



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

La sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo postnatal: canales iónicos y plasticidad sináptica

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

Lic. Graciela Ines Kearney

Director de Tesis: Dra. Eleonora Katz

Director Asistente: Dra. Carolina Wedemeyer

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en:

Kearney G*, Zorrilla de San Martín J*, Vattino LG, Elgoyhen AB, Wedemeyer C, Katz E (2019) Developmental Synaptic Changes at the Transient Olivocochlear-Inner Hair Cell Synapse. *J Neurosci.* 39(18):3360-3375. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2746-18.2019.

* igual contribución.

Agradecimientos

Quiero agradecer a las autoridades del Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (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. Ana Belén Elgoyhen por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme crecer profesionalmente.

A Eleonora y Carolina por el compromiso y la dedicación con los que me guiaron en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando lo necesitaba.

A mi familia por apoyarme todo este tiempo.

Índice

Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
Resumen.....	6
Abstract.....	8
Lista de abreviaturas	10
1. Introducción	12
1.1. El sistema auditivo periférico de los mamíferos	13
1.2. El proceso de mecanotransducción auditiva.....	18
1.3. Inervación del órgano de Corti.....	20
1.3.1 Inervación aferente.....	20
1.3.2 Inervación eferente.....	21
1.3.3. La inervación eferente antes del comienzo de la audición	24
1.3.4. Actividad espontánea en las vías aferentes antes del comienzo de la audición	26
1.3.5. Rol de la sinapsis transitoria MOC-CCI.....	27
1.4. Transmisión sináptica.....	28
1.4.1. Generalidades	28
1.4.2. Naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor	29
1.4.3. Importancia del Ca ²⁺ en la transmisión sináptica	30
1.5. Canales iónicos que participan del proceso de transmisión sináptica	31
1.5.1. Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	31
1.5.2. Canales de K ⁺ dependientes de voltaje y de Ca ²⁺	34
1.6. Poblaciones de vesículas sinápticas	37
1.7. Plasticidad de corto término	38
1.8. La sinapsis MOC-CCI en el periodo previo al comienzo de la audición	39
2. Objetivos	41
2.1. Objetivo general	41
2.2. Objetivos particulares.....	41
3. Materiales y métodos	42
3.1. Disección del órgano de Corti	43
3.2. Soluciones	43
3.3. Registros electrofisiológicos en las células ciliadas	44

3.4.	Estimulación eléctrica de los axones eferentes MOC	45
3.5.	Estimulación eléctrica de las células ciliadas internas	46
3.6.	Liberación evocada por alto K^+	46
3.7.	Estimación del contenido cuántico.....	46
3.8.	Evaluación del efecto de drogas y toxinas sobre la liberación evocada del neurotransmisor.....	48
3.9.	Estimación de la plasticidad sináptica de corto término	48
3.10.	Estimación del tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas y de su tasa de reciclado	48
3.11.	Análisis de los datos.....	49
3.12.	Drogas y Toxinas	50
4.	Resultados: Primera parte.....	51
4.1.	En la sinapsis MOC-CCI la fuerza sináptica se incrementa durante el desarrollo postnatal.....	52
4.2.	Cambios en el patrón de STP de la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal.....	55
4.3.	El tamaño del <i>pool</i> de vesículas listas para ser liberadas y su tasa de reciclado se incrementan a lo largo del desarrollo postnatal.....	58
4.4.	Canales iónicos que intervienen en la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal.....	61
4.4.1.	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que participan en la liberación de ACh en distintos estadios del desarrollo postnatal.....	61
4.4.2.	El rol de los CCDVs de tipo L sobre la liberación del neurotransmisor cambia durante el desarrollo postnatal.....	64
4.4.3.	Los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI a lo largo de todo el desarrollo postnatal.....	67
4.4.4.	En estadios tempranos del desarrollo postnatal los CCDVs de tipo L presentan un rol dual en la liberación del neurotransmisor	68
4.4.5.	El acople funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK se mantiene a lo largo del desarrollo postnatal	71
4.4.6.	Efecto de las DHP sobre la liberación evocada por alto K^+ extracelular	72
5.	Discusión: Primera parte	74
5.1.	En la sinapsis MOC-CCI la fuerza sináptica se incrementa durante el desarrollo postnatal	75
5.2.	La plasticidad de corto término cambia de facilitación a depresión entre P4 y P9-11	76
5.3.	El tamaño del RRP y su tasa de reciclado se incrementan durante el desarrollo postnatal.....	79
5.4.	Canales iónicos que intervienen en la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal.....	80

5.4.1.	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje que participan en la liberación de ACh en distintos estadios del desarrollo postnatal.....	80
5.4.2.	El rol de los CCDVs de tipo L sobre la transmisión sináptica cambia durante el desarrollo postnatal	81
5.4.3.	Los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh desde P4 hasta P9-11.....	83
5.4.4.	Efecto de las DHPs sobre la liberación evocada por alto K ⁺ extracelular.....	85
5.5.	Significancia funcional de los cambios observados en la sinapsis transitoria MOC-CCI durante el desarrollo	86
6.	Resultados: Segunda parte	88
6.1.	La sinapsis MOC-CCI de ratones P9-11 que no expresan canales BK presenta una fuerza sináptica normal	89
6.2.	El patrón de STP se encuentra conservado en la sinapsis MOC-CCI de ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	92
6.3.	El rol de los CCDVs de tipo L en la transmisión sináptica se encuentra alterado en las sinapsis MOC-CCI de los ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	93
6.4.	La maduración de las propiedades eléctricas de las CCIs no está alterada en ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	96
6.5.	La pérdida de sinapsis MOC-CCI funcionales luego del comienzo de la audición es normal en ratones con una ablación genética de los canales BK	97
6.6.	La modulación positiva sobre la liberación de ACh ejercida por los receptores mGluR1 no estaría mediada por la inhibición de los canales BK	99
7.	Discusión: Segunda parte	101
7.1.	La fuerza de la sinapsis MOC-CCI no está alterada en los ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	103
7.2.	El patrón de STP es normal en ratones con una ablación genética de los canales BK	104
7.3.	Los CCDVs de tipo L median la liberación de ACh en los ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	105
7.4.	La maduración de las propiedades eléctricas de las CCIs no está alterada en los ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	106
7.5.	La pérdida de las conexiones eferentes sobre las CCIs luego del comienzo de la audición no está alterada en los ratones <i>Slo</i> ^{-/-}	108
7.6.	La modulación positiva de los mGluR1 sobre la liberación de ACh por los terminales MOC no estaría mediada por la inhibición de los canales BK	108
8.	Conclusiones	110
9.	Bibliografía	112

Resumen

Título: "La sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo postnatal: canales iónicos y plasticidad sináptica"

En el periodo previo al comienzo de la audición, alrededor del día postnatal (P) 12, las células ciliadas internas (CCIs) disparan espontáneamente potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} , promoviendo la liberación de glutamato en la primera sinapsis del sistema auditivo. Esta actividad contribuiría a establecer y refinar las conexiones sinápticas en la vía auditiva. Durante este periodo, las CCIs son inervadas transitoriamente por fibras del sistema olivococlear medial (MOC). Esta inervación es colinérgica e inhibitoria, y actúa sobre las CCIs disminuyendo la frecuencia de disparo de potenciales de acción. La naturaleza transitoria de la sinapsis MOC-CCI sugiere que podría haber cambios en las propiedades de la transmisión sináptica y en las moléculas involucradas en este proceso. En un trabajo previo, se observó que en P9-11 la liberación de acetilcolina (ACh) es mediada por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDVs) de tipo P/Q y N, mientras que los CCDVs de tipo L modulan negativamente la liberación mediante la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y de voltaje de tipo BK. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indicaban que en P6-7 la liberación estaría mediada parcialmente por los CCDVs de tipo P/Q, mientras que los CCDVs de tipo N no estarían involucrados. El principal objetivo de esta tesis fue caracterizar las propiedades de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI del ratón en distintos estadios del desarrollo. Además fue de interés estudiar las propiedades de la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI en ratones con una ablación genética de los canales BK (ratones *Slo*^{-/-}) en el estadio P9-11. Para abordar estos objetivos se realizaron registros electrofisiológicos en el modo "whole-cell" en las CCIs presentes en preparaciones de cóclea aisladas de forma aguda, mientras se evocaba la liberación de ACh de los terminales MOC eléctricamente o mediante una solución extracelular con alto contenido de K^+ , en ratones Balb/C en edades P4, P6-7 y P9-11 y en ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-} en P9-11. Los resultados de este trabajo muestran que la fuerza sináptica aumenta significativamente entre los estadios P4 y P9-11. Este fenómeno está acompañado por cambios en el patrón de plasticidad de corto término (STP), en la cantidad de vesículas sinápticas disponibles para ser liberadas o RRP (por sus siglas en inglés) y en su tasa de reciclado, y en los tipos de CCDVs que median y/o modulan la liberación de ACh. En resumen, se han encontrado cambios significativos en las propiedades de la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal, lo cuál podría ser consecuencia del cambio de identidad y localización de los CCDVs que participan en este

proceso. En la sinapsis MOC-CCI de ratones *Slo*^{-/-} en el estadio P9-11, no se observaron diferencias en la fuerza sináptica, en el patrón de STP, ni en la modulación de la liberación de ACh por los receptores mGluR1. Tampoco se detectaron alteraciones en la maduración eléctrica de las CCIs, ni en la pérdida de las conexiones MOC-CCI que normalmente ocurre luego del comienzo de la audición. Estos resultados sugieren que la carencia de canales BK en los terminales eferentes podría estar compensada por un aumento en la expresión de otros canales de K⁺ presentes en los terminales sinápticos MOC y/o por mecanismos regulatorios que eviten que estos procesos se vean afectados.

Palabras clave: células ciliadas internas, inervación eferente olivococlear, plasticidad de corto término, canales de calcio dependientes de voltaje, canales BK.

Abstract

Title: *"The olivocochlear efferent synapse during postnatal development: ionic channels and synaptic plasticity"*

Before the onset of hearing, around postnatal day (P) 12, inner hair cells (IHCs) fire calcium action potentials, promoting the release of glutamate at the first auditory synapse. This activity would contribute to establish and refine synaptic connections in the auditory pathway. During this period, IHCs are transiently innervated by fibers from the medial olivocochlear system (MOC). This innervation is cholinergic and inhibitory, and modulates the spiking frequency of IHCs. The transient nature of the MOC-IHC synapse suggests that there must be changes in the properties of synaptic transmission and in the molecules involved in this process. It has been previously shown that at P9-11 acetylcholine (ACh) release is supported by P/Q- and N-type voltage dependent calcium channels (VGCCs), whereas L-type VGCCs exert a negative modulation on transmitter release by activating voltage and Ca^{2+} dependent K^+ channels (BK channels). Preliminary results from our lab indicated that at P6-7 ACh release would be partially supported by P/Q-type VGCCs, whereas N-type VGCCs would not participate in this process. The main goal of this thesis work was to characterize the properties of transmitter release at the mouse MOC-IHC synapse during different stages of postnatal development before hearing onset. In addition, it was of interest to study the properties of transmitter release in mice with a genetic ablation of the BK channels (*Slo*^{-/-} mice). To address these objectives, electrophysiological recordings in the whole-cell mode were performed in IHCs present in acutely isolated cochlear preparations, while ACh release from MOC efferent terminals was evoked electrically or by a high K^+ extracellular solution, in P4, P6-7 and P9-11 Balb/C mice, or in P9-11 *Slo*^{+/+} and *Slo*^{-/-} mice. The results of this work show that synaptic strength at the MOC-IHC synapse significantly increases from P4 to P9-11. This is accompanied by changes in the pattern of short term synaptic plasticity (STP), in the pool of synaptic vesicles ready to be released (RRP) and in its replenishment rate, and in the types of VGCCs that support and/or modulate ACh release. In summary, dramatic changes were found in the properties of synaptic transmission at the MOC-IHC synapse during postnatal development, which could be accounted for by the observed changes in VGCC identity and localization. At MOC-IHC synapses from P9-11 *Slo* mice, no differences were observed between genotypes either in the strength of synaptic transmission, in the STP pattern or in the modulation of ACh release exerted by mGluR1 receptors. No alterations were detected either in the electric maturation of the IHCs or in the loss of efferent MOC-IHC synaptic contacts that normally occurs after hearing onset. These results suggest that the lack of BK channels at efferent terminals might be compensated

for by an increase in the expression of other K^+ channels present at the MOC synaptic terminals and/or other regulatory mechanisms that prevent these processes from being altered.

Key words: inner hair cells, olivocochlear innervation, short term plasticity, voltage gated calcium channels, BK channels.

Lista de abreviaturas

- A: amplitud promedio de las respuestas exitosas
nA - pA: nanoamperios (10^{-9}), picoamperios (10^{-12})
ACh: acetilcolina
ADN: ácido desoxirribonucleico
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BAPTA: ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N', -tetraacético
BK: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia grande
CCDV: canal de calcio dependiente de voltaje
CCE: célula ciliada externa
CCI: célula ciliada interna
CGRP: péptido relacionado al gen de la calcitonina
 C_m : capacitancia de la membrana
DHP: Dihidropiridina
DHPG: (S)-3,5-Dihroxifenilglicina
DMSO: dimetilsulfóxido
 E_{rev} : potencial de reversión
EGTA: ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético
EPP: potencial de placa
GABA: ácido γ -aminobutírico
HVA: canales de Ca^{2+} con voltaje de activación alto
I: corriente
IbTx: iberiotoxina
IPSCs: corrientes sinápticas inhibitorias (prefijo e: evocadas; s: espontáneas)
I-V: corriente en función del potencial
Hz: hertz
KCl: cloruro de potasio
 K_D : constante de disociación
KO: 'knockout' mutante nulo
LOC: lateral olivococlear
LVA: canales de Ca^{2+} con voltaje de activación bajo
 m : contenido cuántico
MEPP: potencial de placa miniatura
MET: mecanotransductor

MNTB: núcleo medial del cuerpo trapezoidal

MOC: medial olivococlear

NGE: neurona del ganglio espiral

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

Ω : ohm

$P_{\text{éxito}}$: probabilidad de que un estímulo evoque exitosamente una respuesta sináptica

$P_{\text{vesicular}}$: probabilidad de liberación de una vesícula sináptica

RBP: proteína de unión a RIM

RCK: dominio de regulación de la conductancia de K^+

RRP: *pool* de vesículas listas para ser liberadas

S: respuesta sináptica total (con fallas de liberación incluidas)

S.E.M.: error estándar de la media

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña

SNC: sistema nervioso central

STP: plasticidad sináptica de corto término

TEA: tetraetilamonio

TTX: tetrodotoxina

V: voltaje

V_m : potencial de membrana

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

1. Introducción

1.1. El sistema auditivo periférico de los mamíferos

El sistema auditivo periférico tiene como función la captación del sonido y la conversión de la energía mecánica de las ondas sonoras en señales eléctricas que puedan ser conducidas al sistema nervioso central (SNC). En los mamíferos, la periferia auditiva puede dividirse anatómica y funcionalmente en 3 partes: el oído externo, que comprende al pabellón auditivo, la concha y el conducto auditivo externo; el oído medio, que consta de la membrana timpánica o tímpano, una cadena de huesecillos u osículos y los músculos del oído medio (los músculos tensor del tímpano y estapedio); y el oído interno, conformado por la cóclea (Figura 1).

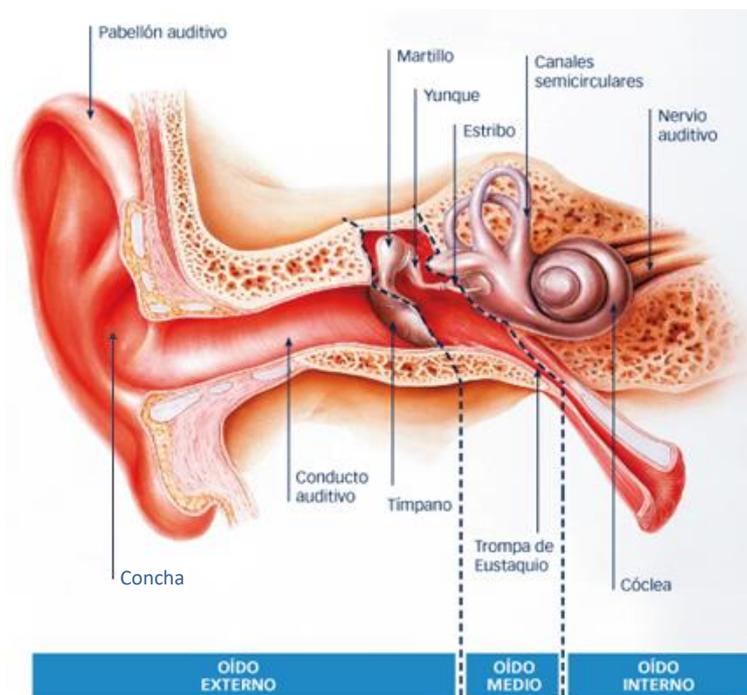


Figura 1. Estructura anatómica del oído. El oído puede dividirse estructural y funcionalmente en oído externo, medio e interno. El oído externo comprende al pabellón auditivo, la concha y el conducto auditivo externo; el oído medio incluye la membrana timpánica o tímpano, una cadena de huesecillos y los músculos del oído medio; por último, el oído interno consiste en la cóclea o caracol. Esquema adaptado de la página web: www.audiopacks.es

La transmisión de las señales auditivas hacia el SNC comienza con la captación de las ondas sonoras por parte del pabellón auditivo, el cual las conduce hacia el conducto auditivo externo, y de allí viajan hasta el tímpano. El oído externo presenta resonancia y genera la amplificación de ciertas frecuencias, alrededor de 4 kHz en humanos, lo cual tiene como consecuencia una mayor sensibilidad para dicho rango de frecuencias.

Las ondas sonoras son oscilaciones en la presión del aire que al alcanzar la membrana timpánica hacen que ésta vibre. Esta vibración se transmite a través de la cadena de huesecillos hasta la base del estribo, que se encuentra apoyada sobre una segunda membrana presente en la ventana oval de la cóclea. La cóclea es una estructura ósea llena de fluido, por lo cual el sonido debe propagarse a un medio con una impedancia acústica mucho mayor que el aire. La cadena de osículos funciona como un adaptador de impedancias y permite superar este problema de dos maneras. En primer lugar, el área de la membrana timpánica es aproximadamente 25 veces mayor que el área de la base del estribo, por lo que la presión ejercida sobre la ventana oval se incrementa 25 veces. En segundo lugar, la cadena de huesecillos funciona como una palanca, con el eje cerca de la articulación martillo yunque y con una relación entre las longitudes de los brazos de 1.3 veces. Entre ambos mecanismos se genera una ganancia acústica de alrededor de 30.

La cóclea consiste en un tubo enrollado en forma de caracol dividido en tres compartimientos paralelos: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica (Figura 2b y c). La escala timpánica y la vestibular se conectan en el extremo apical de la cóclea y se encuentran llenas 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 y baja en sodio y calcio llamada endolinfa (Anniko y Wróblewski, 1986). La diferente composición de la endolinfa genera una diferencia de potencial con respecto a la perilinfa de alrededor de +80 mV (von Békésy, 1952). A esta diferencia de potencial se la denomina potencial endococlear. La escala timpánica y la escala media se encuentran separadas por la membrana basilar, sobre la cual está emplazado el órgano de Corti (Figura 2c y d).

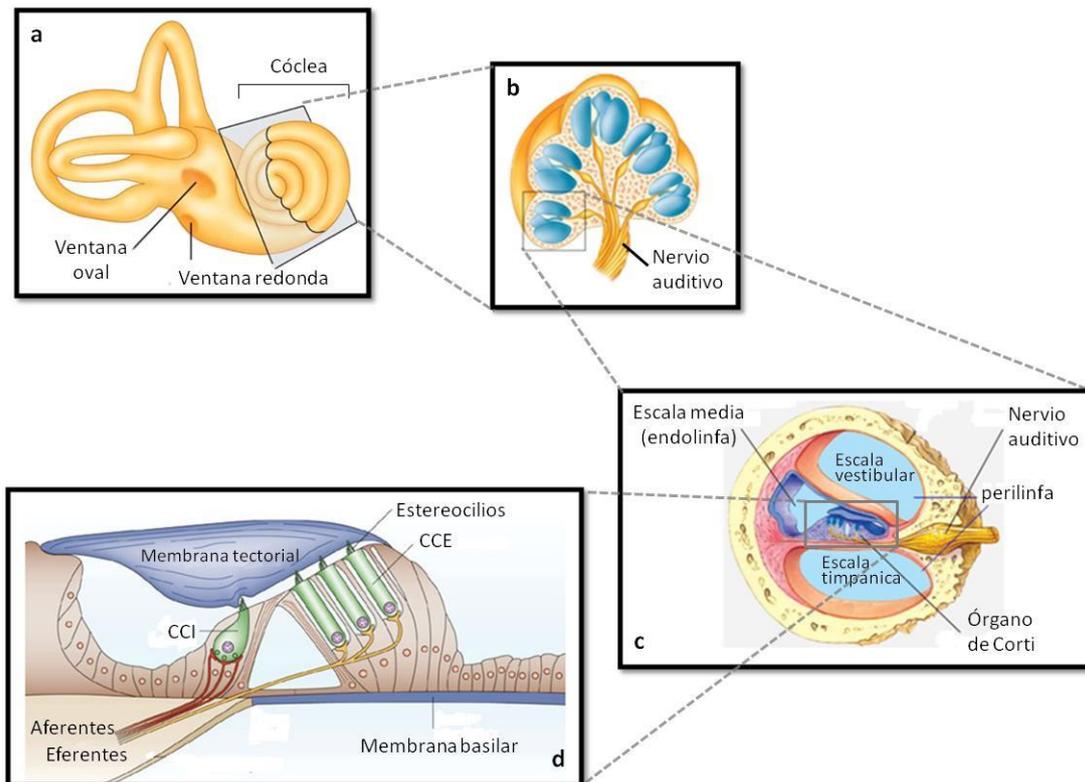


Figura 2. Estructura de la cóclea. La cóclea consiste en un tubo óseo enrollado en forma de caracol (a), que está dividido en 3 compartimentos paralelos llenos de fluido: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica (b y c). La escala timpánica y la vestibular contienen una solución de composición similar al medio extracelular denominada perilinfa. En cambio, la escala media presenta en su interior una solución semejante al medio intracelular, denominada endolinfa. La escala timpánica y la escala media se encuentran separadas por la membrana basilar, sobre la cual se encuentra el órgano de Corti (d). Figuras a, b y c adaptadas de la página web: droualb.faculty.mjc.edu. Figura d modificada de Fettiplace & Hackney (2006).

El órgano de Corti, el epitelio sensorial auditivo de los mamíferos, presenta células mecanosensoriales especializadas llamadas células ciliadas (Figura 2d). Las células ciliadas poseen en su región apical uniones estrechas con las células de soporte que las rodean formando una barrera que impide el intercambio de fluidos, de tal manera que la zona apical está embebida en endolinfa, mientras que la parte basal se encuentra bañada con perilinfa. La región apical de las células ciliadas presenta tres filas paralelas de microvellosidades modificadas llamadas estereocilios, los cuales aumentan de altura hacia la periferia de la espiral coclear. Los estereocilios de las distintas filas están unidos entre sí por varias estructuras proteicas, la más apical de las cuales se conoce como *tip link* (Furness y Hackney, 1985) (Figura 5, paneles superiores). Apoyada sobre los estereocilios se encuentra una membrana acelular llamada membrana tectorial (Figura 2d).

Cuando la base del estribo se mueve sobre la ventana oval, genera una onda de presión que provoca el desplazamiento de la membrana basilar y se propaga a lo largo de la misma. Debido a que la membrana basilar es más angosta y más rígida cerca de la base, y se vuelve más ancha y flexible hacia el ápex, la onda a medida que avanza va incrementando su amplitud y disminuyendo su velocidad. Al alcanzar un sitio específico dependiente de la frecuencia, la energía de la onda es disipada por la membrana, disminuyendo rápidamente su amplitud. De esta manera, la onda de presión producirá una deformación máxima en la membrana basilar en una zona concreta en función de la frecuencia del sonido. Las frecuencias altas quedan codificadas en la base de la membrana y las frecuencias bajas en su parte apical. Este fenómeno se conoce como tonotopía coclear (Figura 3).

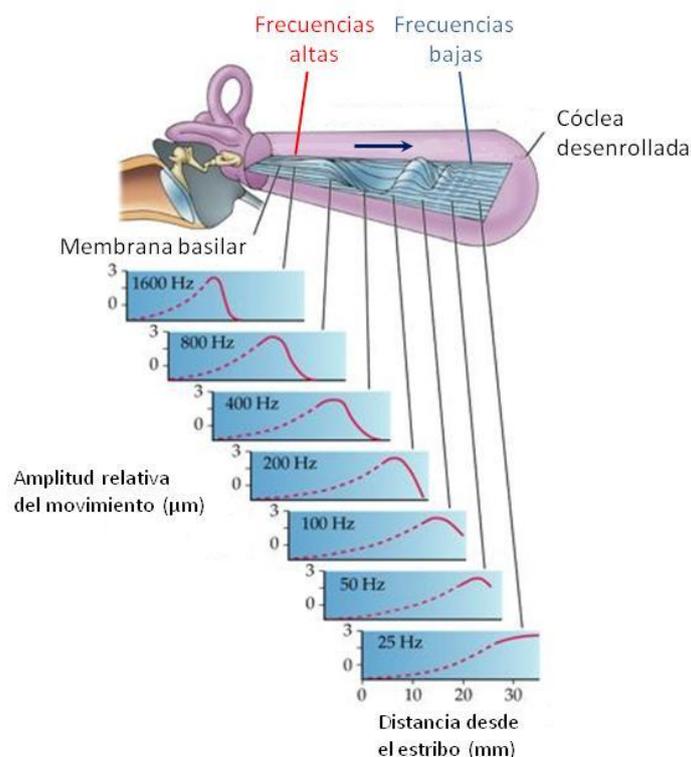


Figura 3. Tonotopía coclear. El esquema presenta una cóclea desenrollada en la que se muestra la amplitud de los movimientos de la membrana basilar en función de la frecuencia del sonido. Esquema adaptado de la página web: www.cns.nyu.edu.

En los mamíferos existen dos tipos de células mecanosensoriales: las células ciliadas internas (CCIs) y las células ciliadas externas (CCEs) (Figura 4). Las CCIs son los fonorreceptores propiamente dichos. Las CCEs participan en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina de la membrana basilar. El grado de discriminación de las frecuencias no puede explicarse considerando únicamente el desplazamiento de la membrana basilar por las ondas de presión (de Boer, 1983). Las CCEs son capaces de variar su longitud en

función de su potencial de membrana, al despolarizarse se contraen y al hiperpolarizarse incrementan su tamaño. Esta propiedad se conoce como electromotilidad (Brownell et al., 1985; Kachar et al., 1986). Al variar su longitud con el movimiento de la membrana basilar, estas células producen una amplificación espacialmente más acotada de este desplazamiento. La magnitud de la amplificación presenta una relación no lineal con la intensidad del estímulo, de forma tal que los sonidos de baja intensidad son amplificados en mayor medida que los de alta intensidad. Gracias a este mecanismo activo se logra un aumento en la sensibilidad y la selectividad de frecuencias del sistema auditivo, por lo que se considera que las CCEs constituyen el amplificador coclear (Robles y Ruggero, 2001; Ashmore, 2008).

