferentes tipos de STP. Son pocos los ejemplos donde se documentó depresión de corto término debido a la inactivación de las corrientes de Ca^{2+} . Probablemente, esto se deba a la gran dificultad que implica registrar las corrientes de Ca^{2+} en el terminal sináptico. Sin embargo, se han documentado casos en los que se estableció claramente la relación entre la modulación de los CCDVs dependientes de la actividad y la STP. En neuronas gabaérgicas en cultivo, la inactivación de las corrientes de Ca^{2+} se da paralelamente con la depresión por pulsos pareados (Kirischuk et al., 2002). En el cáliz de Held, se demostró que la disminución de las corrientes de Ca^{2+} presinápticas es responsable de parte de la depresión de corto término que se observa en esa sinapsis (Forsythe et al., 1998; Xu and Wu, 2005).

5.10 La falta de α -sinucleína no afecta la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI de ratones P9-11

En los estudios realizados no se detectaron diferencias entre los ratones portadores de la mutación nula de la α -sinucleína (α -sin) y los ratones salvajes. El hecho de que no se hayan encontrado diferencias en las amplitudes ni en la cinética de las sIPSCs (sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), permite concluir que ni el llenado de las vesículas, ni el

proceso de fusión se ve alterado por la carencia de la α -sin. Tampoco se hallaron diferencias entre los genotipos cuando se evaluó el contenido cuántico (sección 4.5.2), indicando que probablemente, la eficiencia para liberar neurotransmisor cuando un potencial de acción llega al terminal y la cantidad de vesículas listas para ser liberadas sea similar en ambos genotipos.

La STP se evaluó usando protocolos de estimulación de un amplio rango de frecuencias (25, 50 y 100 Hz; sección 4.5.3). En ningún caso se encontraron diferencias entre genotipos, tanto en la amplitud de las corrientes sinápticas ni en la probabilidad de evocarlas. Es posible que exista redundancia entre la función de esta sinucleína y la de las otras proteínas de la familia (β - y γ -sinucleínas). Aunque en este trabajo se usaron frecuencias de estimulación mayores a las usadas en (Cabin et al., 2002) para evidenciar la participación de la α -sin en la transmisión sináptica, es posible que no haya sido un régimen de actividad suficientemente exigente.

Es posible que sean necesarios otra clase de experimentos para evidenciar la función de la α -sin en la sinapsis MOC-CCI. Si su función está asociada a la movilización de vesículas desde el pool de reserva hacia el RRP sería necesario usar protocolos de estimulación capaces de vaciar completamente el RRP y evaluar, a continuación, la tasa de recuperación de la sinapsis. Por otro lado, dado que se han reportado diferencias entre genotipos en el tamaño del RRP (Murphy et al., 2000), es necesario realizar estimaciones de este parámetro como las realizadas en la sección 4.2.6 para completar una caracterización mínima de las consecuencias de la mutación nula del gen de la α -sin.

5.11 Función moduladora de la inervación eferente transitoria a las CCIs

La visión tradicional del desarrollo del sistema nervioso incluye dos fases principales: una temprana en la que se establece el “cableado” inicial de los circuitos y una fase posterior en la que se refina la conectividad. Bajo esta visión, el cableado inicial es la consecuencia de un programa genético predeterminado y rígido, independiente de la actividad neuronal, mientras que el refinamiento se produce por la interacción entre los circuitos recientemente formados y el mundo exterior, a través de la experiencia sensorial (Froemke and Jones, 2011). Sin embargo, esta visión es desafiada por una creciente cantidad de evidencias que apuntan a que los programas determinados genéticamente interactúan con la actividad eléctrica antes de que las experiencias sensoriales moldeen los circuitos neuronales (Blankenship and Feller, 2010).

En estadios muy tempranos del desarrollo la actividad eléctrica ejerce un rol crucial determinando fenómenos como la migración celular, la proliferación, la diferenciación y la especificación del neurotransmisor (ver: (Spitzer, 2012)). A medida que se establecen conexiones sinápticas y emergen circuitos funcionales, se empieza a observar actividad neuronal sincronizada lo largo de extensos grupos de células vecinas. Esa actividad espontánea se ha encontrado en diferentes partes del sistema nervioso en desarrollo y se ha demostrado que cumple diversas funciones. En la médula espinal, por ejemplo, la actividad espontánea participa de la formación de neuritas (Landmesser and O'Donovan, 1984; Hanson et al., 2008), maduración de sinapsis (Gonzalez-Islas and Wenner, 2006) y formación de circuitos generadores de patrones (Marder and Rehm, 2005; Myers et al., 2005). En áreas como el hipocampo (Ben-Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998), la corteza (Garaschuk et al., 2000) y el cerebelo (Watt et al., 2009) se postula que la actividad espontánea participa en la consolidación final de los circuitos (Moody and Bosma, 2005). En los sistemas visual y auditivo, en la retina y en el órgano de Corti, respectivamente, se observa que la actividad espontánea se correlaciona con el patrón de disparo de potenciales de acción de neuronas de proyección durante el periodo del desarrollo en que se están formando los mapas sensoriales (Galli and Maffei, 1988; Meister et al., 1991; Tritsch et al., 2007; Tritsch et al., 2010). Aunque cada estructura comprende circuitos con características únicas, existen rasgos comunes que permiten pensar que la actividad espontánea es una pieza clave para el correcto desarrollo del sistema nervioso (Blankenship and Feller, 2010).