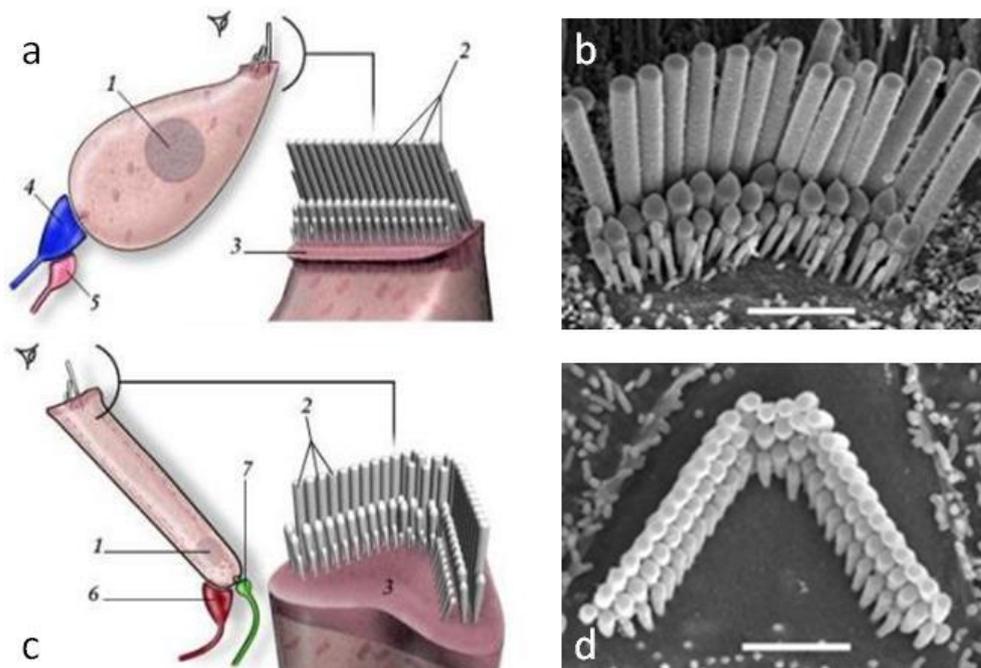


Figura 4. Estructura de las células ciliadas. En los mamíferos existen 2 tipos de células ciliadas, las células ciliadas internas (CCIs) (a) y las externas (CCEs) (c), las cuales difieren en la forma de su cuerpo celular (en pera para la CCI y cilíndrico para la CCE) y por el ordenamiento de los estereocilios (en línea o empalizada para la CCI y en W para la CCE). Las células ciliadas también se diferencian en su tipo de inervación aferente y eferente (ver sección 1.3.). Referencias: 1: núcleo, 2: estereocilios, 3: placa cuticular, 4: nervio auditivo (neurona del ganglio espiral de tipo I), 5: fibra eferente lateral, 6: fibra eferente medial, 7: nervio auditivo (neurona del ganglio espiral de tipo II). En (b) y (d) se muestran micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión en las que se distingue la forma característica de los estereocilios de las CCIs y de las CCEs, respectivamente. Escala: (b) 2,6 µm; (d) 2,0 µm. (a) y (c) adaptadas de la página web www.cochlea.eu/es/; (b) y (d) adaptadas de la página web neuro.wisc.edu.

1.2. El proceso de mecanotransducción auditiva

La mecanotransducción, es decir, la conversión de las ondas sonoras en señales eléctricas, ocurre a nivel de las células ciliadas. El desplazamiento de la membrana basilar en respuesta al sonido provoca la deflexión de los estereocilios de las células ciliadas contra la membrana tectorial. La deflexión hacia los estereocilios de mayor tamaño aumenta la probabilidad de apertura de los canales mecanotransductores (MET) provocando la despolarización de las células ciliadas y la liberación de glutamato en la sinapsis aferente, mientras que la deflexión hacia los estereocilios más pequeños disminuye la probabilidad de apertura de estos canales, hiperpolarizando a las células y reduciendo la liberación de glutamato (Figura 5) (Shotwell et al., 1981; Cochran, 1995; Glowatzki y Fuchs, 2002). Los canales MET se encuentran en el ápice de los estereocilios a excepción de la fila de mayor tamaño (Beurg et al., 2009), y son permeables a todos los cationes pequeños (Corey y Hudspeth, 1979; Ricci y Fettiplace, 1998), en particular, presentan una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Beurg et al., 2006). Debido a la composición de la endolinfa, la corriente MET consta principalmente de una corriente entrante de K^+ (Corey y Hudspeth, 1979). La identidad de estos canales ha sido largamente debatida, sin embargo, existen fuertes evidencias de que el poro estaría constituido por un dímero de TMC1 (Corey y Holt, 2016; Pan et al., 2018). El modelo de mecanotransducción prevalente sostiene que el desplazamiento lateral de los estereocilios en sentido excitatorio tensa a un elemento elástico, el cuál transmite la fuerza mecánica a los canales MET provocando su apertura (Howard y Hudspeth, 1988). El elemento elástico correspondería a los *tip links*, en este sentido, se ha observado que su destrucción elimina completamente la mecanotransducción (Assad et al., 1991; Furness et al., 2008).

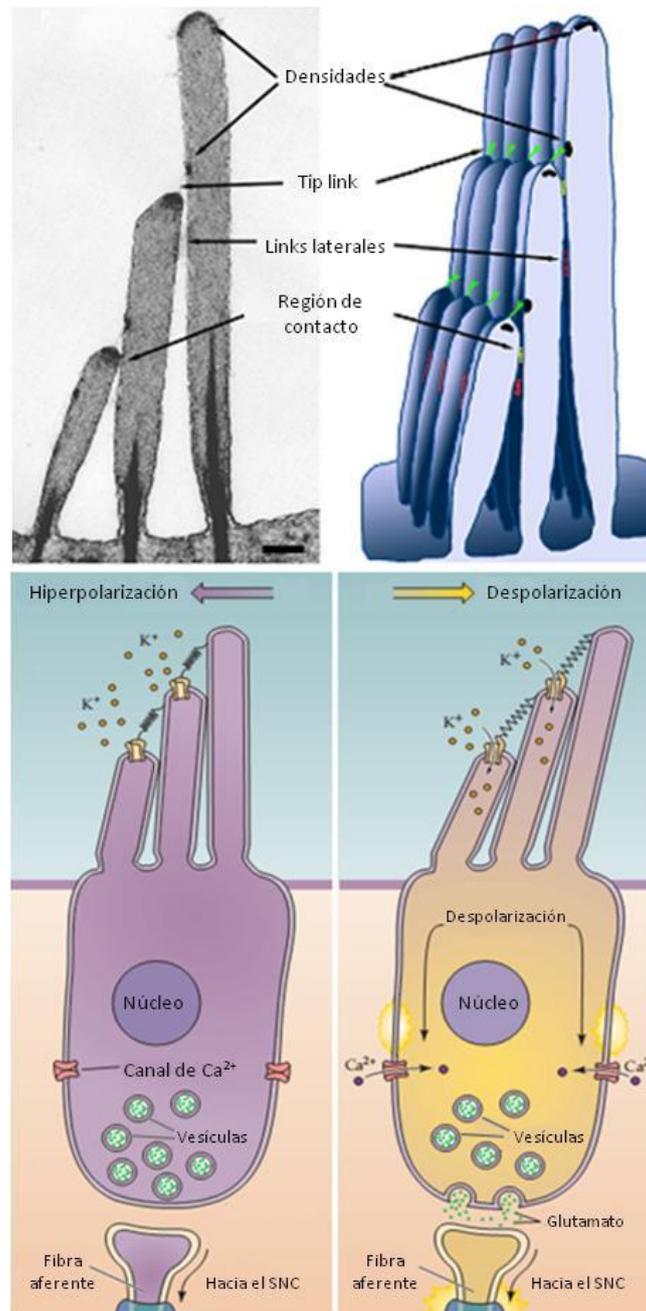


Figura 5. La mecanotransducción. Paneles superiores: micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión (izquierda) e ilustración representativa (derecha) de las tres filas de estereocilios de una CCI de conejillo de Indias, en las que se distinguen los distintos complejos proteicos que los conectan entre sí, de los cuales el más apical se conoce como *tip link*. Escala: 250 nm. Adaptado de Hackney y Furness (2013). Paneles inferiores: esquemas ilustrando el proceso de la mecanotransducción llevado a cabo en las células ciliadas. Esquema modificado de Purves (2004).

1.3. Inervación del órgano de Corti

1.3.1. Inervación aferente

Las células ciliadas reciben inervación aferente por parte de las neuronas del ganglio espiral (NGEs), cuyos somas se encuentran en el modiollo central de la cóclea. Las NGE son neuronas bipolares cuyas dendritas periféricas establecen contacto con las células ciliadas, mientras que los axones centrales proyectan hacia el núcleo coclear en el tallo encefálico, conformando el nervio coclear. Existen dos tipos de NGEs, las NGEs de tipo I cuyas fibras son mielinizadas, representan el 90-95% de la población total de NGEs e inervan a las CCIs, y las NGEs de tipo II que presentan fibras no mielinizadas, constituyen el 5-10% restante de las NGE, y establecen contactos sinápticos con las CCEs (Spoendlin, 1975, 1979; Kiang et al., 1982).

La sinapsis aferente en las CCIs es la encargada de transmitir la información auditiva hacia el SNC. Las NGEs de tipo I extienden radialmente una única dendrita que contacta a una única CCI (Lieberman, 1980; Lieberman et al., 1990). Por otra parte, cada CCI presenta entre 6 y 30 sinapsis aferentes, dependiendo de la especie y de la posición tonotópica a lo largo de la cóclea, generalmente con un máximo en la región de mayor sensibilidad auditiva para una dada especie (Francis et al., 2006; Meyer et al., 2009; Meyer y Moser, 2010). La sinapsis aferente es glutamatérgica y se encuentra mediada por canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L, en particular los $\text{Ca}_v1.3$ (Glowatzki y Fuchs, 2002; Brandt et al., 2003). El glutamato liberado produce la activación de receptores AMPA postsinápticos, sin la participación de receptores NMDA (Glowatzki y Fuchs, 2002). La liberación del neurotransmisor se produce en respuesta a potenciales graduados, no debido a potenciales de acción, de forma semejante a lo que ocurre en los fotorreceptores, células bipolares de la retina y en las células ciliadas vestibulares y de la línea lateral en peces (Matthews y Fuchs, 2010). En estos sistemas sensoriales, las células receptoras son capaces de cubrir rangos dinámicos amplios y de mantener la liberación del neurotransmisor en el tiempo. Para lidiar con estas demandas, estas sinapsis cuentan con una estructura especializada en la zona activa denominada cinta sináptica, por lo cual son llamadas sinapsis en cinta. La cinta sináptica consiste en un cuerpo electrodenso al cual se asocian vesículas sinápticas mediante uniones filamentosas (Smith y Sjöstrand, 1961; Moser et al., 2006). Se postula que al concentrar vesículas sinápticas en la zona activa, la cinta sináptica incrementaría la tasa de abastecimiento de estas vesículas, permitiendo la liberación sostenida en el tiempo (Matthews y Fuchs, 2010). Además, también podrían actuar como una barrera de difusión al Ca^{2+} que ingresa a la CCI a través de canales dependientes de voltaje, generando una

alta concentración de Ca^{2+} en la zona activa que permitiría una liberación multivesicular (Graydon et al., 2011).

Mucho menos se conoce sobre las fibras aferentes de tipo II. Las NGEs de tipo II envían una dendrita a la región de las CCEs, donde se extiende en la zona basal de las células estableciendo conexiones *en passant* con numerosas CCEs (Perkins y Morest, 1975; Weisz et al., 2012). Al igual que las fibras aferentes de tipo I, esta sinapsis también es glutamatérgica y cuenta con una cinta sináptica, aunque con una forma algo diferente (Weisz et al., 2012). Se ha detectado expresión de las subunidades GluK2 y GluK5 de los receptores kainato en las fibras de tipo II (Fujikawa et al., 2014). Sin embargo, un estudio reciente indica que la transmisión sináptica estaría mediada por receptores AMPA (Martinez-Monedero et al., 2016). En cuanto a la función de esta sinapsis, es improbable que codifiquen información acústica, dado que el nivel de actividad es muy bajo e insuficiente para lograr que una NGE dispare potenciales de acción (Weisz et al., 2009). Existen evidencias de que las NGEs de tipo II podrían codificar la nocicepción auditiva ante el daño a las células ciliadas (Flores et al., 2015; Liu et al., 2015).

1.3.2. Inervación eferente

Además de los contactos aferentes, las células ciliadas presentan una inervación eferente proveniente del complejo olivar superior en el tallo encefálico que regula la ganancia coclear. Las fibras eferentes olivococleares se clasifican en medial y lateral en base a la ubicación de los somas neuronales que les dan origen (Warr, 1975; Warr y Guinan, 1979). En los mamíferos adultos, las neuronas del sistema olivococlear medial (MOC), cuyos somas se encuentran en la región periolivar medial, proyectan principalmente a la cóclea contralateral donde establecen sinapsis axosomáticas con las CCEs. Las fibras eferentes del sistema olivococlear lateral (LOC) se originan en la oliva lateral superior y proyectan principalmente a la cóclea ipsilateral donde contactan a las dendritas de las NGEs de tipo I en la región por debajo de las CCIs. A pesar de que las neuronas MOC inervan exclusivamente a las CCEs (Brown, 1987), en roedores altricios existe una inervación transitoria a las CCIs durante el periodo postnatal previo al comienzo de la audición. Tanto las fibras eferentes MOC como las LOC son principalmente colinérgicas, aunque también expresan otros neurotransmisores y neuromoduladores como el ácido γ -aminobutírico (GABA), el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y péptidos opioides (Schrott-Fischer et al., 2007; revisado en Sewell, 2011). Además, existen evidencias de que un subgrupo de neuronas LOC es dopaminérgico (Darrow et al., 2006).

La función principal de las fibras eferentes MOC es disminuir la ganancia del amplificador coclear. Se ha observado que la estimulación eléctrica de los axones MOC en el piso del cuarto

ventrículo reduce la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio auditivo ante la estimulación auditiva con un click (Galambos, 1956), y que la magnitud de esta inhibición se incrementa con la frecuencia de estimulación (Gifford y Guinan, 1987; Rajan y Johnstone, 1988). Además, se ha demostrado que la inhibición eferente es mayor en la frecuencia característica de una fibra aferente y menos intensa en frecuencias alejadas de este punto, causando una disminución en la selectividad de frecuencias (Guinan y Gifford, 1988a). El fenómeno que subyace a todas estas observaciones es la inhibición de las CCEs por parte de las fibras MOC. La hiperpolarización de las CCEs reduce su electromotilidad, por lo que el desplazamiento localizado de la membrana basilar se reduce (Russell y Murugasu, 1997), provocando una menor respuesta por parte de las CCI y una disminución de la sintonización fina.

Mientras que los experimentos anteriores fueron llevados a cabo en un ambiente silencioso, también se han realizado estudios con ruido de fondo. En estas condiciones, se ha observado que las fibras aferentes auditivas muestran una tasa de disparo reducida como resultado de la adaptación al ruido. La estimulación del haz olivococlear reduce la tasa de disparo ante un ruido continuo de baja intensidad, lo que permite el incremento de la tasa de disparo ante un tono transitorio de mayor intensidad. Este efecto se conoce como "desenmascaramiento" y da lugar a una mejor discriminación a pequeñas variaciones en la intensidad de un tono (Wiederhold y Kiang, 1970; Winslow y Sachs, 1987; Guinan y Gifford, 1988b; Kawase y Liberman, 1993). Fisiológicamente, la activación de las neuronas MOC está dada por el sonido, a través de las neuronas del núcleo coclear posteroventral (Brown et al., 2003), y es modulada por proyecciones directas desde distintos niveles de la vía auditiva, como el colículo inferior y la corteza cerebral auditiva (Schofield, 2011; Saldaña, 2015; Terreros y Delano, 2015). La estimulación de las fibras eferentes MOC mediante estas vías estaría involucrada a nivel perceptual en mejorar la detección y discriminación de sonidos en ambientes ruidosos (May y McQuone, 1995; Hienz et al., 1998; May et al., 2004) y en la atención selectiva (Oatman y Anderson, 1977; Delano et al., 2007). Además, se ha propuesto que su actividad tendría un efecto protector contra el daño acústico inducido por ruido (Rajan y Johnstone, 1988; Rajan, 2001; Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018) y la pérdida de la audición asociada con la edad (Parthasarathy, 2001; Kim et al., 2002; Liberman et al., 2014). Sin embargo, estos efectos aún son controversiales (revisado en Fuchs y Lauer, 2018; Lopez-Poveda, 2018).

La inhibición provocada por el sistema eferente MOC sobre las CCI neonatales y las CCEs está determinada por la acción de la ACh sobre receptores nicotínicos (nAChR) $\alpha 9\alpha 10$ presentes en la postsinapsis (Elgoyhen et al., 1994, 2001). El nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es un canal catiónico con una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Weisstaub et al., 2002; Gómez-Casati et al., 2005). El influjo de Ca^{2+}

activa canales de potasio dependientes de Ca^{2+} de tipo SK2 (Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver et al., 2000; Katz et al., 2004; Gómez-Casati et al., 2005; Roux et al., 2011), aunque en la sinapsis MOC-CCE en la región basal de la cóclea se ha observado además la activación de canales de potasio del tipo BK (Wersinger et al., 2010; Rohmann et al., 2015). Este acoplamiento da lugar a una corriente bifásica compuesta por una corriente entrante de Ca^{2+} rápida seguida por una corriente lenta de K^+ que hiperpolariza a las células ciliadas (Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver et al., 2000; Ballesteros et al., 2011). El tiempo de decaimiento de esta corriente está determinado por la cinética de cierre de los canales SK2 (Oliver et al., 2000). Por otra parte, aún no está claro si solo el influjo de Ca^{2+} a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ activa a los canales SK2 o si también contribuye la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. Las células ciliadas presentan una cisterna subsináptica adyacente a la membrana plasmática a una distancia de unos 14 nm, y que es coextensiva con las sinapsis eferentes (Fuchs et al., 2014). Se ha sugerido que la cisterna subsináptica podría actuar como un reservorio de Ca^{2+} que aporta este ion ante la activación del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ por un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Evans et al., 2000; Lioudyno et al., 2004). Otros estudios indican que actuaría como un sumidero de Ca^{2+} , evitando la propagación de las señales de Ca^{2+} en el citoplasma (Fuchs et al., 2014; Moglie et al., 2018). En realidad, la cisterna podría actuar tanto como fuente como sumidero de Ca^{2+} en función del nivel de actividad (Fuchs et al., 2014).

En cuanto a la inervación eferente LOC, su función es poco conocida, en gran medida debido a que está constituida por fibras no mielinizadas difíciles de estimular eléctricamente. El principal neurotransmisor de las fibras LOC es la ACh (Eybalin, 1993; Sewell, 2011), la cual provocaría un aumento en la actividad de las NGEs a través de receptores muscarínicos presentes en las dendritas aferentes (Maison et al., 2010). Otros neurotransmisores expresados por el sistema eferente lateral son dopamina y GABA (Eybalin, 1993; Sewell, 2011). Los efectos de la dopamina sobre la actividad de las vías aferentes son controversiales (Ruel et al., 2001; Garrett et al., 2011; Le Prell et al., 2014), lo que podría deberse a la expresión de distintos tipos de receptores dopaminérgicos acoplados a vías de señalización antagónicas en subpoblaciones de dendritas aferentes (Maison et al., 2012). La liberación de GABA por los terminales LOC disminuye la excitabilidad aferente (Felix y Ehrenberger, 1992; Arnold et al., 1998), efecto que estaría mediado por receptores GABA_A (Malgrange et al., 1997; Yamamoto et al., 2002; Nakagawa et al., 2005). En resumen, la activación de las fibras eferentes LOC puede causar efectos opuestos en la actividad de las fibras aferentes. En cuanto a su función a nivel sistémico, se ha propuesto que reducirían el trauma acústico inducido por ruido mediante una disminución de los efectos excitotóxicos del glutamato (Ruel et al., 2001). Además, podrían participar de la discriminación auditiva en ambientes ruidosos (Nouvian et al., 2015).

1.3.3. La inervación eferente antes del comienzo de la audición

En el ratón, las fibras eferentes olivococleares alcanzan al primordio epitelial coclear en el día embrionario (E) 12 (Fritzsich y Nichols, 1993) y se encuentran en la región debajo de las células ciliadas antes del nacimiento (Sobkowicz y Emmerling, 1989). En los primeros días luego del nacimiento (P0-3), pueden observarse fibras eferentes contactando directamente a las CCI y sobre las dendritas de las NGEs de tipo I, mientras que las CCEs carecen de inervación eferente (Figura 6) (Shnerson et al., 1982). Inicialmente se asumió que la totalidad de estas conexiones eferentes tempranas formaban parte del sistema LOC, como en el adulto (Shnerson et al., 1982; Shnerson y Pujol, 1982; Gil-Loyzaga y Pujol, 1988; Emmerling et al., 1990). Sin embargo, estudios posteriores en ratas y hámsters neonatales mostraron que el marcado anterógrado de las proyecciones olivococleares cruzadas, correspondientes a las fibras MOC, resulta en el marcado de terminales eferentes sobre las CCI, por lo que los contactos axosomáticos sobre estas células corresponderían al sistema MOC (Cole y Robertson, 1992; Simmons et al., 1996). A partir de P5 los eferentes MOC inervan simultáneamente a las CCI y a las CCEs, luego la proporción de terminales que contactan a las CCEs se incrementa progresivamente, mientras que las terminales que contactan a las CCI disminuyen hasta desaparecer poco después del comienzo de la audición, alrededor de P12 en roedores altrícios. En animales adultos, las fibras MOC inervan exclusivamente a las CCEs (Figura 6) (Simmons et al., 1996).

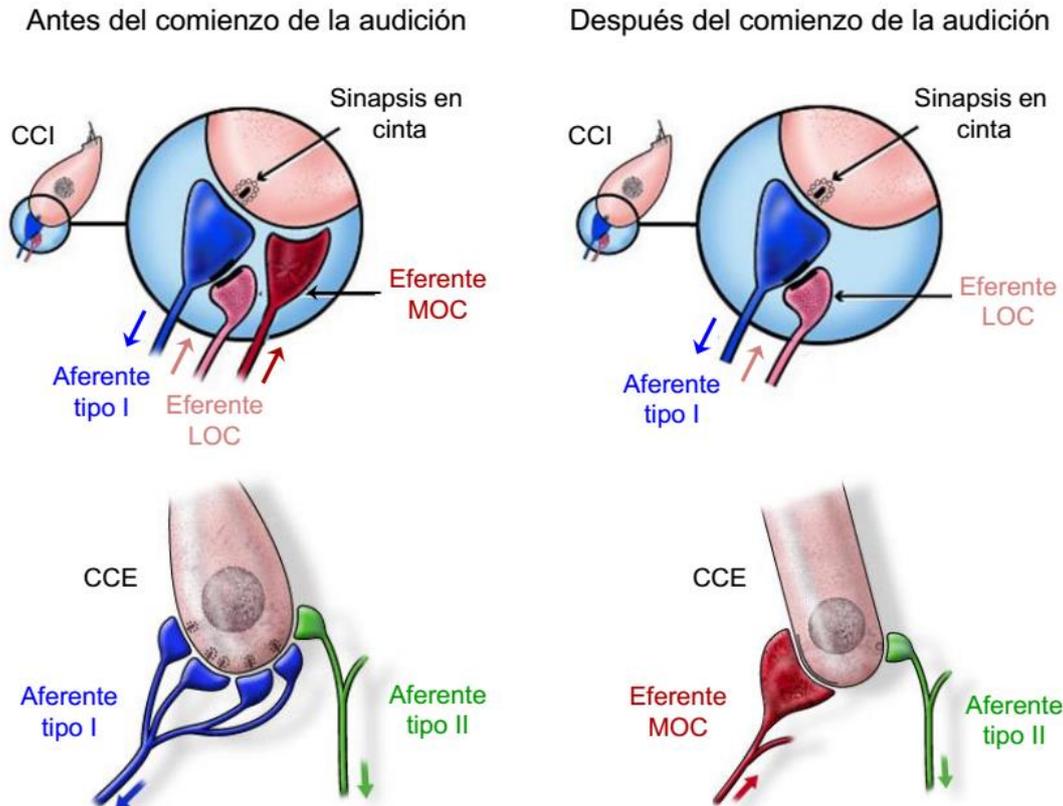


Figura 6. Cambios en la innervación eferente de las células ciliadas durante el desarrollo postnatal.

Luego del nacimiento (P0-3), las fibras eferentes MOC y LOC contactan a las CCIs y a las dendritas de las NGE de tipo I, respectivamente. Las CCEs carecen de innervación eferente (paneles a la izquierda). A partir de P5, las fibras MOC comienzan a establecer conexiones axosomáticas con las CCEs, mientras que los contactos con las CCIs comienzan a retraerse, hasta desaparecer poco después del comienzo de la audición. En el adulto, los axones eferentes MOC contactan sólo a las CCEs (paneles a la derecha).

Como se ha mencionado en la sección anterior, la sinapsis MOC-CCI es funcional, de carácter colinérgico e inhibitorio, y se encuentra mediada por nAChR $\alpha 9\alpha 10$ acoplados funcionalmente a canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de tipo SK2 (Glowatzki y Fuchs, 2000; Katz et al., 2004; Gómez-Casati et al., 2005; Goutman et al., 2005). Durante el desarrollo se han descrito cambios en la expresión de los genes involucrados en esta sinapsis. Estudios de hibridización *in situ* en ratas muestran que el ARNm de la subunidad $\alpha 9$ comienza a expresarse en las células ciliadas a partir de E18, los niveles máximos de expresión ocurren alrededor del nacimiento en las CCIs y alrededor de P10 en las CCEs (Luo et al., 1998; Simmons y Morley, 1998). La expresión de la subunidad $\alpha 10$ empieza más tardíamente, alrededor de E21, y presenta un máximo en P1 en las CCIs y en P10 en las CCEs (Morley y Simmons, 2002). A diferencia de la subunidad $\alpha 9$, cuya expresión se mantiene en las CCIs durante la adultez, la subunidad $\alpha 10$ deja de expresarse en las CCIs alrededor de P15, mientras que mantiene niveles robustos en las

CCEs (Elgoyhen et al., 2001; Morley y Simmons, 2002). Asimismo, mediante técnicas de inmunocitoquímica en ratas se observa que una proporción de CCIIs presenta *clusters* de nAChR y de canales SK2 en membrana a partir de P1, encontrándose en el 100% de las CCIIs a partir de P3, y que tanto la subunidad $\alpha 10$ como los canales SK2 dejan de expresarse alrededor de P15 (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

Los cambios durante el desarrollo en componentes esenciales de la sinapsis MOC-CCI ven reflejados en cambios en la actividad sináptica. Estudios electrofisiológicos (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011) demuestran que las CCIIs comienzan a responder a la aplicación exógena de ACh a partir de P0, es decir, desde esta edad los nAChR presentes en membrana son funcionales. En los días subsiguientes, la respuesta a la ACh se incrementa en amplitud hasta alcanzar un máximo alrededor de P8, para luego decaer hasta desaparecer poco después del comienzo de la audición, aproximadamente en P16, lo cual coincide con el cese de la expresión de la subunidad $\alpha 10$ y de los canales SK2 y con la retracción de las fibras eferentes (Morley y Simmons, 2002; Simmons, 2002; Katz et al., 2004). En P0 no se observa acoplamiento funcional entre los nAChR y los canales SK2, la aplicación de ACh provoca la despolarización de las CCIIs seguida por el disparo de potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} (ver más adelante). A partir de P1 empieza a observarse acoplamiento en un porcentaje de CCIIs, concordando con la aparición de *clusters* de SK2, y alcanza la totalidad de las células alrededor de P3 (Roux et al., 2011). Paralelamente al desarrollo del acoplamiento funcional entre los nAChR y los canales SK2 ocurre la aparición de respuestas sinápticas. La actividad sináptica se incrementa progresivamente con el tiempo de manera semejante a la corriente evocada por ACh exógena, sin embargo, desaparece más rápidamente que la misma, lo que sugiere que la sinapsis eferente dejaría de operar previamente a la pérdida de los nAChR de membrana (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

1.3.4. Actividad espontánea en las vías aferentes antes del comienzo de la audición

En diversos sistemas sensoriales en desarrollo se ha descrito la presencia de actividad espontánea, es decir, no generada por estímulos del medio ambiente, como por ejemplo en el sistema visual (Torborg y Feller, 2005), el somatosensorial (Allene et al., 2008), el olfatorio (Yu et al., 2004) y el auditivo (Kros et al., 1998; Tritsch et al., 2010). Esta actividad espontánea estaría involucrada en el correcto establecimiento de las conexiones sinápticas durante el desarrollo, ya que el bloqueo de la misma provoca trastornos en la organización de las áreas sensoriales (Cang et al., 2005; Chandrasekaran, 2005). En la vía auditiva en particular, se postula que la actividad espontánea juega un rol importante en promover la supervivencia y maduración de las neuronas auditivas (Mostafapour et al., 2000; Glueckert et al., 2003; Seal

et al., 2008), el desarrollo de sinapsis (Erazo-Fischer et al., 2007; McKay y Oleskevich, 2007) y el refinamiento de mapas tonotópicos (Kandler et al., 2009; Clause et al., 2014, 2017).

En el sistema auditivo la actividad espontánea es generada por las CCIIs y luego es propagada por la vía auditiva ascendente (Tritsch et al., 2010). Antes del comienzo de la audición (alrededor de P12 en roedores altrícios) las CCIIs disparan potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a), mediados por canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L con la subunidad $\text{Ca}_v1.3$ (Brandt et al., 2003). La excitación de las CCIIs dependería de la secreción de ATP por parte de las células de soporte internas, que se encuentran basalmente a las CCIIs. El ATP podría despolarizar a las CCIIs actuando directamente sobre ellas (Tritsch et al., 2007), o sobre las células de soporte internas, provocando la secreción de KCl, con el consiguiente aumento en la concentración extracelular de K^+ en el entorno de las CCIIs (Wang et al., 2015). El patrón de disparo de las CCIIs consiste en ráfagas de potenciales de acción intercaladas con periodos silenciosos, con características semejantes a lo largo de la cóclea (Sendin et al., 2014; Harrus et al., 2018). Esta actividad espontánea experimenta cambios durante el desarrollo postnatal. Desde P0 se han observado potenciales de acción aislados en las CCIIs, en las NGEs y en las neuronas principales del núcleo medial del cuerpo trapezoidal (MNTB, del inglés *medial nucleus of the trapezoid body*) (Tritsch y Bergles, 2010; Rusu y Borst, 2011). Recién en P1 es posible detectar ráfagas de potenciales de acción en las CCIIs (Sendin et al., 2014) y en las neuronas principales del MNTB (Tritsch et al., 2010). Además, se ha descrito que el patrón de disparo de las CCIIs cambia de ráfagas de potenciales de acción de duración y frecuencia heterogéneas en P1-3 a ráfagas largas de ocurrencia regular en P6-7 (Sendin et al., 2014). Durante la segunda semana postnatal, las CCIIs pierden la capacidad de disparar potenciales de acción espontáneos e inducidos (Marcotti et al., 2003a), lo cual estaría asociado a cambios en las conductancias de K^+ y de Ca^{2+} (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a, 2003b). Por otra parte, el cese de la actividad espontánea en las CCIIs también estaría asociado a la degeneración de las células de soporte internas, con la consecuente pérdida de secreción de ATP, y a la disminución de la expresión de receptores purinérgicos en las CCIIs (Tritsch y Bergles, 2010).

1.3.5. Rol de la sinapsis transitoria MOC-CCI

Las fibras eferentes MOC modulan el patrón de disparo de las CCIIs neonatales. Se ha observado que tanto la aplicación exógena de ACh (Glowatzki y Fuchs, 2000) como la estimulación eléctrica de las fibras MOC (Goutman et al., 2005; Johnson et al., 2011) disminuye o incluso suprime el disparo de potenciales de acción de las CCIIs. Por otra parte, en registros electrofisiológicos *in vivo* de neuronas del MNTB de ratones *knockout* (KO) de la subunidad $\alpha 9$

del nAChR, que carecen de inervación eferente funcional, no se evidencian cambios en la tasa de disparo promedio o en la frecuencia de las ráfagas de potenciales de acción con respecto a los ratones *wild-type*, sin embargo, sí presentan una alteración en la estructura temporal de las ráfagas, a saber, una disminución en su duración y un incremento en la tasa de disparo intra-ráfaga. Este patrón de disparo anormal da lugar, antes del comienzo de la audición, a una disminución en el silenciamiento y el fortalecimiento de las conexiones sinápticas entre el MNTB y la oliva superior lateral, una sinapsis inhibitoria de la vía auditiva implicada en la localización de los sonidos en el eje horizontal (Tollin, 2003). Luego del inicio de la audición, se observa una falta casi completa en la eliminación de ramas axonales de las neuronas del MNTB, manteniéndose un mapa tonotópico inmaduro (Clause et al., 2014). En este sentido, los ratones $\alpha 9$ KO muestran déficits en la localización de sonidos y en la discriminación de frecuencias (Clause et al., 2017). Estos resultados demuestran el rol esencial de la sinapsis transitoria MOC-CCI en el establecimiento apropiado de las vías auditivas.

Se ha reportado que luego del daño excitotóxico de las dendritas aferentes de tipo I provocado por la administración de AMPA a través de la ventana redonda, las fibras eferentes reinervan en forma transitoria a las CCIs, recapitulando lo que ocurre en los estadios tempranos del desarrollo postnatal (Ruel et al., 2007). Esta reinervación jugaría un rol importante en la regeneración y la neosinaptogénesis ocasionadas luego del daño. También se ha observado una reinervación eferente axosomática durante el envejecimiento, asociada a una pérdida de las sinapsis aferentes con un aumento en los umbrales auditivos. Estos contactos eferentes son inhibitorios y mediados por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$. Se ha postulado que podrían promover la supervivencia de las sinapsis aferentes remanentes mediante mecanismos anti-excitotóxicos (Lauer et al., 2012; Zachary y Fuchs, 2014).

1.4. Transmisión sináptica

1.4.1. Generalidades

Las neuronas se comunican entre sí a través de contactos celulares especializados conocidos como sinapsis. En función de su mecanismo de transmisión, las sinapsis se clasifican en eléctricas y químicas, siendo estas últimas las más extendidas.

El proceso de transmisión de una señal en las sinapsis químicas comienza cuando un potencial de acción invade el terminal de la neurona presináptica. La despolarización originada por la llegada del potencial de acción genera la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana presináptica (Katz y Miledi, 1967; Llinás y Nicholson, 1975; Llinás et al., 1981). Debido a la gran magnitud del gradiente de concentración de Ca^{2+} a ambos lados

de la membrana plasmática (la concentración de Ca^{2+} extracelular es aproximadamente 10^{-3}M , mientras que la intracelular es del orden de 10^{-7}M), la apertura de estos canales resulta en un rápido influjo de Ca^{2+} al terminal, con lo cual su concentración intracelular se incrementa rápidamente, lo que a su vez desencadena la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica, liberando el neurotransmisor contenido en las mismas a la brecha sináptica (Katz y Miledi, 1967; Llinás y Nicholson, 1975; Heuser et al., 1979; Llinás et al., 1981).

Luego de la exocitosis, los neurotransmisores difunden a través de la brecha sináptica hasta alcanzar los receptores específicos presentes en la membrana postsináptica. La unión del neurotransmisor a los receptores causa la apertura de canales iónicos en la postsinapsis, lo que genera la entrada o salida de iones de la neurona postsináptica. El flujo iónico ocasionado altera el potencial de membrana de la misma, incrementando o disminuyendo la probabilidad de que dispare un potencial de acción (Hall, 1972).

1.4.2. Naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor

En la década del '50, Bernard Katz y su equipo hicieron importantes avances en el campo de la fisiología sináptica mediante sus estudios en la placa neuromuscular de la rana. En esta preparación, empleando microelectrodos intracelulares, Katz y sus colaboradores registraban las respuestas postsinápticas –llamadas potenciales de placa (EPPs, del inglés *end-plate potentials*)– resultado de la acción de la ACh sobre las fibras musculares. Entre sus descubrimientos más notables se encuentra la naturaleza cuántica de la liberación de neurotransmisor, es decir, la liberación de neurotransmisor de los terminales presinápticos por medio de cuantos discretos (del Castillo y Katz, 1954).

El primer avance en conducir a este descubrimiento fue realizado cuando Fatt y Katz (1952a) describieron pequeñas despolarizaciones espontáneas en la postsinapsis que ocurrían cuando el nervio motor no estaba siendo estimulado. Debido a la similitud en el curso temporal, la localización espacial y la sensibilidad a distintas drogas, ellos llamaron a estos eventos “potenciales de placa miniatura” (MEPPs, del inglés *miniature end-plate potentials*) y llegaron a la conclusión de que eran el resultado de la liberación espontánea de ACh de la neurona motora presináptica.

En un estudio posterior, del Castillo y Katz (1954) examinaron cuantitativamente la relación entre EPPs y MEPPs, basándose en resultados obtenidos por Fatt y Katz (1952a) en una preparación de placa neuromuscular incubada en una solución de Ringer con baja concentración de Ca^{2+} y alta concentración de Mg^{2+} . Ellos observaron que bajo estas condiciones los EPPs se volvían muy pequeños y con una amplitud sustancialmente variable, y que esta variabilidad coincidía con un múltiplo entero de la amplitud promedio de los MEPPs. Aún más, encontraron

que la distribución de las amplitudes de los EPPs ajustaba a una distribución de Poisson, considerando a la amplitud promedio de los MEPPs como unidad. En base a estos resultados, concluyeron que los EPPs consisten de múltiples cuantos de ACh, equivalentes a un MEPP, e hipotetizaron que los terminales sinápticos cuentan con un *pool* de estos cuantos, parte del cual se libera de manera sincronizada con la estimulación presináptica. Poco tiempo después, con el desarrollo de la microscopía electrónica, se demostró el correlato estructural de los cuantos al describirse por primera vez la presencia de vesículas sinápticas en los terminales (Palade y Palay, 1954; De Robertis y Bennett, 1955; Robertson, 1956). Sin embargo, recién se contó con evidencias sólidas con el trabajo de Heuser et al. (1979), quienes en la placa neuromuscular de la rana encontraron una buena correlación entre el número de vesículas fusionadas observadas con el microscopio electrónico y el número de cuantos liberados (contenido cuántico) determinado mediante registros electrofisiológicos.

1.4.3. Importancia del Ca^{2+} en la transmisión sináptica

La primera evidencia electrofisiológica de que un aumento en la concentración de calcio incrementa la liberación de neurotransmisor fue aportada por del Castillo y Stark (1952), en experimentos realizados en la placa neuromuscular de la rana. 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 y Miledi, 1967). Además, dejaron en claro que el influjo de calcio era el responsable de la liberación del neurotransmisor, ya que al despolarizar la presinapsis al nivel del potencial de reversión del Ca^{2+} se suprime la respuesta postsináptica. En base a estos resultados, Katz y Miledi (1967) propusieron que la despolarización del terminal sináptico ocasionaría la apertura de canales específicos de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y que el influjo de Ca^{2+} a su vez causaría la liberación cuántica del neurotransmisor, siendo el responsable del acoplamiento excitación-secreción. Ese mismo año, Dodge y Rahamimoff (1967) reportaron que la relación entre la concentración de Ca^{2+} extracelular y la cantidad de neurotransmisor liberada por un terminal sináptico es altamente no lineal. Esto implica que pequeños cambios en la concentración de Ca^{2+} en el medio externo, o cambios en la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, pueden generar grandes variaciones en la cantidad de neurotransmisor liberada.

Estudios de *voltage-clamp* en la sinapsis gigante del calamar llevados a cabo por Llinás y sus colegas confirmaron que las corrientes de Na^+ y K^+ generadas durante un potencial de

acción no son necesarias para la liberación de neurotransmisor, ya que la reproducción de un potencial de acción artificial en la presinapsis (pretratada con TTX y tetraetilamonio (TEA)) daba como resultado un potencial sináptico indistinguible al producido por un potencial de acción normal. Aún más, permitieron medir la magnitud y el curso temporal de la corriente de calcio producida por el potencial de acción artificial (Llinás et al., 1982). Posteriormente, Llinás y sus colaboradores fueron capaces de visualizar la entrada de Ca^{2+} directamente, empleando el indicador de Ca^{2+} aequorina (Llinás et al., 1992). Ellos demostraron que un breve tren de potenciales de acción presinápticos resulta en la aparición de microdominios con una alta concentración de calcio dentro del terminal. El incremento en la concentración de Ca^{2+} de manera local en microdominios es apoyado por experimentos ulteriores, en los cuales la inyección de BAPTA (un quelante rápido de Ca^{2+}), pero no de EGTA (un quelante lento), produce una gran atenuación de la liberación, sin afectar la propagación del potencial de acción (Adler et al., 1991). A partir de las tasas de difusión del Ca^{2+} y de unión al EGTA se puede calcular que el sensor de Ca^{2+} yace a menos de 100 nm del sitio de entrada de este ion.

1.5. Canales iónicos que participan del proceso de transmisión sináptica

1.5.1. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDVs) se activan en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática y conducen Ca^{2+} hacia el interior celular, donde inicia diversas respuestas fisiológicas, entre ellas, secreción, contracción muscular y transcripción génica (Catterall, 2011; Zamponi et al., 2015). En base a su voltaje de activación, los CCDVs se clasifican en canales con alto voltaje de activación (HVA, del inglés *high voltage-activated channels*) y con bajo voltaje de activación (LVA, del inglés *low voltage-activated channels*) (Armstrong y Matteson, 1985; Bean, 1985). Los canales HVA son complejos proteicos heteroméricos conformados por la subunidad $\alpha 1$, que constituye el poro del canal, y las subunidades auxiliares β y $\alpha 2\delta$, mientras que los canales LVA carecerían de subunidades auxiliares (Figura 7) (Catterall et al., 2005). Diferentes tipos de subunidades $\alpha 1$ determinan los distintos tipos de CCDVs, hasta el momento se conocen 10 subunidades diferentes, las cuales se clasifican en tres familias de acuerdo a su estructura y función: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 (Tabla 1) (Snutch y Reiner, 1992; Ertel et al., 2000). La familia Ca_v1 codifica a los CCDVs de tipo L, de los cuales existen cuatro subtipos: $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ y $\text{Ca}_v1.4$ (Tanabe et al., 1987; Mikami et al., 1989; Williams et al., 1992b; Bech-Hansen et al., 1998). La corriente de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L se caracteriza por una gran conductancia unitaria, lenta inactivación dependiente de voltaje, e inhibición específica por dihidropiridinas,

fenilalquilaminas y benzotiazepinas (Reuter, 1979; Tsien et al., 1988). Los CCDVs del tipo L participan en el acoplamiento excitación-contracción en células musculares (Reuter, 1979; Tsien et al., 1988), en la liberación de hormonas (Yang y Berggren, 2006), en la regulación de la expresión génica e integración de los inputs sinápticos en neuronas, y en la liberación del neurotransmisor en las sinapsis en cinta de las células sensoriales (Tsien et al., 1988; Bean, 1989; Flavell y Greenberg, 2008). La familia Cav2 incluye a tres miembros: Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3. La subunidad Cav2.1 da lugar a los CCDVs de tipo P/Q (Mori et al., 1991; Bourinet et al., 1999), que pueden ser bloqueados específicamente por la toxina de la araña *Agelenopsis aperta*, la ω -agatoxina IVA (Mintz et al., 1992a). La subunidad Cav2.2 codifica a los CCDVs de tipo N (Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992a), que son inhibidos específicamente por la toxina del caracol marino *Conus geographus* ω -conotoxina GVIA (Tsien et al., 1988; Olivera et al., 1994). La subunidad Cav2.3 conforma a los CCDVs de tipo R (Soong et al., 1994), que son bloqueados selectivamente por el péptido SNX-482, obtenido de la tarántula *Hysteroocrates gigas* (Newcomb et al., 1998). Los CCDVs de la familia Cav2 tienen una inactivación dependiente de voltaje más rápida (Nowycky et al., 1985; Llinás et al., 1989) y se encuentran predominantemente en neuronas, en donde median la liberación rápida del neurotransmisor (Takahashi y Momiyama, 1993; Wheeler et al., 1994; Wu et al., 1999). Por último, existen tres subtipos de subunidades Cav3 (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3), las cuales codifican a los CCDVs de tipo T (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Lee et al., 1999). La corriente de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo T se caracteriza por una activación a potenciales de membrana negativos, una conductancia unitaria pequeña, una inactivación rápida dependiente de voltaje y por su sensibilidad a Ni^{2+} y relativa resistencia al bloqueo por Cd^{2+} , que bloquea a todos los canales HVA en una concentración micromolar (Carbone y Lux, 1984; Nowycky et al., 1985; Perez-Reyes, 2003). Estos CCDVs tienen un rol importante en la actividad de marcapaso neuronal y cardíaca (Perez-Reyes, 2003; Guzman et al., 2009).

Todas las subunidades $\alpha 1$ son proteínas transmembranales organizadas en cuatro dominios repetidos (I-IV), cada uno de los cuales comprende seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un *loop* asociado a la membrana entre los segmentos S5 y S6 (Figura 7). Los segmentos S4 de cada dominio actúan como sensores de voltaje (Tanabe et al., 1987), mientras que los *loops* interactúan entre ellos para formar el poro del canal (Yang et al., 1993; Ellinor et al., 1995). Las subunidades β y $\alpha 2\delta$ se encuentran asociadas a la subunidad $\alpha 1$ (Figura 7). Existen cuatro tipos de subunidades β , las cuales son proteínas citoplasmáticas (Ruth et al., 1989; Buraei y Yang, 2010). La subunidad β modifica el *gating* (cambios conformacionales que llevan a la activación, desactivación e inactivación de los canales iónicos) de la subunidad $\alpha 1$ e incrementa su tráfico hacia la superficie celular (Brice y Dolphin, 1999; Buraei y Yang, 2010). También hay cuatro

tipos de subunidades $\alpha_2\delta$, que se transcriben y traducen como una única proteína, y luego son escindidos post-traduccionalmente y reconectados por un puente disulfuro (Dolphin, 2013). Esta subunidad se encuentra anclada a la cara externa de la membrana plasmática a través de su unión a un grupo glicofosfatidilinositol (Figura 7) (Davies et al., 2010). La asociación de la subunidad $\alpha_2\delta$ a la subunidad α_1 incrementa su expresión en membrana (Barclay et al., 2001; Cantí et al., 2005; Davies et al., 2010) y disminuye su voltaje de inactivación (Wakamori et al., 1999; Cantí et al., 2005; Davies et al., 2010). Los CCDVs de tipo L del músculo esquelético también contienen una subunidad γ que consta de cuatro segmentos transmembrales (Figura 7) (Takahashi et al., 1987; Sharp y Campbell, 1989), la cual disminuye la conductancia y el voltaje de inactivación de estos canales (Freise et al., 2000; Arikath et al., 2003).

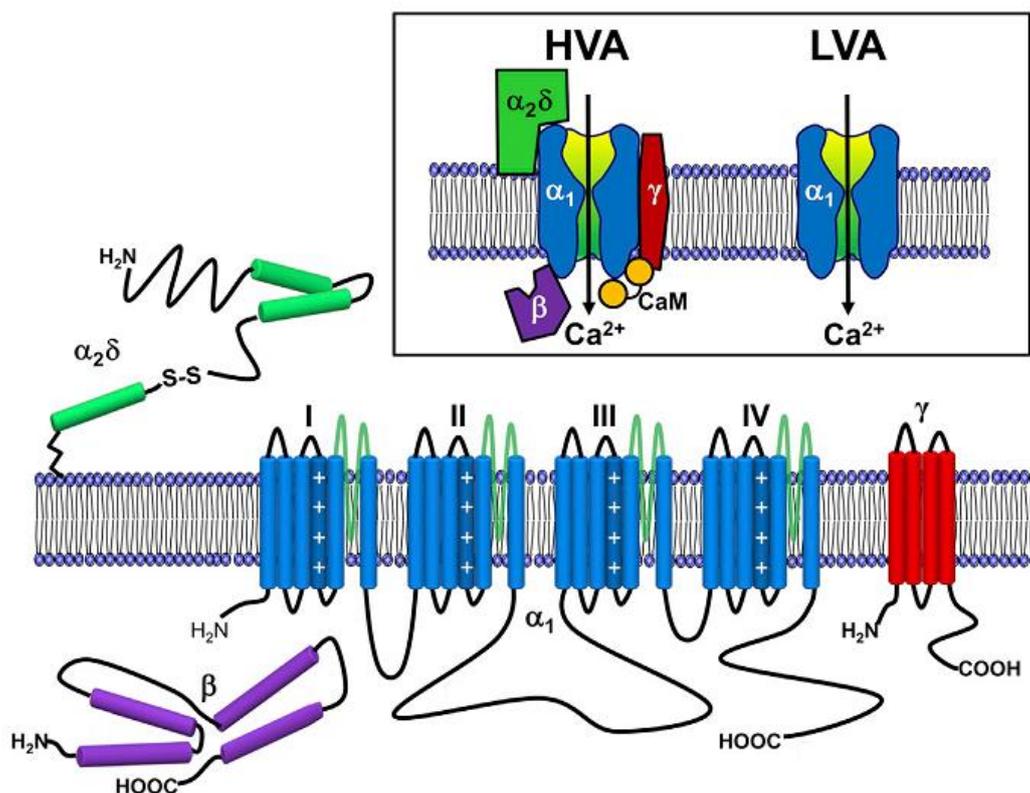


Figura 7. Estructura molecular de los CCDVs. El esquema muestra la estructura de las diferentes subunidades que componen a los CCDVs. En la subunidad α_1 los signos + denotan al segmento S4, que actúa como sensor de voltaje, los *loops* que conforman el poro de los CCDVs están indicados en verde. Las 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. Adaptado de Simms y Zamponi (2014).

Tipo de I _{Ca}	Subunidad α	Antagonista específico	Funciones fisiológicas
L	Cav1.1	DHPs	Acoplamiento excitación contracción en el músculo esquelético. Regulación de la transcripción.
	Cav1.2	DHPs	Acoplamiento de la excitación contracción en el músculo cardíaco y liso, secreción endócrina, corrientes de Ca ²⁺ en soma y dendritas, regulación de la actividad enzimática y de la transcripción.
	Cav1.3	DHPs	Secreción endócrina, marcapasos cardíaco, corrientes de Ca ²⁺ en soma y dendritas, liberación del neurotransmisor en células ciliadas.
	Cav1.4	DHPs	Transducción visual.
P/Q	Cav2.1	ω -agatoxina IVA	Liberación del neurotransmisor, corrientes de Ca ²⁺ en dendritas.
N	Cav2.2	ω -conotoxina GVIA	Liberación del neurotransmisor, corrientes de Ca ²⁺ en dendritas.
R	Cav2.3	SNX-482	Liberación del neurotransmisor, corrientes de Ca ²⁺ en dendritas.
T	Cav3	No se conoce	Marcapasos y disparo repetitivo.

Tabla 1. Identidad de las subunidades α , antagonistas específicos y funciones conocidas de los distintos tipos de CCDVs. Abreviaciones: DHP, dihidropiridinas. Modificado de Catterall (2011)

1.5.2. Canales de K⁺ dependientes de voltaje y de Ca²⁺

Los canales de K⁺ son los únicos canales catiónicos que presentan un potencial de reversión cercano al potencial de reposo de la mayoría de las células, por lo cual juegan un rol crucial en el establecimiento del mismo. En neuronas y otras células excitables, también cumplen un papel importante determinando la forma y la duración del potencial de acción, la tasa de disparo, y de manera general el grado de excitabilidad. Una subfamilia de canales de K⁺, denominada BK, maxi-K o SLO, se distingue por su gran conductancia unitaria y por su dependencia del voltaje versátil, modulable por factores intracelulares tales como Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻, pH y fosforilación, permitiendo la regulación del potencial de membrana por diversos eventos celulares (Salkoff et al., 2006).

Los canales BK están constituidos por un homotetrámero funcional de subunidades α , el cual puede estar acompañado por distintas subunidades accesorias. En el genoma de mamíferos existen cuatro genes que codifican subunidades α : Slo1, los parálogos Slo2.1 y 2.2 y Slo3, que

dan lugar a canales que difieren marcadamente en sus propiedades de *gating* (Salkoff et al., 2006). Uno de ellos, el canal SLO1, BK_{Ca} o simplemente BK, depende de la acción cooperativa de la despolarización de la membrana y de la $[Ca^{2+}]_i$ para su activación (Magleby, 2003).