Las vías auditivas aferentes presentan actividad espontánea antes del inicio de la transducción de estímulos sonoros (Carlier et al., 1975; Jones et al., 2001; Glowatzki and Fuchs, 2002; Jones et al., 2007; Tritsch et al., 2007; Tritsch and Bergles, 2010) . Como se mencionó más arriba, se ha postulado que esta actividad participa de la consolidación de circuitos neuronales en desarrollo y se propone que es esencial para su correcto establecimiento, estando involucrada en procesos de diferenciación neuronal, proliferación y migración (Kandler, 2004; Spitzer, 2006; Blankenship and Feller, 2010; Spitzer, 2012). En el sistema auditivo, la anulación de esta actividad resulta en alteraciones de circuitos del procesamiento auditivo (Friauf and Lohmann, 1999; Gabriele et al., 2000; Rubel and Fritsch, 2002; Kandler, 2004; Leake et al., 2006; Leao et al., 2006).

Estos postulados, implican la existencia de mecanismos de autorregulación del sistema nervioso por el cual se determina el tipo de actividad que se desarrolla antes de que los estímulos sensoriales comiencen a incidir sobre estos patrones. En este sentido, la inervación transitoria a

las células ciliadas de la cóclea podría dar cuenta de un mecanismo de regulación, comandado por la actividad del sistema nervioso central, que varía sus características junto con el propio sistema auditivo durante su conformación.

6 Conclusiones Generales

En este trabajo se caracterizó el desarrollo postnatal de la sinapsis eferente transitoria MOC-CCI durante un periodo previo al comienzo de la audición comprendido entre los días postnatales 5 y 11.

- El número de vesículas que son liberadas por la llegada de un potencial de acción al terminal sináptico aumenta durante el desarrollo postnatal previo al comienzo de la audición.
- La cooperatividad del Ca^{2+} para producir la liberación de ACh es baja y no se ve alterada durante el periodo estudiado.
- La probabilidad de que cada sitio activo libere el contenido de una vesícula se mantiene constante. Sin embargo, el número de vesículas listas para ser liberadas aumenta durante la fase del desarrollo estudiada. Esta sería la causa del aumento en la cantidad de vesículas liberadas por potencial de acción y consecuentemente, de la amplitud de las respuestas sinápticas (Figura 46).
- Los CCDVs del tipo P/Q sostienen la neurotransmisión durante todo el período del desarrollo estudiado. Sin embargo, los CCDV del tipo N comienzan a participar en el proceso de liberación del neurotransmisor, junto a los P/Q, en el período P9-11 (Figura 46)
- Existe un mecanismo de inhibición de la transmisión sináptica constituido por la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs del tipo L y la consecuente activación de los canales de K^+ del tipo BK. Este mecanismo actúa durante todo el periodo estudiado. En las fases más inmaduras del desarrollo de esta sinapsis (P5-7), los CCDV del tipo L también contribuirían a sostener la liberación de ACh (Figura 46).
- El cambio en las respuestas sinápticas está acompañado por un cambio en el tipo de plasticidad de corto término, pasando de facilitación en P5-7 a depresión en P9-11.
- El cambio de plasticidad de corto término podría ser consecuencia del cambio en la identidad y localización de los CCDVs y no del aumento en la eficiencia de liberación del neurotransmisor.

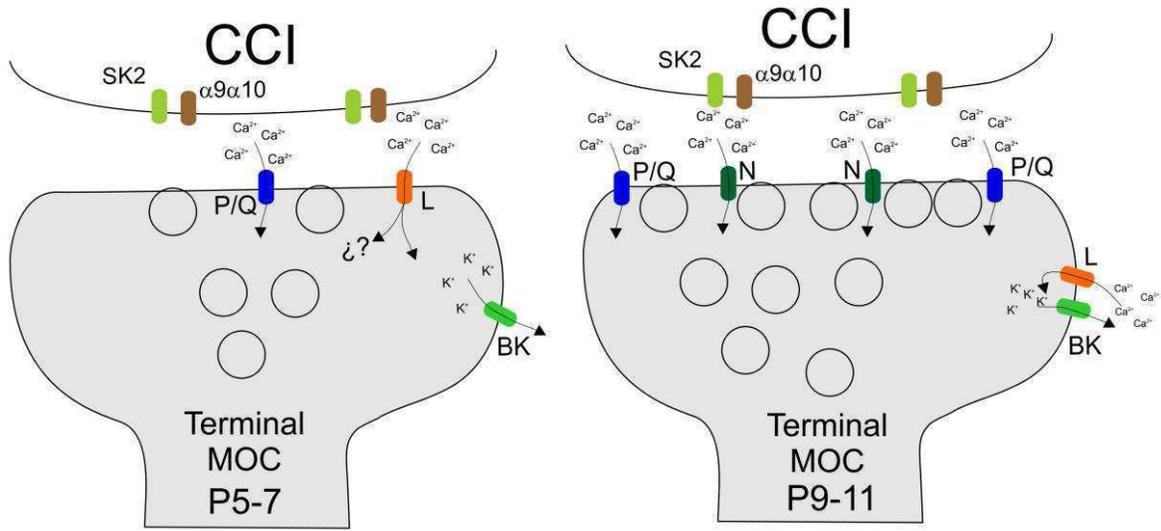


Figura 46: Esquema representativo de los cambios que ocurren en la sinapsis MOC-CCI ente P5-7 (izquierda) y P9-11 (derecha).