Las subunidades α que conforman al canal BK tienen una estructura de siete pasos transmembranales (S0-S6), con un extremo N-terminal corto extracelular y un extremo C-terminal intracelular largo (Figura 8a) (Meera et al., 1997). Los segmentos transmembranales S0-S4 constituyen el sensor de voltaje (Ma et al., 2006; Wang y Sigworth, 2009; Pantazis y Olcese, 2012), mientras que los segmentos S5-S6 contribuyen a la formación del poro del canal (Brelidze et al., 2003; Nimigean et al., 2003; Haug et al., 2004). La región intracelular consta de dos dominios reguladores de la conductancia de K^+ (RCK1 y RCK2), cada uno de los cuales contiene un sitio de unión al Ca^{2+} de alta afinidad ($K_D \sim 10 \mu M$) (Schreiber et al., 1999; Xia et al., 2002; Lu et al., 2006; Yuan et al., 2010), cuya ocupación es una de las fuentes de energía para la apertura del canal (Xia et al., 2002; Magleby, 2003; Sweet y Cox, 2008). La otra fuente de energía es la despolarización de la membrana, que genera el desplazamiento de los segmentos S0-S4, produciendo un cambio conformacional en el canal que contribuye a su apertura (Ma et al., 2006; Wang y Sigworth, 2009; Pantazis y Olcese, 2012). Ambos estímulos actúan alostéricamente sobre la maquinaria de *gating*, de manera tal que concentraciones crecientes de Ca^{2+} corren el voltaje de activación hacia potenciales más negativos (Cox et al., 1997; Rothberg y Magleby, 1999; Latorre y Brauchi, 2006). Es así que bajo concentraciones de $Ca^{2+} \geq 10 \mu M$ (la concentración alcanzada en un microdominio de Ca^{2+}), estos canales presentan una activación robusta dentro de voltajes fisiológicos (Latorre et al., 1982; Cui et al., 1997). La mayoría de los canales BK se encuentran asociados con subunidades β auxiliares (Figura 8b) (Orio et al., 2002). La incorporación de subunidades β origina importantes cambios en las propiedades de los canales BK, se han reportado efectos sobre el *gating*, la sensibilidad a toxinas específicas y en el tráfico de canales hacia la membrana plasmática (Orio et al., 2002; Torres et al., 2007; Berkefeld et al., 2010). Recientemente se ha descrito una nueva familia de subunidades auxiliares de los canales BK, denominadas subunidades γ (Figura 8c), las cuales disminuyen sustancialmente el voltaje de activación de los canales BK en sistemas heterólogos (Yan y Aldrich, 2012). Sin embargo, su función fisiológica aún se desconoce (Zhang y Yan, 2014; Gonzalez-Perez y Lingle, 2019).

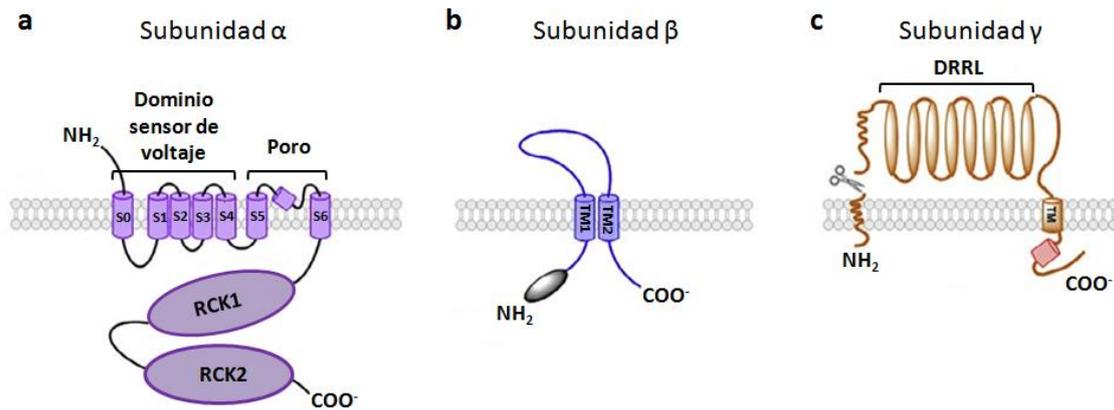


Figura 8. Estructura de los canales BK. Los esquemas muestran la estructura molecular de las subunidades que conforman a los canales BK, las subunidades α (a) y β (b) y γ (c). Las estructuras de α hélice predichas a partir del análisis de secuencia están representadas como cilindros. RCK1 y 2: dominios reguladores de la conductancia de K⁺; S y TM: segmentos transmembrales; DRRL: dominio rico en repeticiones de leucina; NH₂: extremo aminoterminal; COO⁻: extremo carboxiterminal. Adaptado de Li y Yan (2016).

En las neuronas, la principal fuente de Ca²⁺ para la activación de los canales BK proviene de los CCDVs, ya que el bloqueo de los mismos inhibe la corriente de K⁺ a través de los BK (Prakriya y Lingle, 1999; Edgerton y Reinhart, 2003; Goldberg y Wilson, 2005). Dado que estos canales necesitan de una concentración de Ca²⁺ $\geq 10 \mu\text{M}$ para activarse dentro de un rango de voltaje fisiológico, y que esta concentración sólo se encuentra en las proximidades de los CCDVs (Augustine et al., 2003), es de esperar que ambos se encuentren co-localizados. Se ha demostrado que existe una interacción directa entre estos canales, formando super-complejos (Berkefeld et al., 2006; Loane et al., 2007). La formación de estos super-complejos permite que múltiples procesos celulares sean regulados de manera específica por el Ca²⁺, sin alterar el medio ambiente celular de forma global (Marrion y Tavalin, 1998; Müller et al., 2007). En este sentido, en distintos tipos neuronales se ha observado que tanto el bloqueo de los CCDVs como de los canales BK resulta en el ensanchamiento de los potenciales de acción, lo que indica que estos últimos participan de la repolarización de la membrana (Shao et al., 1999; Faber y Sah, 2002; Sausbier et al., 2004; Goldberg y Wilson, 2005; Gutzmann et al., 2019). Esta contribución a la repolarización actúa como un mecanismo de retroalimentación negativo, acotando el influjo de Ca²⁺ debido a la inactivación de los CCDVs, lo que a su vez reduce la liberación de neurotransmisor y, consecuentemente, la amplitud del potencial sináptico (Roberts et al., 1990; Robitaille et al., 1993b; Raffaelli et al., 2004; Zorrilla de San Martín et al., 2010; Robles Gómez et al., 2018).

1.6. Poblaciones de vesículas sinápticas

Los terminales sinápticos usualmente cuentan con cientos de vesículas sinápticas en la zona activa. Según qué tan accesibles están para ser liberadas, las vesículas sinápticas han sido clasificadas en distintas poblaciones o *pooles* (Rizzoli y Betz, 2005; Alabi y Tsien, 2012). El *pool* de vesículas listas para ser liberadas (RRP, del inglés *Readily Releasable Pool*) es definido como las vesículas sinápticas que están disponibles inmediatamente cuando la neurona presináptica es estimulada, y comprende alrededor del 1-2% del total de vesículas en el terminal sináptico. Se ha propuesto que el correlato morfológico del RRP son las vesículas ancladas a la membrana de la zona activa (Schikorski y Stevens, 2001; Rizzoli y Betz, 2005), sin embargo, aún se desconoce si todas las vesículas ancladas son parte del RRP, y viceversa, si todas las vesículas del RRP están ancladas (Kaeser y Regehr, 2017). El *pool* de reciclaje está constituido por las vesículas que reabastecen el RRP y mantienen la liberación durante una estimulación fisiológica moderada, y representa alrededor del 5-20% de todas las vesículas. Por último, el *pool* de reserva es un depósito de vesículas sinápticas que sólo son movilizadas durante una estimulación muy intensa y prolongada y comprende a la mayor parte de las vesículas de un terminal sináptico (aproximadamente el 80-90%).

El número de vesículas en el RRP y su probabilidad promedio de liberación ($P_{\text{vesicular}}$) establecen el contenido cuántico de la liberación evocada del neurotransmisor (m), constituyendo los determinantes presinápticos de la fuerza sináptica (del Castillo y Katz, 1954). Es por ello que la determinación de estos parámetros es fundamental para la caracterización funcional de una sinapsis. Se han desarrollado distintas metodologías para establecer el tamaño del RRP, que deben asegurar su agotamiento completo (Neher, 2015; Kaeser y Regehr, 2017). Algunos métodos consisten en la aplicación de un estímulo intenso que vacía el *pool* rápidamente, antes de que exista reabastecimiento de vesículas, entre ellos, la aplicación de soluciones de alta osmolaridad de sacarosa (Fatt y Katz, 1952; Rosenmund y Stevens, 1996), la despolarización del terminal presináptico (Mennerick y Matthews, 1996; Sakaba y Neher, 2001) y el desenjaulamiento de Ca^{2+} presináptico (Schneppenburger et al., 1999; Sakaba, 2008). Luego, la estimación del RRP se realiza mediante la medición de las corrientes postsinápticas (Schneppenburger et al., 1999; Sakaba y Neher, 2001) o por la estimación del cambio de capacitancia generado por la fusión vesicular (Mennerick y Matthews, 1996; Sun y Wu, 2001). Sin embargo, estas metodologías a menudo proveen estimaciones del RRP mayores que las obtenidas por métodos de estimulación más fisiológicos (Ritzau-Jost et al., 2014). En este sentido, el vaciamiento del RRP por trenes de estimulación de alta frecuencia (Schneppenburger et al., 1999; Stevens y Williams, 2007; Baur et al., 2015) es el método preferible. Dado que el

agotamiento de las vesículas ocurre en un periodo de tiempo más extendido es necesario tener en cuenta una posible contribución de vesículas recién recicladas (Neher, 2015; Thanawala y Regehr, 2016; Kaeser y Regehr, 2017). Una vez determinado el tamaño del RRP, la $P_{\text{vesicular}}$ puede calcularse a partir de la razón entre el m y el tamaño del RRP (del Castillo y Katz, 1954).

1.7. Plasticidad de corto término

Una particularidad de la actividad sináptica es que no es estática, sino que tiene la capacidad de cambiar según su historia previa. Varias formas de plasticidad sináptica dependiente de la actividad moldean la respuesta de una sinapsis. La plasticidad sináptica de corto término (STP) tiene una duración de decenas de milisegundos a varios minutos y puede modificar la fuerza sináptica, la cuál puede ser reducida (depresión), o incrementada (facilitación) (Fioravante y Regehr, 2011). En la mayoría de las sinapsis coexisten las diversas formas de plasticidad sináptica, y el resultado neto de su interacción es observado en la fuerza sináptica (Dittman et al., 2000; Zucker y Regehr, 2002; Pan y Zucker, 2009). La prominencia de cada forma de plasticidad depende de la probabilidad inicial de liberación de las vesículas sinápticas. Las sinapsis con una probabilidad de liberación inicial alta tienden a deprimir, mientras que aquellas que presentan una probabilidad de liberación inicial baja usualmente facilitan (Zucker y Regehr, 2002; Fioravante y Regehr, 2011).

Los mecanismos que originan STP son en general de naturaleza presináptica, aunque también se han observado mecanismos postsinápticos (Dittman et al., 2000; Scheuss et al., 2002; Wang y Manis, 2008). La depresión de corto término ha sido generalmente atribuida al agotamiento de las vesículas que componen el RRP. Dado que el número de vesículas en el RRP es limitado, si un potencial de acción libera una alta proporción de estas vesículas, estímulos subsecuentes aplicados antes de que se complete el reabastecimiento de las mismas van a producir una menor liberación (Liley y North, 1953; Betz, 1970; Zucker y Regehr, 2002). Además, existen fenómenos postsinápticos que pueden mediar la depresión. Cuando la probabilidad de liberación es alta, la saturación de los receptores postsinápticos puede limitar las respuestas sinápticas (Wadiche y Jahr, 2001; Foster et al., 2002). Aún más, los receptores postsinápticos pueden sufrir desensibilización, volviéndose incapaces de responder ante la acción del ligando, conduciendo a una disminución de corto plazo en la fuerza sináptica (Trussell et al., 1993; Chen et al., 2002; Xu-Friedman y Regehr, 2004). En cuanto a la facilitación, hay numerosas evidencias de que es causada por el Ca^{2+} residual que permanece en el terminal sináptico luego de un potencial de acción (Mallart y Martin, 1967, 1968; Katz y Miledi, 1968; Zucker y Regehr, 2002). Se ha postulado que el Ca^{2+} residual incrementa la probabilidad de liberación a través de su unión con un sensor de Ca^{2+} diferente del que evoca la

liberación rápida del neurotransmisor (Atluri y Regehr, 1996; Tang et al., 2000). Según un estudio reciente, el sensor de Ca^{2+} que media la facilitación correspondería a la sinaptotagmina-7 (Jackman et al., 2016). Para un análisis más detallado sobre los mecanismos que originan STP ver Discusión (sección 5.2).

1.8. La sinapsis MOC-CCI en el periodo previo al comienzo de la audición

Estudios previos en nuestro laboratorio (Zorrilla de San Martín et al., 2010, 2012) han comenzado a caracterizar las propiedades biofísicas y moleculares de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis eferente transitoria MOC-CCI durante el desarrollo postnatal, empleando una preparación de órgano de Corti de ratón extraída de forma aguda. Se ha observado que el contenido cuántico (m), el número promedio de vesículas liberadas cada vez que un potencial de acción arriba al terminal, aumenta entre los periodos P6-7 y P9-11, lo que indica que la fuerza sináptica se incrementa durante el desarrollo postnatal. Por otra parte, se ha determinado que en P9-11 la liberación del neurotransmisor se encuentra mediada por el Ca^{2+} que ingresa al terminal a través de los CCDVs de tipo P/Q y N, mientras que el Ca^{2+} que ingresa por los CCDVs de tipo L modula negativamente la liberación mediante la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y de voltaje del tipo BK, al acelerar la repolarización del potencial de acción que llega al terminal (Figura 9). Resultados preliminares indican que en P6-7 la liberación es parcialmente mediada por los CCDVs de tipo P/Q y que los CCDVs de tipo N no estarían involucrados (Figura 9). Se desconoce qué otro/s CCDVs contribuyen a este proceso, y si en este periodo temprano también existe una modulación negativa por parte de los CCDVs de tipo L acoplados funcionalmente a los canales BK. Queda por establecer si el incremento en el m durante el desarrollo postnatal se encuentra asociado a modificaciones en el patrón de STP expresado por esta sinapsis. Nada se sabe aún de las propiedades de la transmisión sináptica ni de los tipos de CCDVs involucrados en este proceso en P4, el primer estadio funcional de esta sinapsis (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

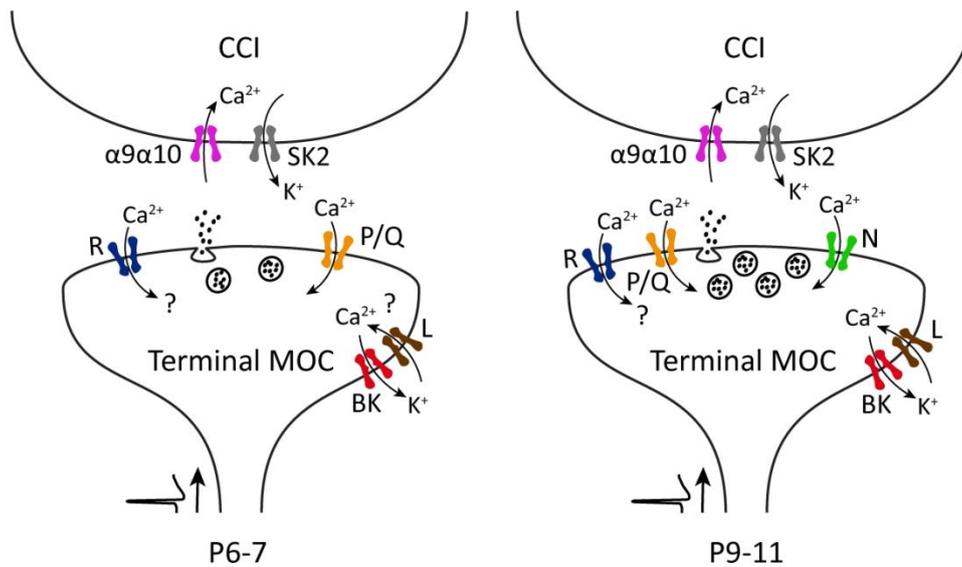


Figura 9. Esquema representativo de los canales iónicos que participan de la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI en distintos estadios del desarrollo postnatal. En P9-11, la liberación de ACh depende de la activación de los CCDVs de tipo P/Q y N, mientras que es modulada negativamente por el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L a través de la activación de los canales BK, acelerando la repolarización del potencial de acción presináptico y acotando la entrada de Ca^{2+} . En P6-7, resultados preliminares sugieren que la liberación de ACh es mediada parcialmente por los CCDVs de tipo P/Q y que los CCDVs de tipo N no participan de este proceso. Se ignora qué otro/s CCDV/s contribuye/n a la transmisión sináptica en este estadio (posible participación de los CCDVs de tipo R). También se desconoce si la modulación negativa llevada a cabo por los CCDVs de tipo L-canales BK está presente.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Caracterizar las propiedades biofísicas, moleculares y funcionales de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis transitoria entre las fibras MOC y las células ciliadas internas (sinapsis MOC-CCI) durante el desarrollo postnatal, en el periodo previo al comienzo de la audición.

2.2. Objetivos particulares

- Estudiar las propiedades de la liberación del neurotransmisor y los fenómenos de plasticidad sináptica de corto término (STP) en los estadios P4, P6-7 y P9-11.
- Estudiar los tipos de canales iónicos que median y/o modulan la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI del ratón desde el nacimiento hasta el comienzo de la audición (periodos P4, P6-7 y P9-11).
- Caracterizar el efecto de una mutación nula en el gen que codifica para la subunidad α del canal BK (ratones *Slo^{-/-}*) sobre las propiedades de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI en el periodo P9-11.

3. Materiales y métodos

3.1. Disección del órgano de Corti

Se utilizaron ratones Balb/C de 4, 6-7 y 9-11 días de edad, y ratones *Slo* de 9-11 días de edad. 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 Guía de Eutanasia de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, por sus siglas en inglés), Edición 2013, y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INGEBI.

Las disecciones del órgano de Corti se realizaron bajo lupa (Leica MZ75, Wetzlar, Alemania). 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 un pin metálico 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, Japón). 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; Gómez-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 (Figura 10b) (Kros et al., 1998; Marcotti y Kros, 1999). Para realizar los registros electrofisiológicos en las CCIs, 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 CCIs 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 conversora 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 5-7 M Ω estiradas con un estirador de pipetas modelo PP-830 (Narishige, Tokio, Japón). Los registros en las CCIs se realizaron a potenciales de sostén ($V_{\text{sostén}}$) de -90 mV, debido a que en este potencial las células se mantienen en buenas condiciones durante largos periodos de tiempo (hasta 1 hora), y a que la relación entre la amplitud de las corrientes sinápticas y el ruido es elevada. Dado que el potencial de reversión de la corriente sináptica combinada nAChR+SK2 es de aproximadamente -70 mV (Figura 10c) (Gómez-Casati et al 2005), a -90 mV se registran corrientes sinápticas entrantes. Sin embargo, fisiológicamente la sinapsis MOC-CCI es inhibitoria, ya que el potencial de reposo de las CCIs es de alrededor de -60 mV. Es por ello que se conserva la denominación corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs), a pesar de que se registran corrientes catiónicas entrantes.

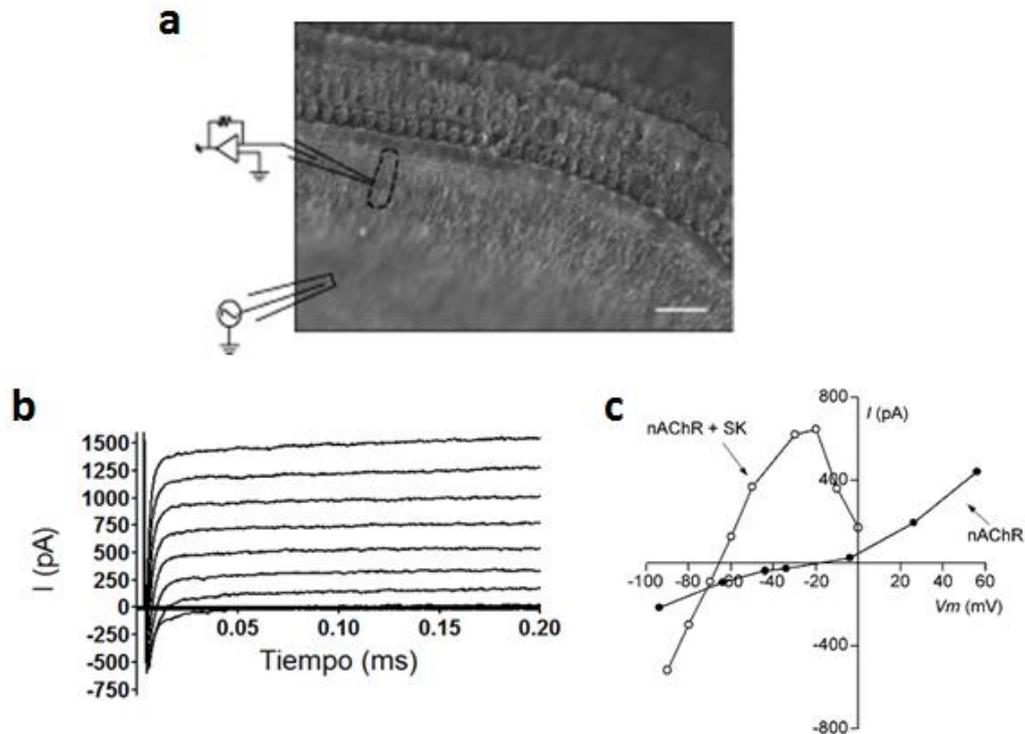


Figura 10. Esquema de registro y estimulación; identificación de las CCIs por sus características electrofisiológicas. **a**, En líneas punteadas se destaca la ubicación de la célula ciliada interna con el esquema representativo de las posiciones de las pipetas de registro y estimulación. Escala: 20 μm . **b**, Trazos representativos de las corrientes evocadas por el protocolo de corriente en función del voltaje utilizado para identificar a las células ciliadas. **c**, Relación corriente-voltaje producida por la activación del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ acoplado al canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} SK2 (círculos vacíos) o por el nAChR aislado (círculos llenos). Esquema extraído de Gómez-Casati et al (2005).

3.4. Estimulación eléctrica de los axones eferentes MOC

Para producir la liberación de neurotransmisor desde los terminales eferentes, se utilizó un electrodo monopolar ubicado a aproximadamente 80 μm en dirección hacia el modiollo de la CCI bajo estudio, de acuerdo a los protocolos establecidos por Goutman et al. (2005) y Zorrilla de San Martín et al. (2010) (Figura 10a). El estímulo eléctrico fue aplicado a través de una pipeta de vidrio (con una resistencia de 0,4 a 0,9 $\text{M}\Omega$). 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 70-300 μA de amplitud y de 0,1-0,2 ms de duración.

3.5. Estimulación eléctrica de las células ciliadas internas

Para evaluar la presencia de potenciales de acción evocados en las CCIs, se realizaron registros electrofisiológicos de *whole-cell patch clamp* en la configuración *current clamp*. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente despolarizante de 300, 500 y 700 pA y 10 segundos de duración, y rampas de corriente despolarizante de 700 pA y 12,5 segundos de duración por medio de las pipetas de registro. La presencia de potenciales de acción fue analizada visualmente.

3.6. Liberación evocada por alto K^+

En los experimentos de liberación evocada por alto K^+ en ratones Balb/C, la liberación del neurotransmisor de los terminales eferentes se produjo por despolarización usando una solución extracelular con 15 mM K^+ aplicada mediante el sistema de perfusión del baño (flujo 2 ml/min). Las corrientes sinápticas espontáneas fueron identificadas visualmente usando Minianalysis 6.0.3 (Synaptosoft Inc, Fort Lee, NJ, USA). Luego de la incubación de las preparaciones en alto K^+ por 4-8 minutos, se aplicó un antagonista (Nifedipina) o un agonista ((\pm)-Bay-K 8644) de los CCDVs de tipo L. Para cuantificar los efectos de cada droga, se estableció la frecuencia promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas espontáneas en ausencia y presencia de las mismas.

En los experimentos realizados en ratones *Slo*, la presencia de actividad sináptica se evaluó utilizando una solución extracelular conteniendo 80 mM K^+ .

3.7. 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 y Katz, 1954). 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 descripto 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. Sólo 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 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:

$$m = \ln \left(\frac{N}{n_0} \right)$$

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 100 repeticiones (considerando las fallas) y la amplitud promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas espontáneas (sIPSCs) (del Castillo y Katz, 1954).

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). El método de fallas fue empleado para calcular el m sólo en aquellos casos en que no fuese posible obtener una buena estimación de la amplitud promedio de las sIPSCs debido a una baja frecuencia de eventos

(número de sIPSCs <5 durante cada protocolo de 100 repeticiones). Las sIPSCs fueron registradas durante los protocolos de estimulación. En trabajos previos realizados en esta preparación de cóclea se demostró la consistencia entre ambos métodos para la evaluación del m (Goutman et al., 2005; Ballesterero et al., 2011).

3.8. Evaluación del efecto de drogas y toxinas sobre la liberación evocada del neurotransmisor

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. En los casos en que la liberación de ACh se evocó eléctricamente se estimó el m antes y después de la adición de la droga a intervalos regulares de tiempo. En todos los casos en que se incubaron drogas o toxinas, se realizó un sólo experimento por ratón, pasando a una nueva preparación para cada repetición.

3.9. Estimación de la plasticidad sináptica de corto término

El patrón de plasticidad sináptica de corto término (STP) fue evaluado aplicando 10-80 repeticiones de trenes de estimulación de 10 o 20 pulsos a 10, 40 y 100 Hz, a intervalos de 15 (en los trenes a 10 Hz) o 20 segundos (en los trenes a 40 y 100 Hz). Para cada pulso, la amplitud de la corriente fue computada como la diferencia entre el pico de la respuesta y la línea de base, la cual fue considerada como el valor de corriente antes del pulso de estimulación. La probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) para cada pulso fue computado como la relación entre el número de eIPSCs y el número de repeticiones del protocolo. La amplitud promedio (A) se obtuvo promediando las amplitudes de los eIPSCs luego de cada pulso, sin incluir las fallas de liberación. La amplitud total (S) para cada estímulo fue computada como el promedio de todas las amplitudes registradas, incluyendo las fallas de liberación. Para establecer el grado de facilitación o depresión durante un tren, los valores de los parámetros S , $P_{\text{éxito}}$ y A para cada pulso se compararon al valor del primer pulso.

3.10. Estimación del tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas y de su tasa de reciclado

El tamaño del RRP y de la tasa de reciclado fueron estimados por el método establecido por Schneggenburger y col. (Schneggenburger et al., 1999), basado en el uso de trenes de

estimulación de alta frecuencia para agotar la sinapsis y llegar a un estado estacionario donde sólo se liberan vesículas recicladas. Se aplicaron trenes de estimulación de 50 pulsos a 100 Hz, repetidos 10-30 veces a intervalos de 20 segundos. La amplitud acumulada promedio se graficó como función del número de estímulo y la región estacionaria se ajustó con una función lineal. La amplitud acumulada de las eIPSCs en el pulso i fue calculada de la siguiente manera:

$$A(i) = \sum_0^{x=i} \bar{A}(x)$$

Donde $\bar{A}(x)$ es la amplitud promedio de la IPSC evocada por el pulso x del tren. Para asegurarnos de que sólo la región estacionaria del diagrama había sido considerada, el ajuste lineal fue calculado en las amplitudes acumuladas de los últimos 20 pulsos del tren. En esta región, los diagramas de amplitudes acumuladas de todas las células registradas mostraban un comportamiento lineal. La ordenada al origen de este ajuste, dividida por el tamaño del cuánto (la amplitud promedio de las sIPSCs) representa el número de vesículas que estaban listas para ser liberadas al comienzo del tren. La pendiente de este ajuste, dividida por el tamaño del cuánto y multiplicada por la frecuencia de estimulación corresponde a la tasa de reciclado expresada como vesículas por segundo. Para una discusión extensa de este método, sus ventajas y limitaciones y una comparación con otros métodos, ver (Neher, 2015).

3.11. 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 Igor Pro 6.0 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA). Los trazos representativos promedio de las corrientes sinápticas espontáneas fueron realizados con el programa Minianalysis 6.0.3 (Synaptosoft Inc, Fort Lee, NJ, USA), y los trazos promedio e individuales de las corrientes sinápticas evocadas fueron elaborados con Clampfit 10.2.0.14 (Molecular Devices, USA). El análisis estadístico fue realizado con RStudio 1.1.442. Antes de realizar los análisis, se evaluó la normalidad de los datos empleando el test de normalidad de Shapiro-Wilk, y de acuerdo con eso se aplicaron tests paramétricos o no paramétricos. Para los análisis estadísticos con dos sets de datos, se emplearon o un test de Student pareado a dos colas o un test de rangos signados de Wilcoxon a dos colas. Para comparar más de dos sets de datos pareados, se aplicaron o un ANOVA de una vía de medidas repetidas seguido de un test post-hoc de Tukey, o un test de Friedman seguido por un test post-hoc de Conover, o un ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por un test post-hoc de Bonferroni. Para comparar más de dos sets de datos no pareados, se utilizaron o un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey o un test de Kruskal-Wallis

seguido de un test post-hoc de Dunn. Los gráficos fueron elaborados con Prism 6.01 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

3.12. Drogas y Toxinas

Las soluciones stock de ω -Agatoxina IVA, ω -Conotoxina GVIA, SNX-482, iberiotoxina y (S)-3,5-Dihidroxifenilglicina (DHPG) fueron preparadas en agua destilada y almacenadas en alícuotas a -20°C . Las mismas fueron diluidas en la solución extracelular previo al uso. Las soluciones stock de las dihidropiridinas (Nifedipina y Bay-K 8644) 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. Todos los reactivos y la iberiotoxina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). La iberiotoxina también fue adquirida en Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido), junto a DHPG. El resto de las toxinas y drogas fueron adquiridas en Alomone Labs Ltd. (Jerusalén, Israel).

4. Resultados: Primera parte

4.1. En la sinapsis MOC-CCI la fuerza sináptica se incrementa durante el desarrollo postnatal

La sinapsis transitoria MOC-CCI atraviesa grandes cambios funcionales y moleculares durante el breve periodo (P0 a P13) comprendido entre su establecimiento y su desaparición (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Esto sugiere la existencia de cambios en las propiedades de la transmisión sináptica y en las moléculas involucradas en este proceso a lo largo de su desarrollo. Estudios preliminares de nuestro laboratorio indican que en la sinapsis MOC-CCI el contenido cuántico de la liberación evocada (m) aumenta durante el desarrollo postnatal entre los periodos P6-7 y P9-11 (Zorrilla de San Martín et al., ARO Abstracts, 2012). Prosiguiendo con este trabajo, evaluamos nuevamente el m en el periodo P6-7 a fin de aumentar el número de réplicas y extendimos la evaluación a P4. Para ello realizamos registros electrofisiológicos en las CCIs mediante la técnica de *whole-cell patch clamp* en el modo *voltaje-clamp* mientras se estimulaba eléctricamente a los axones MOC que las inervan. Cada estimación del m se hizo a partir de 100 estímulos consecutivos aplicados a una frecuencia de 1 Hz. Para P6-7 los resultados del presente trabajo fueron agrupados con los resultados previos de Zorrilla de San Martín et al., ARO Abstracts (2012), los datos correspondientes a P9-11 fueron tomados de Zorrilla de San Martín et al. (2010), se evaluó su ajuste a una distribución normal y fueron reanalizados y mostrados como comparación. El m aumentó de $0,20 \pm 0,02$ en P4, a $0,58 \pm 0,06$ en P6-7, a $1,12 \pm 0,11$ en P9-11 (P4 vs P6-7 $p = 0,0036$; P6-7 vs P9-11 $p = 7,40e^{-06}$; P4 vs P9-11 $p = 8,33e^{-04}$; $n = 18-24$ CCIs, 17-24 ratones, Figura 11a). El m estimado por el método de fallas en las mismas células fue semejante al obtenido por el método directo: P4 = $0,20 \pm 0,02$; P6-7 = $0,54 \pm 0,06$; P9-11 = $1,16 \pm 0,11$. Además, evaluamos la probabilidad de liberación $P_{\text{éxito}}$ en los distintos estadios, estimada como la probabilidad de que un estímulo evoque exitosamente una respuesta sináptica. El valor de $P_{\text{éxito}}$ se incrementó durante el desarrollo postnatal de $0,18 \pm 0,02$ en P4, a $0,40 \pm 0,03$ en P6-7, a $0,64 \pm 0,03$ en P9-11 (P4 vs P6-7 $p = 3,22e^{-05}$; P6-7 vs P9-11 $p = 2,20e^{-06}$; P4 vs P9-11 $p = 1,20e^{-06}$; $n = 18-24$ CCIs, 17-24 ratones; Figura 11b). En la Figura 11c se muestran registros representativos individuales y promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas (eIPSCs, del inglés *evoked inhibitory postsynaptic currents*) en los tres estadios bajo estudio. Estos resultados demuestran que la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI se fortalece durante el desarrollo postnatal.

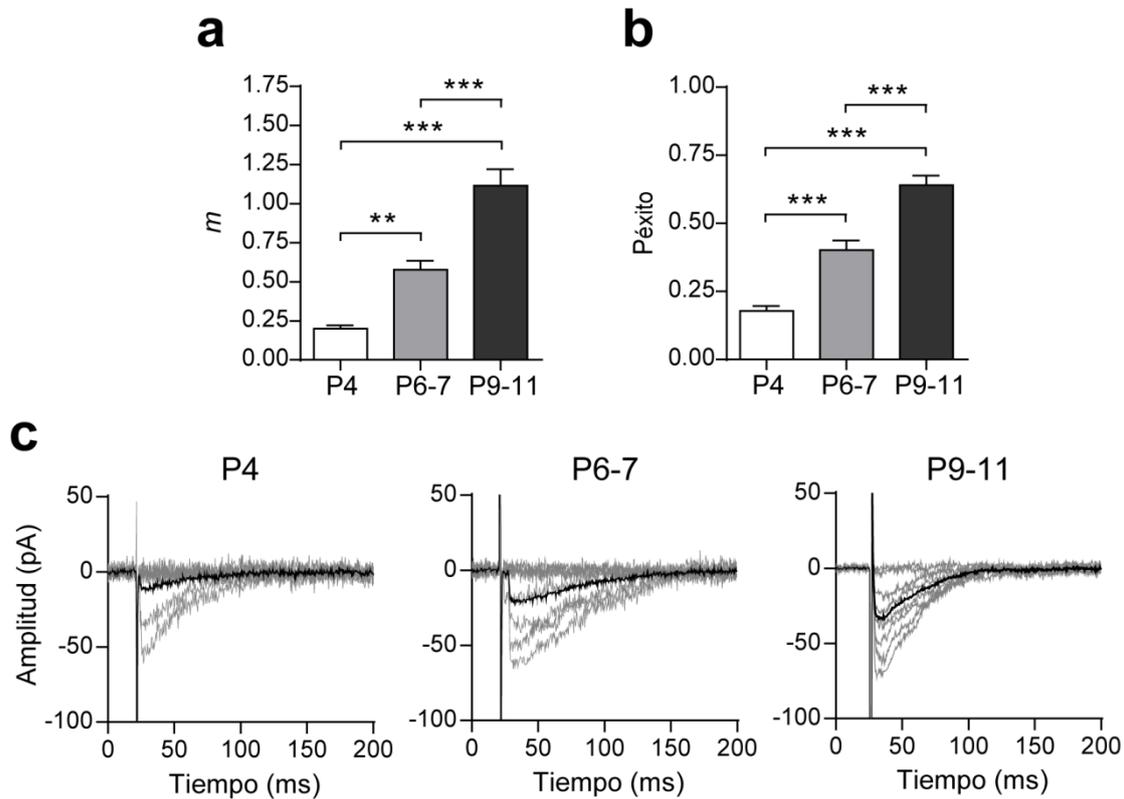


Figura 11. En la sinapsis MOC-CCI la fuerza sináptica se incrementa durante el desarrollo postnatal. a, El gráfico de barras muestra el incremento en el m , evaluado por el método directo, en la sinapsis MOC-CCI desde P4 hasta P9-11. **b,** El gráfico de barras ilustra el aumento en la $P_{\text{éxito}}$ durante el mismo periodo que **a**. **c,** Trazos representativos individuales (en gris) y promedio (en negro) de eIPSCs registradas en CCI de ratones P4, P6-7 y P9-11. Las barras de error representan el SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Además, analizamos la amplitud y cinética de las corrientes inhibitorias postsinápticas espontáneas (sIPSCs, del inglés *spontaneous inhibitory postsynaptic currents*). Registros representativos individuales y promedio de las tres edades se muestran en la Figura 12a y b, respectivamente. No encontramos cambios significativos en la amplitud (P4 = $21,16 \pm 1,47$ pA; P6-7 = $20,06 \pm 0,81$ pA; P9-11 $20,62 \pm 1,34$ pA; $p = 0,9755$; $n = 20$ CCI, 18-20 ratones, 462-585 eventos, Figura 12b, c) ni en la cinética de las sIPSCs, evaluada en las mismas células (constante de decaimiento P4 = $30,90 \pm 1,62$ ms, P6-7 = $34,50 \pm 2,39$ ms, P9-11 = $31,58 \pm 1,95$ ms; $p = 0,41$; Figura 12b, d) entre las distintas edades. Las corrientes sinápticas espontáneas se originan por la liberación esporádica de un cuanto del neurotransmisor (Fatt y Katz, 1952), y serían producto de la apertura estocástica de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentes en el terminal sináptico (Ermolyuk et al., 2013). De esta forma, la ausencia de

cambios en la amplitud de las sIPSCs en los distintos estadios del desarrollo analizados indica que el tamaño del cuanto permanece constante durante este periodo.

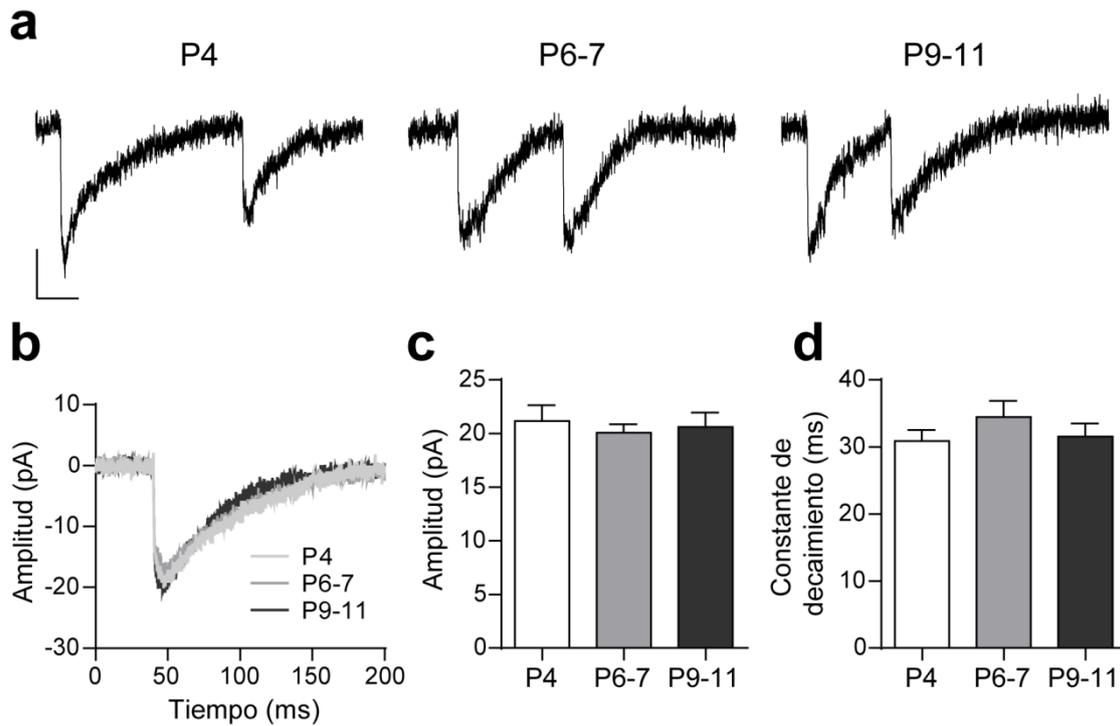


Figura 12. Las propiedades biofísicas de las sIPSCs se conservan durante el desarrollo postnatal. a, Trazos representativos de sIPSCs registradas en CCIs P4, P6-7 y P9-11 (potencial de sostén: -90 mV). Escala vertical: 10 pA, escala horizontal: 50 ms. **b,** Trazos representativos promedio de sIPSCs registradas en una célula representativa de cada estadio bajo estudio, mostrando la similitud en la amplitud y la cinética de las corrientes entre las distintas edades (n sIPSCs: P4 = 23, P6-7 = 18, P9-11 = 27). **c y d,** Los gráficos de barra ilustran que no existen cambios en la amplitud (**c**) ni en el tiempo de decaimiento (**d**) durante la maduración de la sinapsis MOC-CCI. Las barras de error representan el SEM.

Además, analizamos la frecuencia a la cual ocurren las sIPSCs en P4, P6-7 y P9-11. En P4, de 4 células registradas durante 5-15 minutos, 3 no presentaron actividad sináptica espontánea mientras que la cuarta tenía una frecuencia de sIPSCs de 0,01 Hz. En P6-7 la frecuencia de sIPSCs fue de $0,02 \pm 0,01$ y en P9-11 se incrementó significativamente a $0,18 \pm 0,07$ ($n = 10-17$ CCIs, 8-17 ratones, $p = 0,0095$; Figura 13a y b). El incremento de la frecuencia de sIPSCs durante el desarrollo es congruente con el aumento en la liberación evocada observado en el mismo periodo.

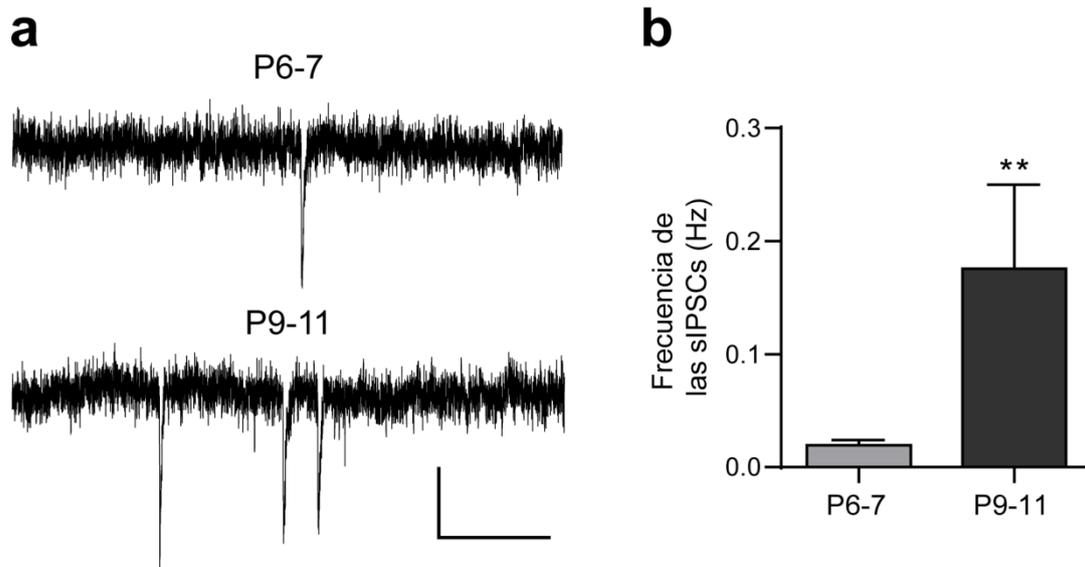


Figura 13. Cambios en la frecuencia de las sIPSC durante el desarrollo. a, Trazos representativos de sIPSCs registradas en CCI P6-7 (panel superior) y P9-11 (panel inferior) (potencial de sostén: -90 mV). Escala vertical: 10 pA, escala horizontal: 2 s. **b**, El gráfico de barras muestra el incremento significativo en la frecuencia de sIPSCs entre P6-7 y P9-11. Las barras de error representan el SEM. ** $p < 0,01$.

4.2. Cambios en el patrón de STP de la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal

La actividad de una sinapsis no es constante sino que se encuentra regulada por su historia previa. La plasticidad de corto término hace referencia a los cambios que ocurren en la fuerza sináptica como consecuencia de la actividad previa que duran desde decenas de milisegundos a algunos minutos. Cuando la fuerza sináptica disminuye este fenómeno se conoce como depresión y tiende a ocurrir en sinapsis con una alta probabilidad de liberación inicial. Por el contrario, al incremento de la fuerza sináptica se lo conoce como facilitación y tiende a ocurrir en sinapsis con una baja probabilidad de liberación inicial. La plasticidad neta observada en una sinapsis dada refleja la interacción entre las distintas formas de plasticidad (Fioravante y Regehr, 2011; Regehr, 2012).

En el sistema eferente auditivo de los vertebrados, se ha observado una baja probabilidad de liberación en reposo y facilitación de las respuestas sinápticas ante la aplicación de trenes de alta frecuencia de estimulación en la papila auditiva de las tortugas (Art et al., 1984), en la sinapsis transitoria MOC-CCI de ratas neonatales (Goutman et al., 2005) y en la sinapsis MOC-CCE del ratón al comienzo de la audición (Ballesteros et al., 2011). Considerando los cambios significativos en la fuerza sináptica encontrados en la sinapsis MOC-CCI entre P4, P6-7 y P9-11, examinamos si existían cambios en el patrón de STP durante estos estadios. Con este fin,

estudiamos el comportamiento de la sinapsis MOC-CCI ante trenes de estimulación de 10 pulsos a 10, 40 y 100 Hz. Analizamos la respuesta total (S), la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) y la amplitud promedio de las respuestas exitosas (A) para cada pulso. Un resumen de los resultados de los análisis estadísticos se muestra en la Tabla 2. Los valores normalizados de estos parámetros durante los trenes de estimulación se muestran en la Figura 14 (S en los paneles superiores, $P_{\text{éxito}}$ en los paneles centrales, A en los paneles inferiores). Los valores normalizados mayores a 1 indican facilitación mientras que valores menores a 1 indican depresión (del Castillo y Katz, 1954; Katz y Miledi, 1968; Goutman et al., 2005; Ballesteros et al., 2011). En ratones P4, las sinapsis presentaron facilitación en las tres frecuencias testeadas y a lo largo de todo el tren. El incremento en S se explica por un aumento en $P_{\text{éxito}}$ sin cambios en A (Figura 14, Tabla 2). Las sinapsis de los ratones P6-7 facilitaron en todas las frecuencias testeadas al comienzo del tren, llegando a un máximo en el cuarto pulso para luego disminuir hasta desaparecer (Figura 14, Tabla 2). Esto indica que hacia el final del tren los mecanismos que generan depresión logran compensar a aquellos que producen facilitación (Fioravante y Regehr, 2011). Nuevamente el incremento en S depende de un aumento en $P_{\text{éxito}}$ y además, a 100 Hz, de un incremento significativo en A. El incremento en A podría estar dado por la liberación de un número mayor de vesículas sinápticas. En las sinapsis de los ratones P9-11 se observó depresión en todas las frecuencias evaluadas, la cual se intensificó durante el transcurso del tren y con el aumento de la frecuencia de estimulación (Figura 14, Tabla 2). La disminución en S se explica por una reducción en $P_{\text{éxito}}$ a la que se suma a 100 Hz una disminución en A. Esta reducción significativa en A puede explicarse por una disminución en el número de vesículas liberadas o por un fenómeno postsináptico de saturación o desensibilización de los receptores (Chen et al., 2002; Scheuss et al., 2002). Sin embargo, la saturación y/o la desensibilización de los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ son improbables debido a que la aplicación continua de ACh 1 mM a las CCIs evoca corrientes $>0,5$ nA con una constante de tiempo de desensibilización de $13,8 \pm 0,5$ seg (Gómez-Casati et al., 2005), lo cual representa un intervalo de tiempo mucho mayor que la duración de los trenes aplicados.

Frecuencia	Edad	Parámetro	X_1 (Media \pm SEM)	$X_{\text{máx(mín)}}$ (Media \pm SEM)	p	# de pulso	n
10 Hz	P4	S	1,55 \pm 0,43	4,79 \pm 1,07	9,9e ⁻⁰⁶	7	13
		$P_{\text{éxito}}$	0,07 \pm 0,02	0,19 \pm 0,03	2,3e ⁻⁰⁵		
		A	21,88 \pm 2,17	21,58 \pm 3,27	0,9965		
	P6-7	S	8,31 \pm 1,05	16,44 \pm 2,47	3,6e ⁻⁰⁵	4	12

		P _{éxito}	0,43 ± 0,05	0,61 ± 0,06	0,0022		
		A	19,52 ± 0,84	26,24 ± 2,37	0,289		
	P9-11	S	24,18 ± 3,23	16,09 ± 2,86	7,6e ⁻⁰⁸	8	20
		P _{éxito}	0,72 ± 0,06	0,55 ± 0,07	2,6e ⁻⁰⁶		
		A	31,50 ± 2,25	25,32 ± 2,17	0,7289		
40 Hz	P4	S	2,92 ± 0,79	6,48 ± 1,91	0,00019	6	11
		P _{éxito}	0,13 ± 0,04	0,31 ± 0,07	0,00010		
		A	22,57 ± 2,53	19,48 ± 2,38	0,6703		
	P6-7	S	10,68 ± 1,35	19,20 ± 3,12	0,0055	4	11
		P _{éxito}	0,44 ± 0,04	0,64 ± 0,08	3,6e ⁻⁰⁵		
		A	23,45 ± 1,40	28,98 ± 1,71	0,4565		
	P9-11	S	28,61 ± 4,59	12,83 ± 1,66	5,0e ⁻¹⁴	10	13
		P _{éxito}	0,77 ± 0,05	0,57 ± 0,07	6,2e ⁻⁰⁸		
		A	34,82 ± 3,08	22,34 ± 1,36	0,0828		
100 Hz	P4	S	1,04 ± 0,21	3,49 ± 0,98	0,0054	6	11
		P _{éxito}	0,08 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,0004		
		A	12,65 ± 1,31	13,51 ± 1,43	0,3767		
	P6-7	S	12,59 ± 1,71	22,95 ± 2,39	3,8e ⁻⁰⁶	4	8
		P _{éxito}	0,53 ± 0,05	0,74 ± 0,05	8,0e ⁻⁰⁶		
		A	23,15 ± 1,05	30,77 ± 1,20	0,0014		
	P9-11	S	29,28 ± 4,01	8,23 ± 1,52	1,17e ⁻¹⁰	10	13
		P _{éxito}	0,81 ± 0,05	0,37 ± 0,06	5,6e ⁻¹⁵		
		A	34,78 ± 2,71	21,74 ± 1,40	0,0012		

Tabla 2. Parámetros de la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCI en distintos estadios del desarrollo postnatal. Se aplicaron trenes de estimulación de 10 pulsos a 10, 40 y 100 Hz en CCIs P4, P6-7 y P9-11. La respuesta total (S), la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación (P_{éxito}) y la amplitud promedio de las respuestas exitosas (A) fueron computadas para cada pulso. El valor correspondiente al primer pulso (X₁) y el valor máximo (en el caso de facilitación) o mínimo (en el caso de depresión) (X_{máx(mín)}) fueron computados para cada set de datos. Los valores de *p* corresponden a la significancia del ANOVA/test de Friedman cuando no se encontraron diferencias significativas, de lo contrario corresponden al valor de significancia del test *post-hoc* para el pulso señalado. Los valores de S y A están expresados en pA.