7 Referencias

- Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. *Nature* 431:796-803.
- Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11:1496-1507.
- Akil O, Weber CM, Park SN, Ninkina N, Buchman V, Lustig LR (2008) Localization of synucleins in the mammalian cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 9:452-463.
- Aldunate R, Casar JC, Brandan E, Inestrosa NC (2004) Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Brain Res Rev* 47:96-104.
- Ashmore J (2008) Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88:173-210.
- Atluri PP, Regehr WG (1996) Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *J Neurosci* 16:5661-5671.
- Atwood HL, Karunanithi S (2002) Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3:497-516.
- Auger C, Marty A (1997) Heterogeneity of functional synaptic parameters among single release sites. *Neuron* 19:139-150.
- Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331-346.
- Ballesterro J, Zorrilla de San Martin J, Goutman J, Elgoyhen AB, Fuchs PA, Katz E (2011) Short-Term Synaptic Plasticity Regulates the Level of Olivocochlear Inhibition to Auditory Hair Cells. *J Neurosci* 31:14763-14774.
- Bao L, Cox DH (2005) Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca²⁺ sensitivity is enhanced by its beta1 subunit. *J Gen Physiol* 126:393-412.
- Bean BP (1989) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.

- Bennett MR, Kearns JL (2000) Statistics of transmitter release at nerve terminals. *Prog Neurobiol* 60:545-606.
- Berkefeld H, Fakler B (2008) Repolarizing responses of BKCa-Cav complexes are distinctly shaped by their Cav subunits. *J Neurosci* 28:8238-8245.
- Berkefeld H, Fakler B, Schulte U (2010) Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* 90:1437-1459.
- Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schulte U, Fakler B (2006) BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* 314:615-620.
- Betz WJ (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 206:629-644.
- Beurg M, Evans MG, Hackney CM, Fettiplace R (2006) A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 26:10992-11000.
- Beutner D, Moser T (2001) The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J Neurosci* 21:4593-4599.
- Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.
- Blitz DM, Foster KA, Regehr WG (2004) Short-term synaptic plasticity: a comparison of two synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:630-640.
- Boland LM, Morrill JA, Bean BP (1994) omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:5011-5027.
- Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1995) Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269:1730-1734.
- Bollmann JH, Sakmann B, Borst JG (2000) Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* 289:953-957.
- Borst JG, Sakmann B (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383:431-434.
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2:407-415.

- Brandt A, Khimich D, Moser T (2005) Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25:11577-11585.
- Brown AM, Kunze DL, Yatani A (1984) The agonist effect of dihydropyridines on Ca channels. *Nature* 311:570-572.
- Brown GL, Dale HH, Feldberg W (1936) Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and to eserine. *J Physiol* 87:394-424.
- Brown MC (1989) Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. *Hear Res* 40:93-109.
- Brown MC, Nuttall AL (1984) Efferent control of cochlear inner hair cell responses in the guinea-pig. *J Physiol* 354:625-646.
- Brown MC, Kujawa SG, Duca ML (1998) Single olivocochlear neurons in the guinea pig. I. Binaural facilitation of responses to high-level noise. *J Neurophysiol* 79:3077-3087.
- Bruce LL, Kingsley J, Nichols DH, Fritzsche B (1997) The development of vestibulocochlear efferents and cochlear afferents in mice. *Int J Dev Neurosci* 15:671-692.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 22:8797-8807.
- Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.
- Carlier E, Abonnenc M, Pujol R (1975) [Maturation of unitary responses to tonal stimulation in the cochlear nerve of the kitten]. *J Physiol (Paris)* 70:129-138.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
- Cole KS, Robertson D (1992) Early efferent innervation of the developing rat cochlea studied with a carbocyanine dye. *Brain Res* 575:223-230.
- Cooper NP, Guinan JJ, Jr. (2006) Efferent-mediated control of basilar membrane motion. *J Physiol* 576:49-54.

- Crawford AC, Evans MG, Fettiplace R (1989) Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells. *J Physiol* 419:405-434.
- Crawford AC, Evans MG, Fettiplace R (1991) The actions of calcium on the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells. *J Physiol* 434:369-398.
- Crins TT, Rusu SI, Rodriguez-Contreras A, Borst JG (2011) Developmental changes in short-term plasticity at the rat calyx of Held synapse. *J Neurosci* 31:11706-11717.
- Chad JE, Eckert R (1984) Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of CA-dependent responses. *Biophys J* 45:993-999.
- Chen HX, Roper SN (2004) Tonic activity of metabotropic glutamate receptors is involved in developmental modification of short-term plasticity in the neocortex. *J Neurophysiol* 92:838-844.
- Choi S, Lovinger DM (1997) Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2665-2670.
- Dale HH (1934) The Chemical Transmission of Nerve Impulses. *Science* 80:450.
- Dale HH, Feldberg W, Vogt M (1936) Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol* 86:353-380.
- Dallos P, Harris D (1978) Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 41:365-383.
- Dallos P, Popper AN, Fay RR (1996) *The cochlea*. New York: Springer.
- Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L, Dolphin AC (2007) Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 28:220-228.
- Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC (2010) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1654-1659.
- De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* 35:10392-10402.

- Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 491 (Pt 1):163-176.
- Del Castillo J, Stark L (1952) The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. *J Physiol* 116:507-515.
- Del Castillo J, Katz B (1954a) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Del Castillo J, Katz B (1954b) Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J Physiol* 124:574-585.
- Del Castillo J, Katz B (1954c) The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J Physiol* 124:553-559.
- Delaney KR, Tank DW (1994) A quantitative measurement of the dependence of short-term synaptic enhancement on presynaptic residual calcium. *J Neurosci* 14:5885-5902.
- Deng PY, Klyachko VA (2011) The diverse functions of short-term plasticity components in synaptic computations. *Commun Integr Biol* 4:543-548.
- Dittman JS, Regehr WG (1998) Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to Purkinje cell synapse. *J Neurosci* 18:6147-6162.
- Dodge FA, Jr., Rahamimoff R (1967) Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193:419-432.
- Doering CJ, Zamponi GW (2003) Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.
- Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:599-620.
- Du Bois-Reymond EH (1848) *Untersuchungen über thierische elektricität*. Berlin,; G. Reimer.
- Dulon D, Lenoir M (1996) Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 8:1945-1952.
- Eatock RA, Hurley KM (2003) Functional development of hair cells. *Curr Top Dev Biol* 57:389-448.
- Edgerton JR, Reinhart PH (2003) Distinct contributions of small and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* 548:53-69.

- Edwards RH (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55:835-858.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-715.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (2001) alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506.
- Elmqvist D, Quastel DM (1965) A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol* 178:505-529.
- Elmqvist D, Hofmann WW, Kugelberg J, Quastel DM (1964) An Electrophysiological Investigation of Neuromuscular Transmission in Myasthenia Gravis. *J Physiol* 174:417-434.
- Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A, et al. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241:1661-1664.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Evans EF, Harrison RV (1976) Proceedings: Correlation between cochlear outer hair cell damage and deterioration of cochlear nerve tuning properties in the guinea-pig. *J Physiol* 256:43P-44P.
- Evans MG (1996) Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J Physiol* 491 (Pt 2):563-578.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309-373.
- Fakler B, Adelman JP (2008) Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59:873-881.
- Fatt P, Katz B (1950) Some observations on biological noise. *Nature* 166:597-598.
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109-128.
- Fedchyshyn MJ, Wang LY (2005) Developmental transformation of the release modality at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 25:4131-4140.

- Felmy F, Schneggenburger R (2004) Developmental expression of the Ca²⁺-binding proteins calretinin and parvalbumin at the calyx of Held of rats and mice. *Eur J Neurosci* 20:1473-1482.
- Fettiplace R (2009) Defining features of the hair cell mechano-electrical transducer channel. *Pflugers Arch* 458:1115-1123.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21:269-274.
- Fioravante D, Chu Y, Myoga MH, Leitges M, Regehr WG (2011) Calcium-dependent isoforms of protein kinase C mediate posttetanic potentiation at the calyx of Held. *Neuron* 70:1005-1019.
- Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:563-590.
- Flink MT, Atchison WD (2003) Iberiotoxin-induced block of Ca²⁺-activated K⁺ channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 305:646-652.
- Fonnum F (1973) Recent developments in biochemical investigations of cholinergic transmission. *Brain Res* 62:497-507.
- Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T (1998) Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20:797-807.
- Franchini LF, Elgoyhen AB (2006) Adaptive evolution in mammalian proteins involved in cochlear outer hair cell electromotility. *Mol Phylogenet Evol* 41:622-635.
- Friauf E, Lohmann C (1999) Development of auditory brainstem circuitry. Activity-dependent and activity-independent processes. *Cell Tissue Res* 297:187-195.
- Frick A, Feldmeyer D, Sakmann B (2007) Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. *J Physiol* 585:103-116.
- Fritsch B, Nichols DH (1993) Dil reveals a prenatal arrival of efferents at the differentiating otocyst of mice. *Hear Res* 65:51-60.
- Fritsch B, Beisel KW, Jones K, Farinas I, Maklad A, Lee J, Reichardt LF (2002) Development and evolution of inner ear sensory epithelia and their innervation. *J Neurobiol* 53:143-156.

- Froemke RC, Jones BJ (2011) Development of auditory cortical synaptic receptive fields. *Neurosci Biobehav Rev* 35:2105-2113.
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452-458.
- Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000) Plasticity in the development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat after unilateral cochlear ablation. *J Neurosci* 20:6939-6949.
- Galambos R (1956) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19:424-437.
- Galambos R, Davis H (1943) THE RESPONSE OF SINGLE AUDITORY-NERVE FIBERS TO ACOUSTIC STIMULATION *Journal of Neurophysiology* 6:39-57.
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-11090.
- Galli L, Maffei L (1988) Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science* 242:90-91.
- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 507 (Pt 1):219-236.
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3:452-459.
- Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H (1993) Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69:236-242.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2000) Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288:2366-2368.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147-154.
- Gomez-Casati ME, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Katz E (2005) Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *J Physiol* 566:103-118.