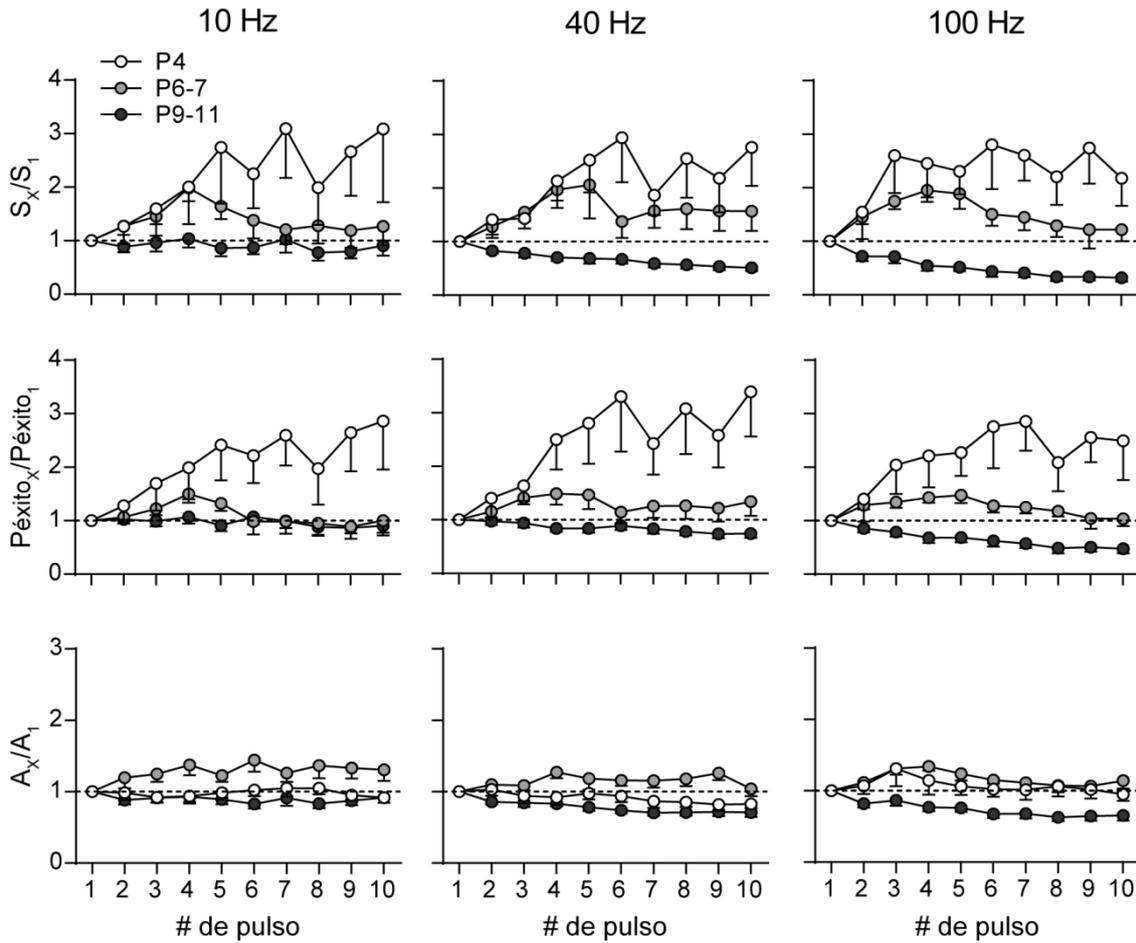


Figura 14. El patrón de STP de la sinapsis MOC-CCI cambia de facilitación a depresión durante el desarrollo postnatal. La respuesta total normalizada (S_x/S_1 , paneles superiores), la probabilidad normalizada de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}_x}/P_{\text{éxito}_1}$, paneles medios) y la amplitud normalizada de las respuestas exitosas (A_x/A_1 , paneles inferiores) fueron graficadas para cada pulso durante trenes de estimulación de 10 pulsos a 10, 40 y 100 Hz (paneles de izquierda a derecha) en CCIs P4 (círculos blancos), P6-7 (círculos gris claro) y P9-11 (círculos gris oscuro). Las barras de error representan el SEM.

4.3. El tamaño del *pool* de vesículas listas para ser liberadas y su tasa de reciclado se incrementan a lo largo del desarrollo postnatal

El contenido cuántico de la liberación del neurotransmisor (m) se encuentra determinado por el tamaño del RRP y por la probabilidad de liberación de cada vesícula sináptica ($P_{\text{vesicular}}$) (del Castillo y Katz, 1954). El RRP es una pequeña fracción del número total de vesículas presentes en un terminal sináptico que están disponibles para ser liberadas ante la llegada de un potencial

de acción, y es reabastecido a partir de un pool de vesículas en reciclaje (Alabi y Tsien, 2012; Kaeser y Regehr, 2017). Teniendo esto en cuenta, el incremento observado en el m durante el desarrollo postnatal podría deberse tanto a un incremento en el tamaño del RRP como en la $P_{\text{vesicular}}$. Con el fin de evaluar el tamaño del RRP en la sinapsis MOC-CCI a lo largo del desarrollo utilizamos el método descrito por Schneggenburger et al., 1999, basado en aplicar de trenes de estimulación de alta frecuencia hasta agotar las vesículas sinápticas, momento en el cual se llega a un estado estacionario donde sólo se liberan vesículas recicladas recientemente. Consecuentemente, aplicamos trenes de 50 pulsos a 100 Hz, de 10 a 30 repeticiones, en cada uno de los estadios bajo estudio (P4, P6-7 y P9-11). Ejemplos representativos de estos trenes se muestran en la Figura 15a-c. Se determinó la amplitud acumulada promedio para cada pulso de estimulación y los últimos 20 puntos del diagrama fueron ajustados a una función lineal. Diagramas representativos de la amplitud acumulada promedio en función del número de pulso de estimulación para cada periodo se muestran en las Figuras 15d-f. La ordenada al origen de la función lineal representa la amplitud del RRP, y al ser dividida por el tamaño promedio del cuanto para cada edad (amplitud promedio de las sIPSCs) se obtiene el tamaño del RRP (en número de vesículas sinápticas), mientras que la pendiente indica la tasa con la cual se reabastecen los sitios de liberación con vesículas nuevas (tasa de reciclado, en vesículas/seg) (Schneggenburger et al., 1999; Neher, 2015). El tamaño del RRP se incrementó de $1,04 \pm 0,28$ vesículas en P4, a $3,82 \pm 0,81$ vesículas en P6-7 a $6,46 \pm 1,12$ vesículas en P9-11; $n = 12-15$ CCIs, 7-10 ratones. Se encontraron diferencias significativas entre P4 y P6-7 ($p = 0,0093$) y entre P4 y P9-11 ($p = 2,5e^{-05}$), pero no entre P6-7 y P9-11 ($p = 0,1023$) (Figura 15h). La tasa de reciclado aumentó significativamente de $5,71 \pm 1,39$ vesículas/seg en P4, a $13,48 \pm 2,81$ vesículas/seg en P6-7 a $22,95 \pm 3,33$ vesículas/seg en P9-11 (P4 vs P6-7 $p = 0,0034$, P4 vs P9-11 $p = 2,4e^{-05}$, P6-7 vs P9-11 $p = 0,032$; Figura 15i).

La $P_{\text{vesicular}}$ puede estimarse a partir del m y del RRP mediante la siguiente relación: $P_{\text{vesicular}} = m/\text{RRP}$ (Schneggenburger et al., 1999; Valera et al., 2012). A partir de los datos obtenidos previamente, calculamos la $P_{\text{vesicular}}$ para cada célula. No encontramos diferencias significativas en la $P_{\text{vesicular}}$ promedio a lo largo del desarrollo (P4: $P_{\text{vesicular}} = 0,16 \pm 0,05$; P6-7: $P_{\text{vesicular}} = 0,18 \pm 0,03$; P9-11: $P_{\text{vesicular}} = 0,19 \pm 0,03$; $p = 0,825$; $n = 9-12$ CCIs, 7-8 ratones; Figura 15j). Estos resultados muestran que el incremento en el m observado durante el desarrollo postnatal se debe a un aumento concomitante en el tamaño del RRP y en su tasa de reciclado.

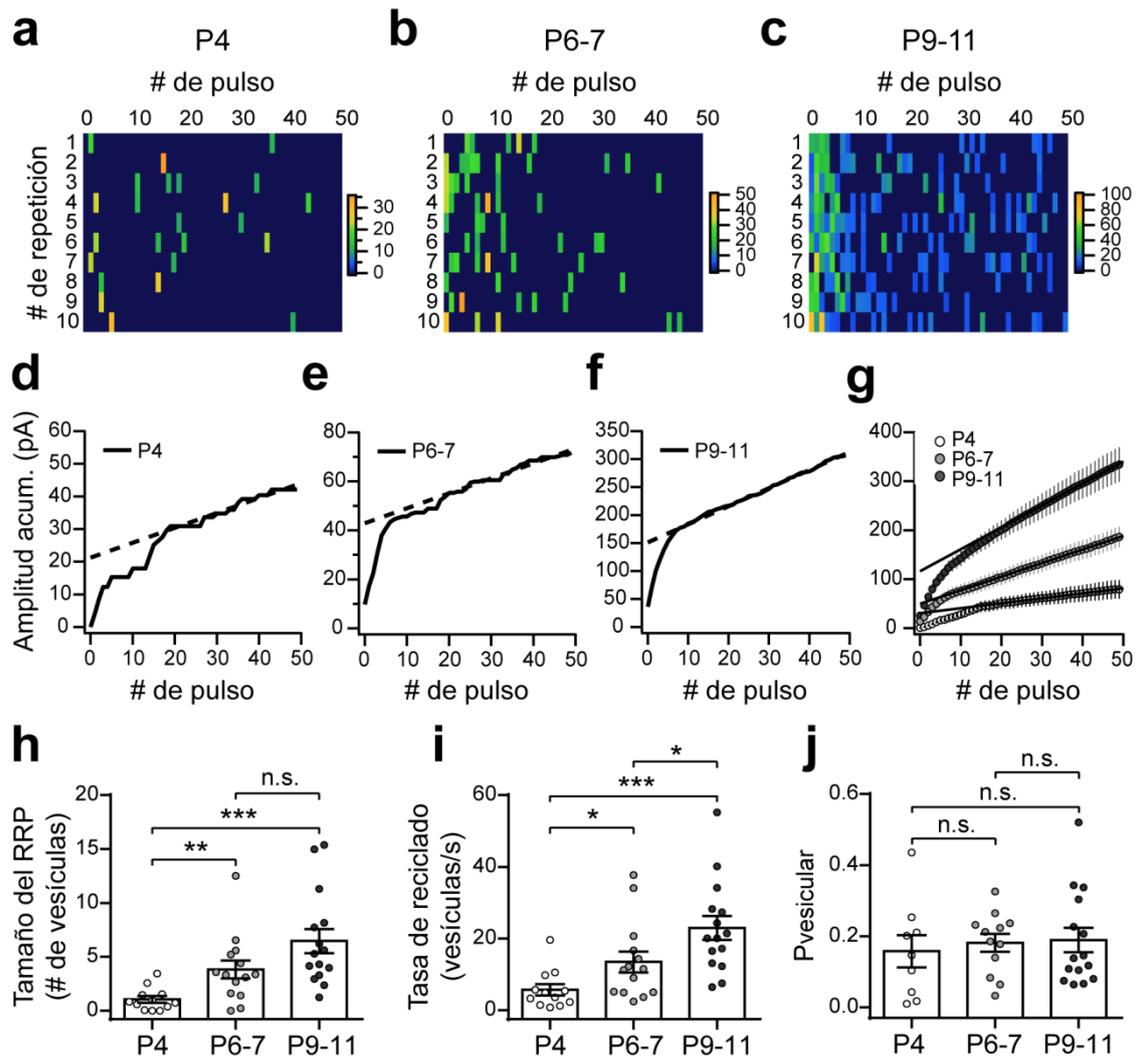


Figura 15. En la sinapsis MOC-CCI, el tamaño del RRP y su tasa de reciclado aumentan durante el desarrollo. **a, b, y c,** Ejemplos representativos de las respuestas evocadas por trenes de estimulación (50 pulsos a 100 Hz, 10 repeticiones) en P4, P6-7 y P9-11. Los colores de los rectángulos representan la amplitud de las eIPSCs y están expresados en pA. **d, e y f,** Ejemplos representativos de los diagramas de amplitud acumulada realizados para estimar el RRP y la tasa de reciclado (las líneas continuas son las amplitudes acumuladas y las líneas punteadas son los ajustes lineales de los últimos 20 puntos del diagrama). **g,** El diagrama de amplitud acumulada promedio para cada edad muestra el incremento en el RRP (la ordenada al origen) a medida que avanza el desarrollo (P4: blanco, P6-7: gris claro, P9-11: gris oscuro). **h, i y j,** Los diagramas ilustran el tamaño del RRP (en número de vesículas sinápticas) (**h**), la tasa de reciclado (en vesículas/seg) (**i**) y la $P_{vesicular}$ (**j**) promedio estimados en los estadios P4, P6-7 y P9-11, cada punto representa el valor correspondiente a una célula. Las barras de error representan el SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4. Canales iónicos que intervienen en la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal

4.4.1. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que participan en la liberación de ACh en distintos estadios del desarrollo postnatal

En diversas sinapsis centrales de los mamíferos y también en la placa neuromuscular, se han descrito cambios en los tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDVs) que contribuyen a la liberación del neurotransmisor durante la maduración postnatal (Takahashi y Momiyama, 1993; Rosato Siri y Uchitel, 1999; Iwasaki et al., 2000; Fedchyshyn y Wang, 2005). Estos cambios madurativos darían lugar al fortalecimiento de la transmisión sináptica (Fedchyshyn y Wang, 2005; Takahashi, 2015). Estudios previos en nuestro laboratorio indican que en P9-11 la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI se encuentra mediada por los CCDVs de tipo P/Q y N (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Considerando los cambios importantes hallados en la fuerza sináptica y en el patrón de STP durante el desarrollo, nos propusimos investigar si los tipos de CCDVs que intervienen en el proceso de liberación en la sinapsis MOC-CCI también sufren modificaciones. Resultados preliminares en P6-7 muestran que la liberación de ACh estaría mediada parcialmente por los CCDVs de tipo P/Q y que los CCDVs de tipo N no estarían involucrados (Zorrilla de San Martín, ARO Abstracts, 2012). Prosiguiendo con este trabajo, incrementamos el número de réplicas en los experimentos realizados en P6-7 y evaluamos si los CCDVs de tipo R, implicados en la liberación del neurotransmisor en algunas sinapsis rápidas (Wu et al., 1998; Gasparini et al., 2001), contribuyen a la liberación de ACh en este estadio y en P9-11. Además, extendimos este estudio a P4, en donde se desconoce completamente cuáles son los CCDVs que participan del proceso de transmisión sináptica. Para cumplir con estos objetivos, evaluamos el contenido cuántico de la liberación evocada en P4, P6-7 y P9-11 antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con ω -Agatoxina IVA 200 nM (ω -Aga), ω -Conotoxina GVIA 500 nM (ω -CgTx) y SNX-482 500 nM (SNX), antagonistas específicos de los CCDVs de tipo P/Q, N y R, respectivamente (Mintz et al., 1992b; Olivera et al., 1994; Newcomb et al., 1998; Bourinet et al., 2001). Los efectos de estos antagonistas sobre la liberación evocada del neurotransmisor en los tres estadios del desarrollo evaluados se ilustran en la Figura 16.

En P4 y P6-7, tanto ω -Aga como SNX redujeron significativamente el m (P4: $m_{\text{Control}} = 0,27 \pm 0,05$, $m_{\omega\text{-Aga}} = 0,08 \pm 0,03$, $p = 0,0029$; $m_{\text{Control}} = 0,26 \pm 0,07$, $m_{\text{SNX}} = 0,10 \pm 0,03$, $p = 0,0295$. P6-7: $m_{\text{Control}} = 0,44 \pm 0,07$, $m_{\omega\text{-Aga}} = 0,17 \pm 0,04$, $p = 0,0035$; $m_{\text{control}} = 1,22 \pm 0,32$, $m_{\text{SNX}} = 0,50$

$\pm 0,13$, $p = 0,0294$, $n = 5$ CCI, 5 ratones). Sin embargo, el antagonista de los CCDVs de tipo N (ω -CgTx) no tuvo efecto en ninguna de estas dos edades (P4: $m_{\text{Control}} = 0,46 \pm 0,25$, $m_{\omega\text{-CgTx}} = 0,40 \pm 0,13$, $p = 0,6557$. P6-7: $m_{\text{control}} = 0,46 \pm 0,09$, $m_{\omega\text{-CgTx}} = 0,44 \pm 0,05$, $p = 0,597$, $n = 3$ -5 CCI, 3-5 ratones). En P9-11, tanto el antagonista de los CCDVs de tipo P/Q como el de tipo N redujeron significativamente la liberación evocada (Nota: los datos para estas toxinas en esta edad fueron tomados de Zorrilla de San Martín y col. (2010), y fueron reanalizados luego de evaluar su distribución normal y se muestran como comparación; $m_{\text{control}} = 0,86 \pm 0,31$, $m_{\omega\text{-Aga}} = 0,30 \pm 0,07$, $p = 0,0313$; $m_{\text{control}} = 0,62 \pm 0,12$, $m_{\omega\text{-CgTx}} = 0,35 \pm 0,16$, $p = 0,014$, $n = 5$ -6 CCI, 5-6 ratones). En este estadio, la aplicación del antagonista de los CCDVs del tipo R (SNX) no tuvo un efecto significativo sobre la liberación evocada de ACh ($m_{\text{control}} = 0,42 \pm 0,14$, $m_{\text{SNX}} = 0,25 \pm 0,07$; $n = 6$ CCI, 6 ratones, $p = 0,1563$). Estos resultados demuestran que hay un cambio en los tipos de CCDVs que participan de la liberación del neurotransmisor en el breve periodo en el cual la sinapsis MOC-CCI es funcional. En un periodo temprano (P4-7), los CCDVs de tipo N no participan de la liberación evocada de ACh, que es mediada por los CCDVs de tipo P/Q y R. Más tardíamente, en P9-11, los CCDVs de tipo P/Q y N contribuyen al proceso de liberación (Zorrilla de San Martín et al., 2010), mientras que los CCDVs de tipo R dejan de participar del mismo.

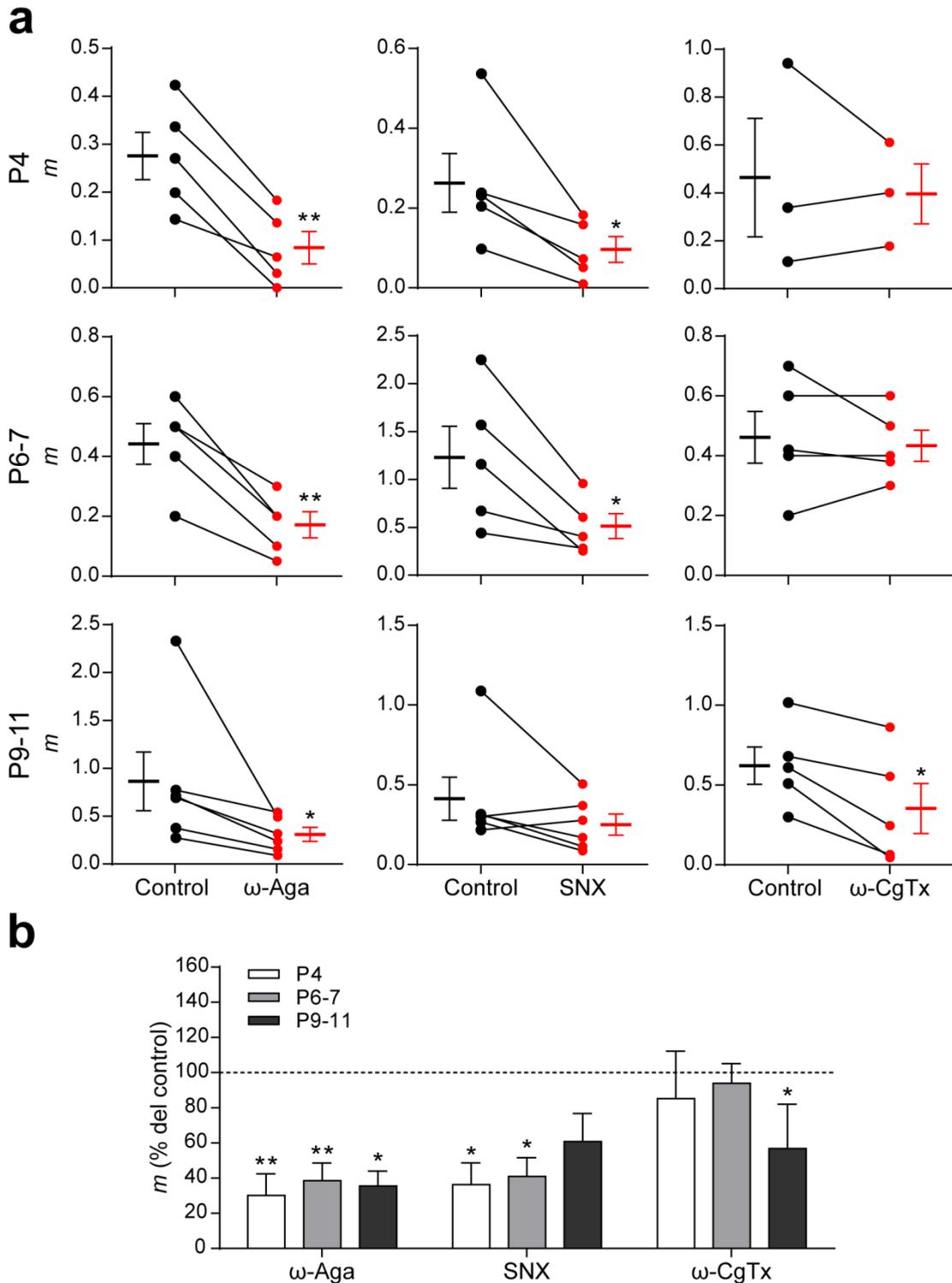


Figura 16. Diferentes tipos de CCDVs contribuyen a la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI a lo largo del desarrollo. a, Los gráficos muestran los valores de m de células individuales y promedio antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con ω -Agatoxina IVA 200 nM (ω -Aga), SNX-482 500 nM (SNX) y ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx), antagonistas específicos de los CCDVs de tipo P/Q, R y N, respectivamente, en P4, P6-7 y P9-11. **b,** Gráfico de barras resumen mostrando el efecto sobre el m de ω -Aga 200 nM, SNX 500 nM y ω -CgTx 500 nM (como % del control) en los diferentes

estadios evaluados. Es importante notar que los CCDVs de tipo R sólo contribuyen a la liberación de ACh en estadios tempranos del desarrollo (P4 y P6-7), mientras que los CCDVs de tipo N comienzan a participar en este proceso en una etapa más tardía (P9-11) (ω -Aga *m%* del control: P4 = 30,17 \pm 12,30, P6-7 = 38,64 \pm 9,91, P9-11 = 35,47 \pm 8,60; SNX *m%* del control: P4 = 36,32 \pm 12,47, P6-7 = 41,04 \pm 10,68, P9-11 = 60,88 \pm 15,89; ω -CgTx *m%* del control: P4 = 85,32 \pm 26,92; P6-7 = 93,97 \pm 11,19; P9-11 = 56,92 \pm 25,14). Las barras de error representan el SEM. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

4.4.2. El rol de los CCDVs del tipo L sobre la liberación del neurotransmisor cambia durante el desarrollo postnatal

Los CCDVs de tipo L están involucrados en la secreción hormonal (Artalejo et al., 1994; Yang y Berggren, 2006) y en la liberación graduada del neurotransmisor en las sinapsis en cinta (Kollmar et al., 1997; Barnes y Kelly, 2002), sin embargo, no intervienen en la liberación del neurotransmisor en las sinapsis rápidas en condiciones normales (Stanley y Atrakchi, 1990; Catterall, 2011). No obstante, se ha observado su participación en este proceso en la placa neuromuscular durante la reinervación (Katz et al., 1996) y el desarrollo postnatal (Sugiura y Ko, 1997; Rosato Siri y Uchitel, 1999). Por otra parte, estos canales están involucrados en la regulación de la transmisión sináptica a través de la activación de conductancias de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (Robitaille et al., 1993a; Marrion y Tavalin, 1998; Prakriya y Lingle, 1999; Hu et al., 2001; Berkefeld et al., 2006; Wang, 2008; Indriati et al., 2013) o mediante la activación de cascadas de segundos mensajeros que regulan la entrada de Ca²⁺ al terminal sináptico (Sugiura y Ko, 1997; Jensen et al., 1999). Los CCDVs de tipo L son sensibles a concentraciones micromolares de dihidropiridinas (DHPs), las cuales pueden modular su actividad positivamente (Bay-K 8644) o negativamente (Nifedipina, Nitrendipina) (Brown et al., 1984; Hess et al., 1984; Doering y Zamponi, 2003; Catterall y Few, 2008). En un trabajo previo en nuestro laboratorio, la incubación de preparaciones de cóclea de ratones P9-11 con el antagonista de los CCDVs de tipo L Nifedipina 3 μ M incrementa la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI, mientras que la aplicación del agonista Bay-K 8644 10 μ M la reduce. Esto se explica debido a que la entrada de Ca²⁺ a través de estos canales produce la activación de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y de voltaje de tipo BK (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Sorprendentemente, resultados preliminares en P6-7 sugieren que tanto la aplicación de Nifedipina como de Bay-K incrementan la liberación de ACh en este estadio (Zorrilla de San Martín et al., 2012).

Con el fin de estudiar el rol de los CCDVs de tipo L sobre la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI en estadios tempranos del desarrollo, completamos la evaluación del efecto

de Nifedipina 3 μ M (Nife) y de Bay-K 8644 (Bay-K) sobre el m en P6-7 y extendimos este estudio a P4. En ambas edades, tanto el agonista (Bay-K 10 μ M) como el antagonista (Nifedipina 3 μ M) provocaron un incremento significativo en el m (P4: $m_{\text{control}} = 0,12 \pm 0,04$, $m_{\text{Bay-K}} = 0,35 \pm 0,04$, $p = 0,0313$; $m_{\text{control}} = 0,29 \pm 0,08$, $m_{\text{nife}} = 0,51 \pm 0,12$, $p = 0,0078$; P6-7: $m_{\text{control}} = 0,73 \pm 0,13$, $m_{\text{Bay-K}} = 1,74 \pm 0,23$, $p = 0,0018$; $m_{\text{control}} = 0,72 \pm 0,15$, $m_{\text{nife}} = 1,70 \pm 0,27$, $p = 0,0043$; $n = 6-8$ CCIs, 6-8 ratones; Figura 17). Como hemos comentado anteriormente, en P9-11 la Nifedipina incrementa el m mientras que el Bay-K lo reduce (Nota: los datos para estas drogas en esta edad fueron tomados de Zorrilla de San Martín y col. (2010), y fueron reanalizados luego de evaluar su distribución normal; $m_{\text{control}} = 1,40 \pm 0,12$, $m_{\text{Bay-K}} = 0,73 \pm 0,14$, $p = 9,36e^{-05}$; $m_{\text{control}} = 1,54 \pm 0,19$, $m_{\text{nife}} = 3,20 \pm 0,70$, $p = 0,02007$; $n = 4-7$ CCIs, 4-7 ratones; Figura 17. El hecho de que tanto el agonista como el antagonista de los CCDVs de tipo L incrementen la liberación de ACh fue sorprendente y nos condujo a estudiar si los canales BK se encuentran modulando la liberación en estos estadios tempranos del desarrollo.

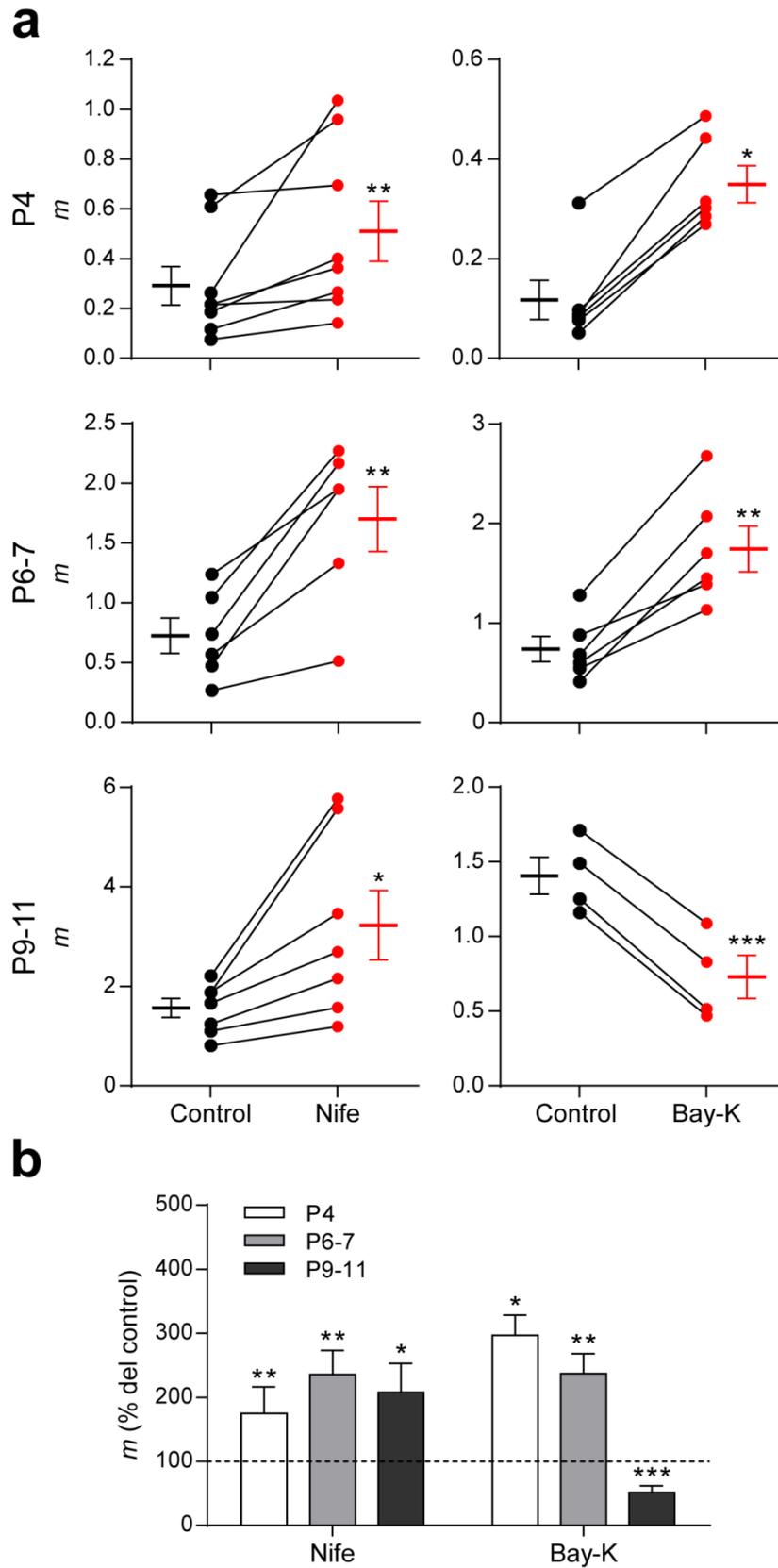


Figura 17. La modulación de la liberación del neurotransmisor por los CCDVs de tipo L en la sinapsis MOC-CCI cambia durante el desarrollo. a, Los gráficos muestran los valores de m de células

individuales y promedio antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con Nifedipina 3 μM (Nife) y (\pm)-Bay-K 8644 10 μM (Bay-K), un antagonista y un agonista específicos de los CCDVs de tipo L, respectivamente, en P4, P6-7 y P9-11. **b**, Gráfico de barras resumen mostrando el efecto sobre el m de Nife 3 μM y Bay-K 10 μM (como % del control) en los diferentes estadios evaluados (Nife $m\%$ del control: P4 = $175,13 \pm 41,26$; P6-7 = $235,47 \pm 37,74$; P9-11 = $207,69 \pm 45,13$; Bay-K $m\%$ del control: P4 = $297,02 \pm 31,54$; P6-7 = $237,13 \pm 31,18$; P9-11 = $51,74 \pm 10,33$). Las barras de error representan el SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.3. Los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI a lo largo de todo el desarrollo postnatal

En diversas sinapsis, la activación de canales BK presinápticos durante un potencial de acción acelera la fase de repolarización del mismo (Storm, 1987a; Shao et al., 1999; Goldberg y Wilson, 2005; Kimm et al., 2015; Gutzmann et al., 2019). Esto provoca un influjo de Ca^{2+} menor al terminal sináptico debido a la rápida desactivación de los CCDVs, reduciendo la liberación del neurotransmisor (Roberts et al., 1990; Robitaille et al., 1993a; Raffaelli et al., 2004; Grimes et al., 2009). Como hemos comentado anteriormente, en la sinapsis MOC-CCI de ratones P9-11 la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L activa a los canales BK modulando negativamente la liberación de ACh (Zorrilla de San Martín et al., 2010).

Para determinar si los canales BK regulan la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI en estadios más tempranos del desarrollo, evaluamos el efecto sobre el m del antagonista específico de los canales BK, Iberitoxina (Galvez et al., 1990), en P4 y P6-7. En estas edades, la incubación de las preparaciones de cóclea con Iberitoxina (IbTx) 100 nM produjo un incremento considerable y significativo en el m (P4: $m_{\text{control}} = 0,12 \pm 0,03$, $m_{\text{IbTx}} = 0,25 \pm 0,04$, $p = 0,0068$, Figura 18a y d. P6-7: $m_{\text{control}} = 1,34 \pm 0,19$, $m_{\text{IbTx}} = 2,65 \pm 0,44$, $p = 0,0018$, Figura 18b y d. P9-11: $m_{\text{control}} = 2,20 \pm 0,71$, $m_{\text{IbTx}} = 4,38 \pm 0,82$, $p = 0,0156$; $n = 7-12$ CCIs, 7-12 ratones; Figura 18c y d). Los datos de P9-11 fueron tomados de Zorrilla de San Martín et al. (2010), y fueron reanalizados luego de evaluar su distribución normal. Estos resultados demuestran que los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh desde P4 hasta P9-11.

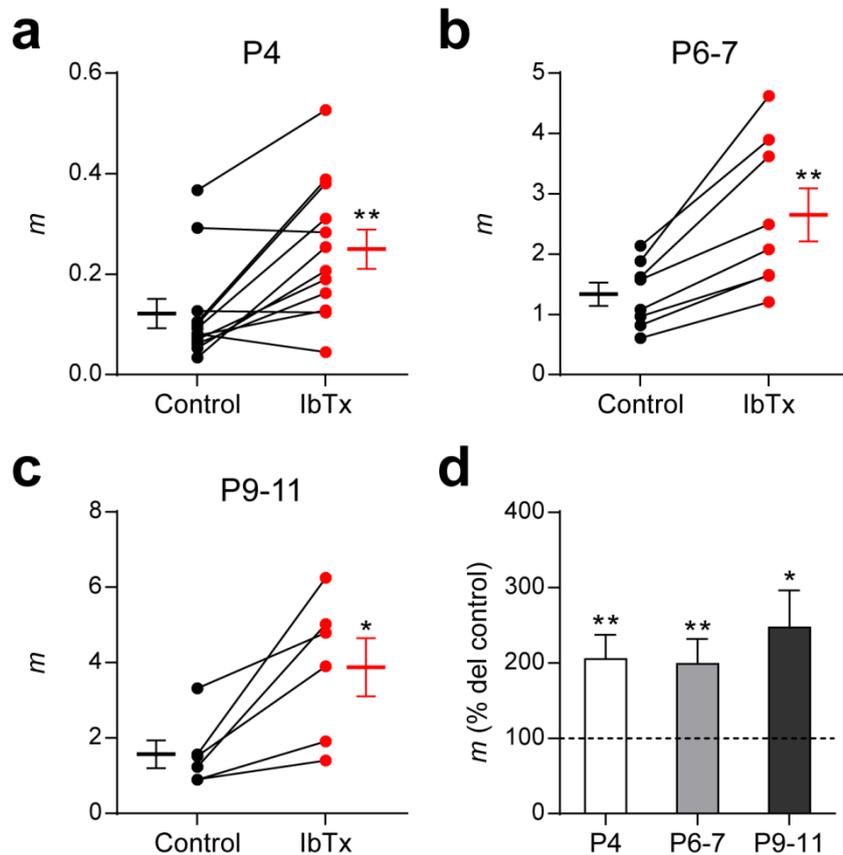


Figura 18. Los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI desde P4 hasta P9-11. **a, b y c,** Los gráficos muestran los valores de m de células individuales y promedio antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con IbTx 100 nM en P4, P6-7 y P9-11. **d,** Gráfico de barras resumen ilustrando el efecto sobre el m (como % del control) de IbTx 100 nM en los distintos estadios del desarrollo evaluados (IbTx $m\%$ del control: P4 = 204,92 ± 32,22; P6-7 = 198,55 ± 32,92; P9-11 = 247,03 ± 49,03). Las barras de error representan el SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.4. En estadios tempranos del desarrollo postnatal los CCDVs del tipo L presentan un rol dual en la liberación del neurotransmisor

Como se mostró más arriba, tanto la aplicación de un agonista como la de un antagonista específicos de los CCDVs de tipo L incrementan la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI en los estadios P4 y P6-7. En P9-11 la incubación con el agonista de estos canales disminuye la liberación mientras que la incubación con el antagonista la aumenta, debido a su acoplamiento funcional con los canales BK (Zorrilla de San Martín et al., 2010). En la placa neuromuscular de la rana el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo N media por un lado la liberación de ACh y, por otra parte, activa a los canales BK acotando la liberación (Robitaille et al., 1993a). Es posible que en estadios tempranos del desarrollo postnatal de la sinapsis MOC-CCI los

CCDVs de tipo L también jueguen un rol dual sobre la transmisión sináptica. Para poner a prueba esta hipótesis evaluamos en ratones P4 y P6-7 el efecto sobre el m del Bay-K 10 μM , un agonista de los CCDVs de tipo L, luego de prebloquear los canales BK con IbTx 100 nM. En ausencia de canales BK funcionales, la aplicación de Bay-K incrementó el m en ambos estadios (P4: $m_{\text{Control}} = 0,25 \pm 0,19$, $m_{\text{IbTx}} = 0,45 \pm 0,22$, $m_{\text{IbTx+Bay-K}} = 0,79 \pm 0,34$, control vs IbTx $p = 0,0021$, IbTx vs IbTx + Bay-K $p = 0,0021$, control vs IbTx + Bay-K $p = 1,9e^{-05}$; P6-7: $m_{\text{Control}} = 1,16 \pm 0,28$, $m_{\text{IbTx}} = 2,27 \pm 0,67$, $m_{\text{IbTx+Bay-K}} = 3,31 \pm 0,78$, control vs IbTx $p = 0,0248$, IbTx vs IbTx + Bay-K $p = 0,041$, control vs IbTx + Bay-K $p = 9,88e^{-07}$; $n = 5$ CCI, 5 ratones; Figura 19a). En P9-11, el tratamiento de las preparaciones de cóclea con Bay-K 10 μM luego de prebloquear los canales BK con IbTx 100 nM no había producido cambios ulteriores en el m ($m_{\text{Control}} = 1,19 \pm 0,29$, $m_{\text{IbTx}} = 2,63 \pm 0,82$, $m_{\text{IbTx+Bay-K}} = 2,54 \pm 0,63$, control vs IbTx $p = 0,0107$, IbTx vs IbTx + Bay-K $p = 0,9809$, control vs IbTx + Bay-K $p = 0,0189$, $n = 6$ CCI, 6 ratones Figura 19a; datos extraídos de Zorrilla de San Martín et al. (2010) y reanalizados), indicando que los CCDVs de tipo L sólo actúan sobre la liberación evocada mediante la activación de los canales BK en dicho estadio. Por el contrario, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que en estadios tempranos del desarrollo (P4-7), el Ca^{2+} que ingresa al terminal sináptico a través de los CCDVs de tipo L alcanza a la maquinaria de liberación, contribuyendo a este proceso, además de producir una retroalimentación negativa mediante la activación de los canales BK.

Debido a que los efectos de las DHPs sobre la liberación de ACh fueron semejantes en P4 y en P6-7, y dada la baja proporción de CCI inervadas funcionalmente encontrada en P4, los siguientes experimentos sólo fueron realizados en P6-7. En este estadio, la aplicación de Nifedipina 3 μM , un antagonista de los CCDVs de tipo L, luego de prebloquear los canales BK con IbTx 100 nM no produjo cambios en el m ($m_{\text{Control}} = 1,32 \pm 0,34$, $m_{\text{IbTx}} = 2,60 \pm 0,67$, $m_{\text{IbTx+Nife}} = 2,60 \pm 0,62$, control vs IbTx $p = 6,82e^{-06}$, IbTx vs IbTx + Nife $p = 1$, control vs IbTx + Nife $p = 6,86e^{-06}$; $n = 4$ CCI, 4 ratones; Figura 19b). Este resultado se asemeja al obtenido en P9-11 bajo las mismas condiciones ($m_{\text{Control}} = 1,67 \pm 0,52$, $m_{\text{IbTx}} = 3,30 \pm 0,66$, $m_{\text{IbTx+Nife}} = 2,95 \pm 0,59$, control vs IbTx $p = 3,47e^{-04}$, IbTx vs IbTx + Nife $p = 0,6789$, control vs IbTx + Nife $p = 7,26e^{-03}$; $n = 5$ CCI, 5 ratones; Figura 19b; datos extraídos de Zorrilla de San Martín et al. (2010) y reanalizados) y no respalda la hipótesis de una contribución de los CCDVs de tipo L a la liberación evocada de ACh en los estadios tempranos del desarrollo.

En vista de las contradicciones entre los resultados, decidimos dilucidar el problema evaluando la contribución de los CCDVs de tipo L a la liberación de ACh luego de bloquear los canales BK y todos los CCDVs que participan de este proceso. Para ello, analizamos el efecto

sobre el m de Bay-K 10 μM en presencia de un cóctel conteniendo ω -Aga 200 nM, ω -CgTx 500 nM, SNX 500 nM e IbTx 100 nM, antagonistas de los CCDVs de tipo P/Q, N y R y de los canales BK, respectivamente. En estas condiciones, el tratamiento con Bay-K aún provoca un incremento significativo en la liberación evocada ($m_{\text{cóctel}} = 0,011 \pm 0,004$, $m_{\text{cóctel+Bay-K}} = 0,103 \pm 0,019$; $p = 0,0152$, $n = 4$ CCI, 4 ratones; Figura 19c). Esto confirma que en los estadios más tempranos del desarrollo, bajo determinadas condiciones, el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L puede alcanzar los sitios de liberación promoviendo la liberación de ACh. Además, estos resultados sugieren que los canales iónicos que participan y/o modulan la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI podrían encontrarse menos compartimentalizados en el terminal sináptico en estadios tempranos del desarrollo.

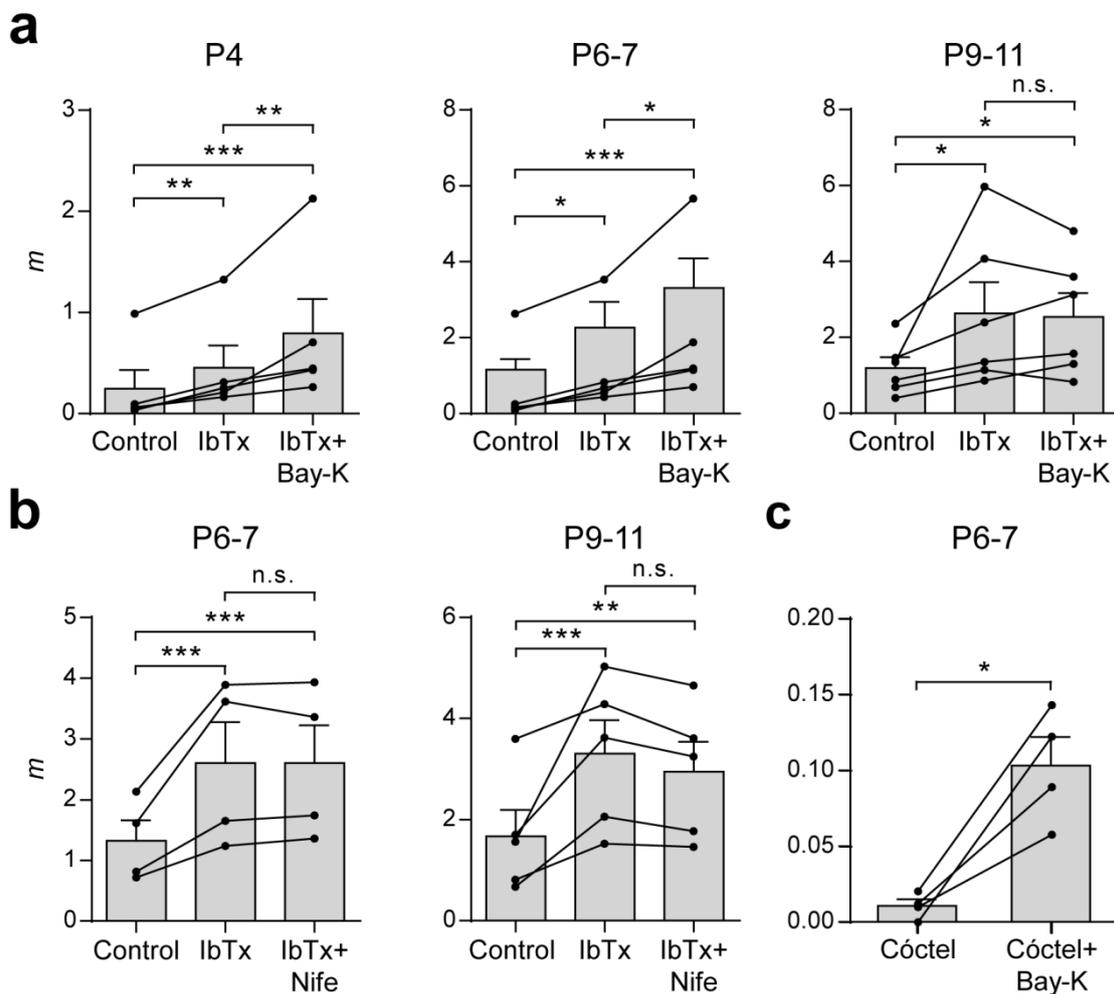


Figura 19. Los CCDVs de tipo L presentan un rol dual sobre la liberación de ACh en estadios tempranos del desarrollo. **a**, Los gráficos muestran los valores de m de células individuales y promedio para las condiciones control, con IbTx 100 nM y con IbTx 100 nM + Bay-K 10 μM , en P4, P6-7 y P9-11. **b**, Los gráficos muestran los valores de m de células individuales y promedio para las condiciones

control, con IbTx 100 nM y con IbTx 100 nM + Nife 3 μ M, en P6-7 y P9-11. **c**, El gráfico ilustra los valores de m de células individuales y promedio en presencia de un cóctel de toxinas compuesto por ω -Aga 200 nM, ω -CgTx 500 nM, SNX 500 nM e IbTx 100 nM, y luego del posterior tratamiento con Bay-K 10 μ M, en P6-7. Las barras de error representan el SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.5. El acople funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK se mantiene a lo largo del desarrollo postnatal

Bajo la consideración de que en los estadios iniciales de la maduración de la sinapsis MOC-CCI podría haber una menor compartimentalización de los componentes presinápticos, nos preguntamos si en este periodo temprano existen múltiples fuentes de Ca^{2+} que contribuyan a la activación de los canales BK. Con este fin, en P6-7 evaluamos el efecto de IbTx 100 nM sobre la liberación evocada luego de bloquear los CCDVs de tipo L con Nifedipina 3 μ M. La aplicación de IbTx 100 nM luego de preincubar las preparaciones de cóclea con Nifedipina 3 μ M no produjo cambios significativos en el m , al igual que lo previamente descrito en P9-11 (P6-7: $m_{Control} = 0,64 \pm 0,21$, $m_{Nife} = 1,44 \pm 0,34$, $m_{Nife+IbTx} = 1,70 \pm 0,39$, control vs Nife $p = 0,0039$, Nife vs Nife + IbTx $p = 0,8622$, control vs Nife + IbTx $p = 5,66e^{-05}$; P9-11: $m_{Control} = 1,34 \pm 0,13$, $m_{Nife} = 2,53 \pm 0,35$, $m_{Nife+IbTx} = 2,45 \pm 0,47$, control vs Nife $p = 0,0174$, Nife vs Nife + IbTx $p = 0,9809$, control vs Nife + IbTx $p = 0,0294$; $n = 4-5$ CCIs, 4-5 ratones; Figura 20; los datos de P9-11 fueron extraídos de Zorrilla de San Martín y col. (2010) y fueron graficados para su comparación). Estos resultados indican que en P6-7, de la misma manera que en P9-11, los canales BK son activados por el Ca^{2+} que ingresa al terminal sináptico a través de los CCDV del tipo L exclusivamente.

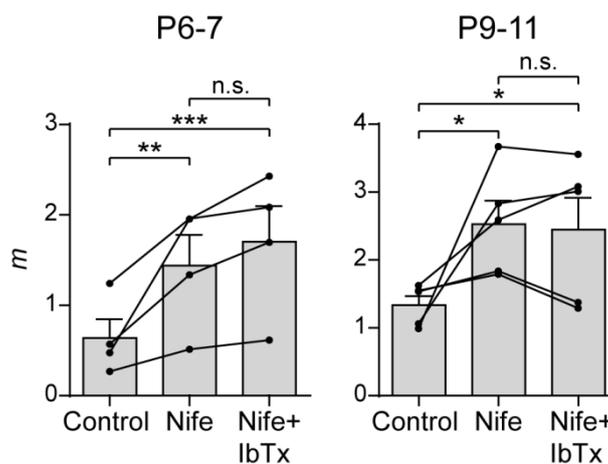


Figura 20. Los canales BK sólo son activados por el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L. Los gráficos muestran los valores de m de células individuales y promedio para las condiciones control,

con Nife 3 μM y con Nife 3 μM + IbTx 100 nM, en P6-7 y P9-11. Las barras de error representan el SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.6. Efecto de las DHP sobre la liberación evocada por alto K^+ extracelular

Para continuar investigando si las diferencias observadas en el efecto de las DHP sobre la liberación evocada eléctricamente en estadios tempranos del desarrollo (P4-7) en comparación a un estadio tardío (P9-11) se deben a una localización diferencial de los CCDV de tipo L con respecto al sitio donde se encuentra la maquinaria de liberación, decidimos evaluar los efectos de Nifedipina y Bay-K sobre la liberación evocada por alto K^+ extracelular en P6-7 y P9-11. En presencia de una solución extracelular con una alta concentración de K^+ los terminales sinápticos se despolarizan tónicamente, lo que da lugar a un incremento sostenido en la concentración de Ca^{2+} intracelular debido al aumento de la probabilidad de apertura de los CCDV (Heidelberger y Matthews, 1992; Angleson y Betz, 2001), con el consiguiente aumento en la frecuencia de las sIPSCs (Kojima y Takahashi, 1985; Momiyama y Takahashi, 1994; Angleson y Betz, 2001). Cabe aclarar que la despolarización tónica inactiva a los canales de Na^+ dependientes de voltaje, impidiendo el disparo de potenciales de acción (Hodgkin y Huxley, 1952). Es decir, este es un tipo de liberación mecanísticamente distinta, independiente del disparo de potenciales de acción (Elmqvist y Feldman, 1965; Shefner y Levy, 1981).

La Figura 21 ilustra los efectos de Bay-K (10 μM) y Nifedipina (3 μM) sobre la frecuencia de sIPSCs en presencia de alto K^+ extracelular (15 o 25 mM) en P6-7 (paneles superiores en a y b) y en P9-11 (paneles inferiores en a). En este tipo de liberación, el agonista de los CCDVs de tipo L Bay-K incrementó significativamente la frecuencia de sIPSCs en ambas edades (P6-7 frecuencia de sIPSC control $0,80 \pm 0,23$ Hz, frecuencia de sIPSC Bay-K $5,65 \pm 1,56$ Hz, $p = 0,0205$; P9-11 frecuencia de sIPSC control $2,25 \pm 1,19$ Hz, frecuencia de sIPSC Bay-K $5,98 \pm 1,93$ Hz, $p = 0,0313$; $n = 6-7$ CCI, 6-7 ratones) mientras que el antagonista Nifedipina la redujo significativamente en ambos estadios (P6-7 frecuencia de sIPSC control $2,69 \pm 0,90$ Hz, frecuencia de sIPSC Nifedipina $0,61 \pm 0,11$ Hz, $p = 0,0156$; P9-11 frecuencia de sIPSC control $3,42 \pm 1,74$ Hz, frecuencia de sIPSC Nifedipina $1,40 \pm 0,70$ Hz, $p = 0,0313$; $n = 6-7$ CCI, 6-7 ratones). Estos resultados sugieren que las diferencias encontradas en los efectos de Bay-K al evocar la liberación de ACh mediante estimulación eléctrica de las fibras MOC en P4 y P6-7 con respecto a P9-11 pueden estar relacionadas a cambios durante el desarrollo en la localización de los CCDVs de tipo L con respecto a la maquinaria de liberación.

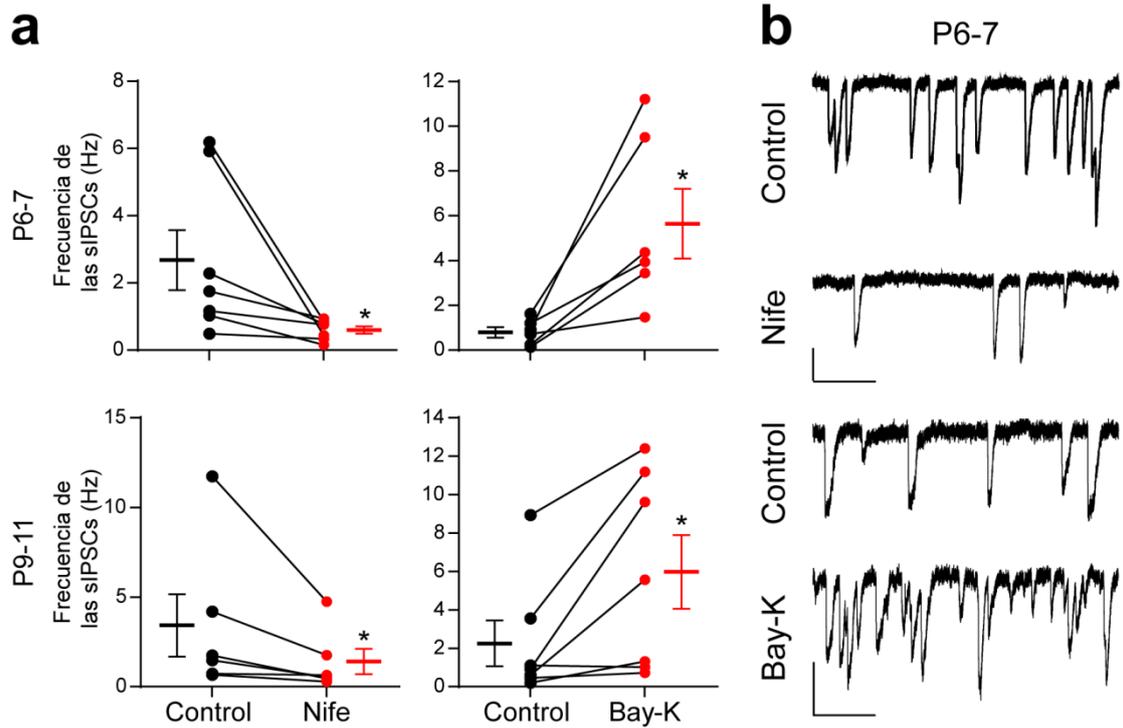


Figura 21. Efecto de las DHPs en la liberación de ACh evocada por K^+ en la sinapsis MOC-CCI. a, Los gráficos muestran los valores de frecuencia de las sIPSCs, expresados en Hz, de células individuales y promedio antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con Nife $3 \mu\text{M}$ y Bay-K $10 \mu\text{M}$ en P6-7 y P9-11. **b,** Trazos representativos registrados antes y después de la incubación con Nife $3 \mu\text{M}$ (paneles superiores) y con Bay-K $10 \mu\text{M}$ (paneles inferiores) en P6-7. Escalas verticales: 50 pA , escalas horizontales: 1 s . Las barras de error representan el SEM. $*p < 0,05$.