- Gonzalez-Islas C, Wenner P (2006) Spontaneous network activity in the embryonic spinal cord regulates AMPAergic and GABAergic synaptic strength. *Neuron* 49:563-575.
- Goutman JD, Fuchs PA, Glowatzki E (2005) Facilitating efferent inhibition of inner hair cells in the cochlea of the neonatal rat. *J Physiol* 566:49-59.
- Grimes WN, Li W, Chavez AE, Diamond JS (2009) BK channels modulate pre- and postsynaptic signaling at reciprocal synapses in retina. *Nat Neurosci* 12:585-592.
- Grunnet M, Kaufmann WA (2004) Coassembly of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in rat brain. *J Biol Chem* 279:36445-36453.
- Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP (1996) Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16:431-440.
- Hagiwara S, Ozawa S, Sand O (1975) Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65:617-644.
- Hanson MG, Milner LD, Landmesser LT (2008) Spontaneous rhythmic activity in early chick spinal cord influences distinct motor axon pathfinding decisions. *Brain Res Rev* 57:77-85.
- Hefft S, Kraushaar U, Geiger JR, Jonas P (2002) Presynaptic short-term depression is maintained during regulation of transmitter release at a GABAergic synapse in rat hippocampus. *J Physiol* 539:201-208.
- Holohean AM, Magleby KL (2011) The number of components of enhancement contributing to short-term synaptic plasticity at the neuromuscular synapse during patterned nerve stimulation progressively decreases as basal release probability is increased from low to normal levels by changing extracellular Ca²⁺. *J Neurosci* 31:7060-7072.
- Horrigan FT, Aldrich RW (1999) Allosteric voltage gating of potassium channels II. Mslo channel gating charge movement in the absence of Ca(2+). *J Gen Physiol* 114:305-336.
- Horrigan FT, Aldrich RW (2002) Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol* 120:267-305.
- Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40:277-295.
- Hosoi N, Sakaba T, Neher E (2007) Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 27:14286-14298.

- Housley GD, Ashmore JF (1991) Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc Biol Sci* 244:161-167.
- Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, Laake P, Pongs O, Knaus HG, Ottersen OP, Storm JF (2001) Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 21:9585-9597.
- Inchauspe CG, Forsythe ID, Uchitel OD (2007) Changes in synaptic transmission properties due to the expression of N-type calcium channels at the calyx of Held synapse of mice lacking P/Q-type calcium channels. *J Physiol* 584:835-851.
- Ishikawa T, Kaneko M, Shin HS, Takahashi T (2005) Presynaptic N-type and P/Q-type Ca²⁺ channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice. *J Physiol* 568:199-209.
- Iwasaki S, Takahashi T (1998) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* 509 (Pt 2):419-423.
- Iwasaki S, Takahashi T (2001) Developmental regulation of transmitter release at the calyx of Held in rat auditory brainstem. *J Physiol* 534:861-871.
- Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T (2000) Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20:59-65.
- Jensen K, Jensen MS, Lambert JD (1999) Role of presynaptic L-type Ca²⁺ channels in GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 81:1225-1230.
- Johnson SL, Franz C, Knipper M, Marcotti W (2009) Functional maturation of the exocytotic machinery at gerbil hair cell ribbon synapses. *J Physiol* 587:1715-1726.
- Johnson SL, Beurg M, Marcotti W, Fettiplace R (2011a) Prestin-driven cochlear amplification is not limited by the outer hair cell membrane time constant. *Neuron* 70:1143-1154.
- Johnson SL, Eckrich T, Kuhn S, Zampini V, Franz C, Ranatunga KM, Roberts TP, Masetto S, Knipper M, Kros CJ, Marcotti W (2011b) Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat Neurosci* 14:711-717.
- Jones TA, Jones SM, Paggett KC (2001) Primordial rhythmic bursting in embryonic cochlear ganglion cells. *J Neurosci* 21:8129-8135.
- Jones TA, Leake PA, Snyder RL, Stakhovskaya O, Bonham B (2007) Spontaneous discharge patterns in cochlear spiral ganglion cells before the onset of hearing in cats. *J Neurophysiol* 98:1898-1908.

- Kandler K (2004) Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr Opin Neurobiol* 14:96-104.
- Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D, Fritsch B (2001) Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol* 429:615-630.
- Katz B, Miledi R (1966) Input-output relation of a single synapse. *Nature* 212:1242-1245.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Katz E, Ferro PA, Weisz G, Uchitel OD (1996) Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 497 (Pt 3):687-697.
- Katz E, Protti DA, Ferro PA, Rosato Siri MD, Uchitel OD (1997) Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 121:1531-1540.
- Katz E, Verbitsky M, Rothlin CV, Vetter DE, Heinemann SF, Elgoyhen AB (2000) High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res* 141:117-128.
- Katz E, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs PA, Glowatzki E (2004) Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24:7814-7820.
- Kemp DT (1978) Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64:1386-1391.
- Kiang NY, Watanabe T, Thomas EC, Clark LF (1962) Stimulus coding in the cat's auditory nerve. Preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 71:1009-1026.
- Kirischuk S, Clements JD, Grantyn R (2002) Presynaptic and postsynaptic mechanisms underlie paired pulse depression at single GABAergic boutons in rat collicular cultures. *J Physiol* 543:99-116.
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 19:684-691.
- Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Münkner S, Knipper M, Engel J (2007) Persistence of Cav1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *The Journal of neuroscience* 27:6442-6451.

- Kochubey O, Han Y, Schneggenburger R (2009) Developmental regulation of the intracellular Ca²⁺ sensitivity of vesicle fusion and Ca²⁺-secretion coupling at the rat calyx of Held. *J Physiol* 587:3009-3023.
- Kros CJ, Ruppersberg JP, Rusch A (1998) Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394:281-284.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-108.
- Kushmerick C, Renden R, von Gersdorff H (2006) Physiological temperatures reduce the rate of vesicle pool depletion and short-term depression via an acceleration of vesicle recruitment. *J Neurosci* 26:1366-1377.
- Lancaster B, Nicoll RA (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 389:187-203.
- Landmesser LT, O'Donovan MJ (1984) Activation patterns of embryonic chick hind limb muscles recorded in ovo and in an isolated spinal cord preparation. *J Physiol* 347:189-204.
- Lauer AM, Fuchs PA, Ryugo DK, Francis HW (2012) Efferent synapses return to inner hair cells in the aging cochlea. *Neurobiol Aging*.
- Layton MG, Robertson D, Everett AW, Mulders WHAM, Yates GK (2005) Cellular localization of voltage-gated calcium channels and synaptic vesicle-associated proteins in the guinea pig cochlea. *Journal of molecular neuroscience* 27:225-244.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.
- Leake PA, Hradek GT, Chair L, Snyder RL (2006) Neonatal deafness results in degraded topographic specificity of auditory nerve projections to the cochlear nucleus in cats. *J Comp Neurol* 497:13-31.
- Leao RN, Sun H, Svahn K, Berntson A, Youssoufian M, Paolini AG, Fyffe RE, Walmsley B (2006) Topographic organization in the auditory brainstem of juvenile mice is disrupted in congenital deafness. *J Physiol* 571:563-578.
- Lenoir M, Shneron A, Pujol R (1980) Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 160:253-262.

- Liberman MC (1980) Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:189-204.
- Liberman MC (1982) The cochlear frequency map for the cat: labeling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J Acoust Soc Am* 72:1441-1449.
- Liberman MC, Brown MC (1986) Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res* 24:17-36.
- Liley AW (1956) The quantal components of the mammalian end-plate potential. *J Physiol* 133:571-587.
- Liley AW, North KA (1953) An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 16:509-527.
- Lingle CJ, Solaro CR, Prakriya M, Ding JP (1996) Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* 4:261-301.
- Loane DJ, Lima PA, Marrion NV (2007) Co-assembly of N-type Ca²⁺ and BK channels underlies functional coupling in rat brain. *J Cell Sci* 120:985-995.
- Loewi O (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. *Pflügers Archiv* 189:239-242.
- Luo L, Bennett T, Jung HH, Ryan AF (1998) Developmental expression of alpha 9 acetylcholine receptor mRNA in the rat cochlea and vestibular inner ear. *J Comp Neurol* 393:320-331.
- Llinas R, Nicholson C (1975) Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:187-190.
- Llinas R, Blinks JR, Nicholson C (1972) Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. *Science* 176:1127-1129.
- Llinas R, Sugimori M, Simon SM (1982) Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2415-2419.
- Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15:351-355.
- Llinas RR, Sugimori M, Cherksey B (1989) Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci* 560:103-111.

- Magleby KL (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol* 121:81-96.
- Manley GA, Koppl C (1998) Phylogenetic development of the cochlea and its innervation. *Curr Opin Neurobiol* 8:468-474.
- Marcantoni A, Vandael DH, Mahapatra S, Carabelli V, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Carbone E (2010) Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 30:491-504.
- Marcotti W, Kros CJ (1999) Developmental expression of the potassium current $I_{K,n}$ contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* 520 Pt 3:653-660.
- Marcotti W, Johnson SL, Kros CJ (2004) A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 560:691-708.
- Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, Kros CJ (2003) Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J Physiol* 548:383-400.
- Marder E, Rehm KJ (2005) Development of central pattern generating circuits. *Curr Opin Neurobiol* 15:86-93.
- Marrion NV, Tavalin SJ (1998) Selective activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature* 395:900-905.
- Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812-822.
- Matveev V, Zucker RS, Sherman A (2004) Facilitation through buffer saturation: constraints on endogenous buffering properties. *Biophys J* 86:2691-2709.
- Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ (1991) Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* 252:939-943.
- Mintz IM, Adams ME, Bean BP (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85-95.
- Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG (1995) Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15:675-688.
- Mochida S, Few AP, Scheuer T, Catterall WA (2008) Regulation of presynaptic $Ca_v2.1$ channels by Ca^{2+} sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron* 57:210-216.

- Momiyama T (2003) Parallel decrease in omega-conotoxin-sensitive transmission and dopamine-induced inhibition at the striatal synapse of developing rats. *J Physiol* 546:483-490.
- Moody WJ, Bosma MM (2005) Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 85:883-941.
- Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, et al. (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350:398-402.
- Morley BJ, Simmons DD (2002) Developmental mRNA expression of the alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit in the rat cochlea. *Brain Res Dev Brain Res* 139:87-96.
- Mountain DC (1980) Changes in endolymphatic potential and crossed olivocochlear bundle stimulation alter cochlear mechanics. *Science* 210:71-72.
- Muller A, Kukley M, Uebachs M, Beck H, Dietrich D (2007a) Nanodomains of single Ca²⁺ channels contribute to action potential repolarization in cortical neurons. *J Neurosci* 27:483-495.
- Muller M, Felmy F, Schwaller B, Schneggenburger R (2007b) Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca²⁺ buffer in the calyx of held that accelerates the decay of Ca²⁺ and short-term facilitation. *J Neurosci* 27:2261-2271.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:3214-3220.
- Murthy VN, Stevens CF (1999) Reversal of synaptic vesicle docking at central synapses. *Nat Neurosci* 2:503-507.
- Myers CP, Lewcock JW, Hanson MG, Gosgnach S, Aimone JB, Gage FH, Lee KF, Landmesser LT, Pfaff SL (2005) Cholinergic input is required during embryonic development to mediate proper assembly of spinal locomotor circuits. *Neuron* 46:37-49.
- Naraghi M, Neher E (1997) Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci* 17:6961-6973.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389-399.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861-872.

- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2010) Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Neuron* 65:66-79.
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (1996a) Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. I. Properties of the response. *Hear Res* 101:132-148.
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (1996b) Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance Ca(2+)-activated K+ channel. *Hear Res* 101:149-172.
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37:15353-15362.
- Nguyen PV, Aniksztejn L, Catarsi S, Drapeau P (1999) Maturation of neuromuscular transmission during early development in zebrafish. *J Neurophysiol* 81:2852-2861.
- Nicholls JG (2001) *From neuron to brain*, 4th Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Ohmori H (1985) Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J Physiol* 359:189-217.
- Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppersberg JP, Fakler B (2000) Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595-601.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867.
- Osman AA, Schrader AD, Hawkes AJ, Akil O, Bergeron A, Lustig LR, Simmons DD (2008) Muscle-like nicotinic receptor accessory molecules in sensory hair cells of the inner ear. *Mol Cell Neurosci* 38:153-169.
- Park SN, Back SA, Choung YH, Kim HL, Akil O, Lustig LR, Park KH, Yeo SW (2011) Alpha-synuclein deficiency and efferent nerve degeneration in the mouse cochlea: a possible cause of early-onset presbycusis. *Neurosci Res* 71:303-310.

- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Perissinotti PP, Giugovaz Tropper B, Uchitel OD (2008) L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 27:1333-1344.
- Petersen OH, Maruyama Y (1984) Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307:693-696.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102:89-97.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Pouzat C, Hestrin S (1997) Developmental regulation of basket/stellate cell-->Purkinje cell synapses in the cerebellum. *J Neurosci* 17:9104-9112.
- Prakriya M, Lingle CJ (1999) BK channel activation by brief depolarizations requires Ca²⁺ influx through L- and Q-type Ca²⁺ channels in rat chromaffin cells. *J Neurophysiol* 81:2267-2278.
- Puel JL, Uziel A (1987) Correlative development of cochlear action potential sensitivity, latency, and frequency selectivity. *Brain Res* 465:179-188.
- Puel JL, Saffiedine S, Gervais d'Aldin C, Eybalin M, Pujol R (1995) Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III* 318:67-75.
- Pujol R L-RM, Lenoir M (1998) Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea. In: *Development of the auditory system* (Springer-Verlag, ed), pp 146-192. New York.
- Raffaelli G, Saviane C, Mohajerani MH, Pedarzani P, Cherubini E (2004) BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J Physiol* 557:147-157.
- Ran I, Quastel DM, Mathers DA, Puil E (2009) Fluctuation analysis of tetanic rundown (short-term depression) at a corticothalamic synapse. *Biophys J* 96:2505-2531.

- Randall A, Tsien RW (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995-3012.
- Regehr WG, Delaney KR, Tank DW (1994) The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurosci* 14:523-537.
- Reid CA, Bekkers JM, Clements JD (2003) Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci* 26:683-687.
- Rhode WS (1971) Observations of the vibration of the basilar membrane in squirrel monkeys using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 49:Suppl 2:1218+.
- Ricci A (2002) Differences in mechano-transducer channel kinetics underlie tonotopic distribution of fast adaptation in auditory hair cells. *J Neurophysiol* 87:1738-1748.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6:57-69.
- Roberts WM (1993) Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Nature* 363:74-76.
- Robertson D, Gummer M (1985) Physiological and morphological characterization of efferent neurones in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 20:63-77.
- Robertson D, Harvey AR, Cole KS (1989) Postnatal development of the efferent innervation of the rat cochlea. *Brain Res Dev Brain Res* 47:197-207.
- Robitaille R, Charlton MP (1992) Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 12:297-305.
- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP (1993) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11:645-655.
- Robles L, Ruggero MA (2001) Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81:1305-1352.
- Robles L, Ruggero MA, Rich NC (1986) Basilar membrane mechanics at the base of the chinchilla cochlea. I. Input-output functions, tuning curves, and response phases. *J Acoust Soc Am* 80:1364-1374.
- Rosato-Siri MD, Piriz J, Tropper BA, Uchitel OD (2002) Differential Ca²⁺-dependence of transmitter release mediated by P/Q- and N-type calcium channels at neonatal rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 15:1874-1880.

- Rosato Siri MD, Uchitel OD (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol* 514 (Pt 2):533-540.
- Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16:1197-1207.
- Rothlin CV, Katz E, Verbitsky M, Elgoyhen AB (1999) The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine, and type 3 serotonin receptors. *Mol Pharmacol* 55:248-254.
- Rothlin CV, Lioudyno MI, Silbering AF, Plazas PV, Casati ME, Katz E, Guth PS, Elgoyhen AB (2003) Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 63:1067-1074.
- Roux I, Wersinger E, McIntosh JM, Fuchs PA, Glowatzki E (2011) Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J Neurosci* 31:15092-15101.
- Rubel EW, Fritzsche B (2002) Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51-101.
- Rubel EW, Popper AN, Fay RR (1998) Development of the auditory system. New York: Springer.
- Ryan A, Dallos P (1975) Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature* 253:44-46.
- Sakaba T (2008) Two Ca(2+)-dependent steps controlling synaptic vesicle fusion and replenishment at the cerebellar basket cell terminal. *Neuron* 57:406-419.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A (2006) High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 7:921-931.
- Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791-805.
- Scullin CS, Wilson MC, Partridge LD (2010) Developmental changes in presynaptic Ca(2 +) clearance kinetics and synaptic plasticity in mouse Schaffer collateral terminals. *Eur J Neurosci* 31:817-826.
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858-5867.
- Schikorski T, Stevens CF (1999) Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4107-4112.

- Schneggenburger R, Neher E (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406:889-893.
- Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 23:399-409.
- Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E (2002) Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci* 25:206-212.
- Scholz KP, Miller RJ (1995) Developmental changes in presynaptic calcium channels coupled to glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 15:4612-4617.
- Schreiber M, Salkoff L (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* 73:1355-1363.
- Sellick PM, Patuzzi R, Johnstone BM (1982) Measurement of basilar membrane motion in the guinea pig using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 72:131-141.
- Sidach SS, Mintz IM (2000) Low-affinity blockade of neuronal N-type Ca channels by the spider toxin omega-agatoxin-IVA. *J Neurosci* 20:7174-7182.
- Siegel JH, Kim DO (1982) Efferent neural control of cochlear mechanics? Olivocochlear bundle stimulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. *Hear Res* 6:171-182.
- Simmons DD (2002) Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53:228-250.
- Simmons DD, Morley BJ (1998) Differential expression of the alpha 9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in neonatal and adult cochlear hair cells. *Brain Res Mol Brain Res* 56:287-292.
- Simmons DD, Mansdorf NB, Kim JH (1996) Olivocochlear innervation of inner and outer hair cells during postnatal maturation: evidence for a waiting period. *J Comp Neurol* 370:551-562.
- Simmons DD, Manson-Gieseke L, Hendrix TW, McCarter S (1990) Reconstructions of efferent fibers in the postnatal hamster cochlea. *Hear Res* 49:127-139.
- Simon SM, Llinas RR (1985) Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. *Biophys J* 48:485-498.
- Snutch TP (2005) Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx* 2:662-670.

- Snutch TP, Reiner PB (1992) Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 2:247-253.
- Spillantini MG, Goedert M (2000) The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci* 920:16-27.
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444:707-712.
- Spitzer NC (2012) Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nat Rev Neurosci* 13:94-106.
- Starr TV, Prystay W, Snutch TP (1991) Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5621-5625.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385:733-759.
- Sudhof TC (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28:317-320.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Sugiura Y, Ko CP (1997) Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17:1101-1111.
- Sun X, Gu XQ, Haddad GG (2003) Calcium influx via L- and N-type calcium channels activates a transient large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ current in mouse neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 23:3639-3648.
- Sweet TB, Cox DH (2008) Measurements of the BKCa channel's high-affinity Ca²⁺ binding constants: effects of membrane voltage. *J Gen Physiol* 132:491-505.
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274:594-597.
- Taschenberger H, von Gersdorff H (2000) Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:9162-9173.

- Thies RE (1965) Neuromuscular Depression and the Apparent Depletion of Transmitter in Mammalian Muscle. *J Neurophysiol* 28:428-442.
- Tritsch NX, Bergles DE (2010) Developmental regulation of spontaneous activity in the Mammalian cochlea. *J Neurosci* 30:1539-1550.
- Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450:50-55.
- Tritsch NX, Rodriguez-Contreras A, Crins TT, Wang HC, Borst JG, Bergles DE (2010) Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat Neurosci* 13:1050-1052.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431-438.
- Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 441:824-831.
- Valera AM, Doussau F, Poulain B, Barbour B, Isope P (2012) Adaptation of granule cell to purkinje cell synapses to high-frequency transmission. *J Neurosci* 32:3267-3280.
- Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R (2010) alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 33:559-568.
- Vollrath MA, Kwan KY, Corey DP (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30:339-365.
- von Bekesy G (1956a) Simplified Model to Demonstrate the Energy Flow and Formation of Traveling Waves Similar to Those Found in the Cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42:930-944.
- Von Bekesy G (1956b) Current status of theories of hearing. *Science* 123:779-783.
- von Gersdorff H, Borst JG (2002) Short-term plasticity at the calyx of held. *Nat Rev Neurosci* 3:53-64.
- Waka N, Knipper M, Engel J (2003) Localization of the calcium channel subunits Cav1.2 (alpha1C) and Cav2.3 (alpha1E) in the mouse organ of Corti. *Histol Histopathol* 18:1115-1123.
- Walsh EJ, McGee J, McFadden SL, Liberman MC (1998) Long-term effects of sectioning the olivocochlear bundle in neonatal cats. *J Neurosci* 18:3859-3869.

- Warr WB, Guinan JJ, Jr. (1979) Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res* 173:152-155.
- Warr WB, Boche JB, Neely ST (1997) Efferent innervation of the inner hair cell region: origins and terminations of two lateral olivocochlear systems. *Hear Res* 108:89-111.
- Watt AJ, Cuntz H, Mori M, Nusser Z, Sjöström PJ, Häusser M (2009) Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat Neurosci* 12:463-473.
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E (2002) The $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res* 167:122-135.
- Weisz C, Glowatzki E, Fuchs P (2009) The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature* 461:1126-1129.
- Wiederhold ML, Kiang NY (1970) Effects of electric stimulation of the crossed olivocochlear bundle on single auditory-nerve fibers in the cat. *J Acoust Soc Am* 48:950-965.
- Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2004) Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 24:8818-8822.
- Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B (1999) Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19:726-736.
- Xu J, Wu LG (2005) The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron* 46:633-645.
- Yang SN, Berggren PO (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:621-676.
- Yavich L, Tanila H, Vepsäläinen S, Jakala P (2004) Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci* 24:11165-11170.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.