5. Discusión: Primera parte

La sinapsis MOC-CCI se establece durante los últimos días embrionarios, empieza a ser funcional en los primeros días luego del nacimiento y se retrae poco después del comienzo de la audición (día postnatal 12 en ratones) (Simmons, 2002; Roux et al., 2011). Durante este periodo la sensibilidad de las CCIs a la ACh cambia drásticamente incrementándose desde P0 hasta alcanzar un máximo en P7-9 y luego disminuyendo entre P10 y P14 hasta volverse indetectable luego de P16 (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Esta pérdida de sensibilidad a la ACh se correlaciona con una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 10$ y del canal SK2, que finalmente desaparecen de las CCIs (Katz et al., 2004), y con la retracción de los contactos axosomáticos a estas células (Simmons, 2002). Teniendo en cuenta estos cambios tan dramáticos en la postsinapsis durante el desarrollo postnatal previo al comienzo de la audición, postulamos que los mismos podrían estar acompañados por modificaciones en la presinapsis.

Los resultados obtenidos muestran que durante este periodo ocurren también importantes cambios en la presinapsis entre los estadios P4 y P9-11. Dentro de estos cambios, podemos mencionar un incremento en la fuerza sináptica, el cambio del patrón de STP de facilitación a depresión y una modificación en los tipos de CCDVs que contribuyen y/o modulan la transmisión sináptica.

5.1. En la sinapsis MOC-CCI la fuerza sináptica se incrementa durante el desarrollo postnatal

El contenido cuántico de la liberación evocada (m) en la sinapsis MOC-CCI se incrementó 5,6 veces en el periodo comprendido entre P4 y P9-11. Asimismo, durante este periodo observamos un aumento en la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) de aproximadamente 3,6 veces. Estos resultados dan cuenta de un incremento significativo en la fuerza sináptica en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal, paralelamente al incremento en la sensibilidad a la ACh aplicada de manera exógena (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Como hemos mencionado anteriormente, el m está determinado por el tamaño del RRP y por la probabilidad de liberación promedio de cada vesícula sináptica ($P_{\text{vesicular}}$) (del Castillo y Katz, 1954). Como discutiremos más adelante (sección 5.3), el incremento observado en el m durante el desarrollo está dado por un aumento concomitante en el tamaño del RRP sin cambios en la $P_{\text{vesicular}}$.

La amplitud y la cinética de las sIPSCs permanecieron constantes desde P4 hasta P9-11. Sin embargo, durante este periodo observamos un incremento significativo en la frecuencia de las

sIPSCs. La ausencia de cambios en la amplitud de las sIPSCs indica que durante el desarrollo el tamaño del cuanto permanece constante. Este hecho, sumado al incremento en el m y en la frecuencia de las sIPSCs, demuestra que el aumento en la fuerza sináptica es de naturaleza presináptica (del Castillo y Katz, 1954). Por otra parte, la constante de decaimiento de las sIPSCs está dominada por la cinética de cierre de los canales SK2 (Oliver et al., 2000), por lo cual la falta de cambios en este parámetro indica que el acoplamiento entre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y el canal SK2 es estable a lo largo del desarrollo, como había sido previamente descrito (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

5.2. La plasticidad de corto término cambia de facilitación a depresión entre P4 y P9-11

En numerosas sinapsis se ha observado que el patrón de plasticidad de corto término (STP) depende de la probabilidad de liberación inicial (Charlton y Bittner, 1978; Castro-Alamancos y Connors, 1997; Oleskevich et al., 2000; Foster et al., 2002). Las sinapsis con una alta probabilidad de liberación inicial suelen presentar depresión, mientras que las que tienen una baja probabilidad de liberación inicial tienden a facilitar (Fioravante y Regehr, 2011; Regehr, 2012). En la sinapsis MOC-CCI, los cambios en el contenido cuántico durante el desarrollo se vieron reflejados en el patrón de STP, que se transformó de facilitación en P4 a depresión en P9-11. Modificaciones en el patrón de STP durante el desarrollo han sido descritas en otros sistemas, entre ellos la corteza visual (Chen y Roper, 2004), la corteza somatosensorial (Frick et al., 2007), el cerebelo (Pouzat y Hestrin, 1997; Baur et al., 2015), el hipocampo (deKay et al., 2006; Speed y Dobrunz, 2008) y el cáliz de Held (Taschenberger y von Gersdorff, 2000; Iwasaki y Takahashi, 2001; Crins et al., 2011). Por otra parte, los cambios en la respuesta total (S) a lo largo de los trenes de estimulación se debieron a cambios en la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$), sin modificaciones en la amplitud promedio de las respuestas exitosas (A), con excepción de las respuestas registradas en P6-7 y P9-11 a 100 Hz. A esta frecuencia de estimulación, en P6-7 hubo un incremento significativo en el valor de A al inicio del tren, mientras que en P9-11 este parámetro se redujo significativamente hacia el final del tren, lo que podría deberse a un aumento y a una disminución en el número de vesículas sinápticas liberadas, respectivamente. La reducción del parámetro A en P9-11 también podría originarse por la saturación y/o por la desensibilización de los receptores postsinápticos (Chen et al., 2002; Scheuss et al., 2002), sin embargo, estos fenómenos pueden ser desestimados debido a que la perfusión continua de las CCIs con ACh 1 mM genera corrientes mayores a 0,5 nA que decaen con una constante de tiempo de aproximadamente 14 segundos (Gómez-Casati

et al., 2005), mientras que los trenes de estimulación empleados originan corrientes en el orden de las decenas de pA y tienen una duración máxima de 0,9 segundos, valores mucho menores que los anteriores. Lo anteriormente expuesto indica que los factores subyacentes a la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCI son de naturaleza presináptica.

Inicialmente, el fenómeno de facilitación había sido solamente atribuido al incremento en el Ca^{2+} residual en el terminal sináptico durante la actividad repetitiva (Mallart y Martin, 1967, 1968; Katz y Miledi, 1968). Sin embargo, en el cáliz de Held, la acumulación de Ca^{2+} en el terminal sináptico en sí misma no explicaba completamente la elevación en las respuestas sinápticas (Felmy et al., 2003). Por lo tanto, se ha propuesto además que un sensor de Ca^{2+} con una cinética lenta y una alta afinidad podría ser sensible al Ca^{2+} residual (Atluri y Regehr, 1996; Bertram et al., 1996). Las sinaptotagminas son sensores de Ca^{2+} que regulan la fusión de membranas en todos los tipos celulares. En las sinapsis, las sinaptotagminas-1, -2 y -9 son capaces de unir Ca^{2+} rápidamente y con baja afinidad, por lo que son responsables de mediar la liberación rápida del neurotransmisor (Südhof, 2012). Por el contrario, la sinaptotagmina-7 presenta una cinética lenta y una alta afinidad al Ca^{2+} (Sugita et al., 2001; Hui et al., 2005). Se ha reportado que la sinaptotagmina-7 es necesaria para la facilitación de corto término en varias sinapsis centrales (Jackman et al., 2016). Otro mecanismo propuesto de facilitación es la saturación de los buffers endógenos de Ca^{2+} , lo cual permitiría que una mayor concentración de este ion alcance los sitios de liberación con estímulos consecutivos (Fioravante y Regehr, 2011; Nanou y Catterall, 2018). Este mecanismo ha sido demostrado en sinapsis neocorticales con una alta concentración de la proteína calbindina D-28k (Blatow et al., 2003). En cuanto a los mecanismos que producen depresión, clásicamente se ha explicado como resultado de la liberación inicial de una alta proporción del RRP, que da lugar a que estímulos subsecuentes produzcan la liberación de un número menor de vesículas (Betz, 1970; Schneggenburger et al., 2002; Zucker y Regehr, 2002). Otra propuesta sostiene que la fusión de una vesícula en una zona activa puede inhibir la fusión subsiguiente de vesículas durante segundos (Betz, 1970; Dittman y Regehr, 1998; Neher y Sakaba, 2008), lo que estaría asociado al tiempo que lleva remover las proteínas de membrana vesiculares de la zona activa (Fioravante y Regehr, 2011). Por otra parte, los diferentes tipos de CCDVs tienen distintas propiedades biofísicas (Snutch et al., 2005; Li et al., 2007a), y pueden contribuir diferencialmente a la respuesta sináptica bajo distintas frecuencias de estimulación (Ricoy y Frerking, 2014). En particular, la corriente de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo P/Q puede ser facilitada o deprimida de acuerdo a su interacción con distintos tipos de proteínas regulatorias dependientes de Ca^{2+} (Nanou y Catterall, 2018). Además, el preARNm de las subunidades α de los CCDVs puede sufrir *splicing* alternativo, dando lugar a distintas isoformas de cada tipo de CCDV, que se diferencian por sus

propiedades biofísicas (Chemin et al., 2001; Lin et al., 2004; Thaler et al., 2004; Bock et al., 2011), farmacología (Bourinet et al., 1999) y modulación dependiente de Ca^{2+} (Chaudhuri et al., 2004; Bock et al., 2011) y por receptores acoplados a proteínas G (Raingo et al., 2007) (para una revisión completa del tema ver Lipscombe et al. (2013); Zamponi et al. (2015)). De acuerdo con esto, en neuronas piramidales del hipocampo se expresan dos isoformas de CCDVs de tipo P/Q mutuamente excluyentes, una da lugar a una fuerza sináptica baja con predominio de facilitación de corto término, mientras que la otra promueve una fuerza sináptica mayor con predominio de depresión (Thalhammer et al., 2017).

Varios de los mecanismos mencionados podrían subyacer al cambio en el patrón de STP observado durante el desarrollo en la sinapsis MOC-CCI, entre ellos, podría existir una disminución en la concentración de buffers de Ca^{2+} intracelulares o un cambio en la expresión de los tipos de CCDVs (o de sus isoformas) que median la liberación de ACh (ver sección 5.4.1), o de las proteínas que regulan la actividad de los CCDVs del tipo P/Q (presente a lo largo de todos los estadios analizados), o de la sinaptotagmina-7. Relacionado a este último punto, en el cáliz de Held se ha descrito que al principio del desarrollo postnatal la transmisión sináptica depende de la sinaptotagmina-1 y que luego es progresivamente reemplazada por la sinaptotagmina-2 (Kochubey et al., 2016). Esto podría incidir en la disminución en el nivel de depresión que manifiesta esta sinapsis a lo largo del desarrollo (Taschenberger y von Gersdorff, 2000). La situación inversa, es decir, el reemplazo de la sinaptotagmina-2 por la sinaptotagmina-1 podría conducir a un predominio de la depresión en la sinapsis MOC-CCI. Sin embargo, esto es poco probable dado que estudios de inmunohistoquímica han detectado la expresión de ambas isoformas de sinaptotagmina en los terminales eferentes a lo largo del periodo estudiado (Beurg et al., 2010). Por último, el agotamiento del RRP no contribuiría a la predominancia de la depresión a lo largo del desarrollo, ya que a lo largo de este periodo observamos un incremento en el tamaño del RRP y en su tasa de reciclado.

En la sinapsis MOC-CCI de la rata en el estadio P9-11 se ha reportado la presencia de facilitación ante la aplicación de trenes de estimulación de alta frecuencia (Goutman et al., 2005). Bajo las mismas condiciones, encontramos depresión en la sinapsis MOC-CCI del ratón. Considerando que el contenido cuántico en ambas sinapsis es similar (~ 1), es posible que otros factores den cuenta de las diferencias en el patrón de STP entre ambas especies. Entre ellos podemos mencionar diferencias en el RRP o en su tasa de reciclado, en el tipo de CCDVs que median la liberación de ACh, en la modulación por los CCDVs de tipo L acoplados a la activación de los canales BK (Zorrilla de San Martín et al., 2010) o en la modulación positiva que ejerce el óxido nítrico liberado desde la postsinapsis (Kong et al., 2013). Asimismo, podría haber diferencias en la modulación de la liberación de ACh por otros sistemas de

neurotransmisores como el GABA actuando sobre receptores presinápticos del tipo GABA_B (Wedemeyer et al., 2013) o por el glutamato actuando sobre receptores presinápticos del tipo mGluR1 (Ye et al., 2017).

5.3. El tamaño del RRP y su tasa de reciclado se incrementan durante el desarrollo postnatal

En el presente trabajo, estimamos el tamaño del RRP y su tasa de reciclado en la sinapsis MOC-CCI en tres estadios del desarrollo postnatal (P4, P6-7 y P9-11) siguiendo el método del agotamiento del terminal sináptico por trenes de alta frecuencia de estimulación descrito por Schneggenburger et al. (1999). Nuestros resultados indican que el tamaño del RRP y su tasa de reciclado se incrementan durante el periodo analizado. Cambios madurativos en el tamaño del RRP han sido observados en el cáliz de Held (Taschenberger y von Gersdorff, 2000; Iwasaki y Takahashi, 2001), en sinapsis de la corteza cerebelar (Baur et al., 2015) y en el hipocampo (Mozhayeva et al., 2002). Por otra parte, es importante tener en cuenta que el método de estimación del RRP utilizado es sensible a la saturación y a la desensibilización de los receptores postsinápticos (Neher, 2015; Kaeser y Regehr, 2017). Sin embargo, estos efectos pueden ser desestimados en nuestras condiciones experimentales (ver secciones 4.2 y 5.2). Además, estos fenómenos provocarían un aplanamiento en la fase lineal de la curva de amplitudes acumuladas y observamos una fase lineal claramente definida en todas las células registradas.

A partir de los datos estimados anteriormente, calculamos la $P_{\text{vesicular}}$ para cada célula. Notablemente, en P4, donde el número de vesículas disponibles para ser liberadas es de aproximadamente 1, la $P_{\text{vesicular}}$ promedio obtenida es semejante a la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) ($P_{\text{vesicular}} \sim 0,16$ y $P_{\text{éxito}} \sim 0,18$), lo cual apoya la validez de esta estimación. La $P_{\text{vesicular}}$ promedio no fue significativamente distinta entre los estadios estudiados, lo que indica que el incremento registrado en el m a lo largo del desarrollo se debe solamente al aumento en el tamaño del RRP. De acuerdo con esto, las magnitudes de aumento de ambos parámetros entre las edades estudiadas fueron semejantes (P6-7/P4: $m = 3,0$; tamaño del RRP = 3,6; P9-11/P6-7: $m = 2,0$; tamaño del RRP = 1,7; P9-11/P4: $m = 5,6$; tamaño del RRP = 6,2). En neuronas del hipocampo en cultivo se ha establecido una correlación positiva entre el contenido cuántico, el tamaño del RRP y el tamaño del terminal sináptico (Murthy et al., 2001). Es posible que los terminales MOC en contacto con las CCIs incrementen

su tamaño durante el desarrollo, como se ha descrito en la sinapsis MOC-CCE (Rohmann et al., 2015), y que esto dé lugar al aumento observado en el tamaño del RRP.

5.4. Canales iónicos que intervienen en la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal

5.4.1. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que participan en la liberación de ACh en distintos estadios del desarrollo postnatal

El incremento en la fuerza sináptica que se da durante el desarrollo postnatal se encuentra asociado muchas veces a un cambio en los CCDVs que mantienen la liberación del neurotransmisor (Takahashi, 2015). En etapas tempranas del desarrollo, múltiples tipos de CCDVs contribuyen al proceso de liberación, entre ellos los CCDVs de tipo R, N y P/Q. A medida que los animales maduran, los CCDVs de tipo R y N disminuyen su expresión y la liberación del neurotransmisor pasa a estar mediada únicamente por los CCDVs de tipo P/Q, como sucede en el cáliz de Held (Wu et al., 1998, 1999; Iwasaki y Takahashi, 2001), en la sinapsis inhibitoria entre las neuronas de Purkinje y los núcleos cerebelares profundos y en la sinapsis inhibitoria retículo-talámica (Iwasaki et al., 2000), en la sinapsis excitatoria entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje (Kusch et al., 2018) y en la placa neuromuscular (Rosato Siri y Uchitel, 1999).

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que la liberación del neurotransmisor en la sinapsis transitoria MOC-CCI en P9-11 está mediada por los CCDVs de tipo P/Q y N (Zorrilla de San Martín et al., 2010). En el presente trabajo mostramos que en los estadios iniciales del desarrollo (P4 y P6-7) la liberación de ACh depende del influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo P/Q y R, mientras que los CCDVs de tipo N no se encuentran involucrados. Más tardíamente, en P9-11, los CCDVs de tipo P/Q continúan mediando este proceso, mientras que la contribución de los CCDVs de tipo R es sustituida por la del tipo N. Curiosamente, y contrario a lo reportado en otras sinapsis durante el desarrollo los CCDVs de tipo N recién comienzan a contribuir a la liberación del neurotransmisor en el último estadio previo al comienzo de la audición. La participación de los CCDVs de tipo R en la liberación de ACh por las fibras MOC está de acuerdo con la detección de su transcripto en la cóclea mediante PCR (Green et al., 1996) y con estudios inmunohistoquímicos que muestran que la subunidad $\text{Cav}2.3$ (subunidad α de los CCDVs de tipo R) se expresa en las fibras MOC desde P2 hasta P14 (Waka et al., 2003). Además, analizando el transcriptoma se ha determinado la

expresión del $Ca_v2.1$ (CCDVs de tipo P/Q) en el oído interno de los mamíferos (Gabashvili et al., 2007).

En el cáliz de Held inmaduro se ha observado que los CCDVs de tipo P/Q contribuyen más eficientemente al proceso de transmisión sináptica que los CCDVs de tipo N y R debido a que estos últimos están localizados más lejos de los sitios de liberación (Wu et al., 1999). En la sinapsis MOC-CCI, el hecho de que la $P_{vesicular}$ se mantenga constante a lo largo del desarrollo podría estar relacionada con la participación de los CCDVs de tipo P/Q en la liberación a lo largo de todo este periodo, debido a que podrían estar situados más cerca de los sitios de liberación que los otros tipos de CCDVs, de tal forma de ser los contribuyentes principales a la fusión de las vesículas sinápticas. El cambio en los tipos de CCDVs que median la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI podría subyacer, al menos parcialmente, a la transformación en el patrón de STP observado durante el desarrollo. Los distintos tipos de CCDVs exhiben distintas propiedades biofísicas, en particular, se ha reportado que los CCDVs del tipo R presentan una cinética de activación e inactivación más lenta que los CCDVs de los tipos P/Q y N, lo cual determinaría que estos canales cumplan distintos roles en la transmisión sináptica (Li et al., 2007a). De acuerdo con esto, en las sinapsis entre las neuronas piramidales CA3 y CA1 en el hipocampo se ha observado que a baja frecuencia de estimulación la transmisión sináptica se encuentra principalmente mediada por los CCDVs de tipo P/Q y N, con una baja contribución de los CCDVs de tipo R. Sin embargo, a frecuencias de estimulación más altas la participación de los CCDVs de tipo R aumenta mientras que la de los CCDVs de tipo P/Q y N disminuye (Ricoy y Frerking, 2014). Por lo tanto, es posible que la sustitución de los CCDVs de tipo R por los N en el proceso de transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCI a lo largo del desarrollo postnatal sea determinante en el cambio del patrón de STP de facilitación a depresión.

5.4.2. El rol de los CCDVs de tipo L sobre la transmisión sináptica cambia durante el desarrollo postnatal

Los CCDVs de tipo L no contribuyen normalmente a la liberación del neurotransmisor en las sinapsis rápidas (Catterall, 2011). Sin embargo, en numerosas sinapsis regulan la transmisión sináptica a través de la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Robitaille et al., 1993a; Marrion y Tavalin, 1998; Prakriya y Lingle, 1999; Hu et al., 2001; Berkefeld et al., 2006; Wang, 2008; Indriati et al., 2013). En la sinapsis MOC-CCI en el estadio P9-11, la aplicación de Bay-K, un agonista específico de los CCDVs de tipo L que estabiliza el estado abierto del canal (Hess et al., 1984), disminuye la liberación de ACh mientras que el tratamiento con Nifedipina, un antagonista de dichos canales, la incrementa. Estos efectos se deben a que

los CCDVs de tipo L se encuentran acoplados funcionalmente a los canales de K^+ dependientes de voltaje y de Ca^{2+} del tipo BK (Zorrilla de San Martín et al., 2010). En el presente trabajo, analizamos si la modulación negativa que ejercen estos canales también se encuentra presente en estadios más tempranos del desarrollo postnatal. Sorprendentemente, en P4 y P6-7 tanto la incubación con Bay-K como con Nifedipina incrementaron el contenido cuántico. Por un lado, el incremento en la liberación obtenido con el antagonista sugiere que en estas edades también existe un acoplamiento funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK. Por otra parte, el aumento producido por el agonista indica que en estadios tempranos del desarrollo los CCDVs del tipo L podrían contribuir al proceso de transmisión sináptica. Para evaluar esta hipótesis decidimos estudiar el efecto de estas DHPs sobre la liberación de ACh en ausencia de canales BK funcionales. En presencia de Iberiotoxina, un bloqueante específico de los canales BK, la aplicación de Bay-K aumenta la liberación de ACh mientras que la Nifedipina no la modifica. Incluso en presencia de un cóctel con antagonistas específicos de los CCDVs de tipo P/Q, N y R y de los canales BK, que bloquea prácticamente de forma completa la transmisión sináptica, la incubación con Bay-K continúa incrementando el contenido cuántico. Estos resultados muestran que, bajo ciertas condiciones, en P4 y P6-7 el Ca^{2+} que ingresa al terminal sináptico por los CCDVs de tipo L puede alcanzar los sitios de liberación. De acuerdo con esto, en estudios de liberación evocada por K^+ en neuronas simpáticas del ganglio cervical y en neuronas serotoninérgicas de la corteza cerebral se ha descrito que la aplicación de antagonistas de los CCDVs de tipo L no modifica la liberación del neurotransmisor, mientras que el tratamiento con un agonista de estos canales la incrementa (Middlemiss y Spedding, 1985; Perney et al., 1986). En conclusión, en estadios tempranos del desarrollo los CCDVs del tipo L presentan un rol dual sobre la liberación de ACh. Este fenómeno ha sido observado en la placa neuromuscular de la rana, donde los CCDVs de tipo N por un lado intervienen en la liberación de ACh y por otro modulan negativamente este proceso mediante la activación de los canales BK (Robitaille et al., 1993a, 1993b).

El hecho de que los CCDVs de tipo L puedan contribuir a la liberación en estadios tempranos del desarrollo (P4 a P7) y no en los estadios más tardíos (P9-11) implica que en el primer caso estos canales tendrían que estar presentes en las cercanías de los sitios de liberación. Es posible que en los estadios iniciales exista una menor compartimentalización de los componentes presinápticos que regulan la transmisión sináptica. Una asociación más estrecha durante el desarrollo postnatal entre los elementos que intervienen en el proceso de liberación ha sido observada en el cáliz de Held (Fedchyshyn y Wang, 2005; Nakamura et al., 2015) y en la sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje (Baur et al., 2015). Es posible que el mismo fenómeno ocurra en los terminales MOC. Esto no entra en conflicto con el hecho de

que la $P_{vesicular}$ no varía durante el desarrollo dado que en el cáliz de Held el acercamiento entre los CCDVs y el sensor de Ca^{2+} que media la liberación rápida es concomitante con una disminución en la $P_{vesicular}$, la cual se produce por una reducción en la duración del potencial de acción y en el influjo de Ca^{2+} a lo largo del desarrollo (Taschenberger y von Gersdorff, 2000; Taschenberger et al., 2002), lo que demuestra que los cambios en los parámetros presinápticos son multifactoriales y difíciles de predecir. Se ha propuesto que el acercamiento entre los CCDVs y el sensor de Ca^{2+} que media la liberación rápida del neurotransmisor se debería a un cambio en las proteínas de andamiaje de la zona activa, las cuales determinan su posicionamiento (Böhme et al., 2018). En este sentido, en el cáliz de Held inmaduro la ablación genética de la proteína filamentosa Septina-5 permite un acoplamiento estrecho entre los mismos, característico de un estadio maduro (Yang et al., 2010). Asimismo, en la sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje se ha observado que al principio del desarrollo la liberación del neurotransmisor está mediada por CCDVs de tipo P/Q y N acoplados de forma laxa al sensor de Ca^{2+} y que posteriormente sólo contribuyen los CCDVs de tipo P/Q con un acoplamiento estrecho. Estos cambios se deben a que durante el desarrollo comienza a expresarse la proteína Munc13-3, que determina el acercamiento a los sitios de liberación de los CCDVs de tipo P/Q, pero no de los de tipo N (Kusch et al., 2018). En la sinapsis MOC-CCI podrían existir cambios semejantes en las proteínas de andamiaje en la zona activa que den lugar a un acercamiento de los CCDVs de tipo P/Q y N a la maquinaria de liberación y a un alejamiento de los CCDVs de tipo L.

5.4.3. Los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh desde P4 hasta P9-11

La activación de los canales BK acelera la fase de repolarización del potencial de acción (Storm, 1987a; Shao et al., 1999; Goldberg y Wilson, 2005; Kimm et al., 2015; Robles Gómez et al., 2018; Gutzmann et al., 2019), reduciendo así la cantidad de neurotransmisor liberado ante la llegada de un potencial de acción al terminal sináptico (Robitaille et al., 1993a; Raffaelli et al., 2004; Grimes et al., 2009; Robles Gómez et al., 2018). En la sinapsis MOC-CCI se ha demostrado que los canales BK modulan negativamente la liberación de ACh en el periodo P9-11 (Zorrilla de San Martín et al., 2010). En este trabajo demostramos que este mecanismo se encuentra presente desde P4 hasta P9-11.

La baja afinidad de los canales BK por el Ca^{2+} implica que sólo los canales situados en la vecindad inmediata de una fuente de Ca^{2+} pueden ser activados (Fakler y Adelman, 2008). De acuerdo con esto, en diversas sinapsis se ha observado que la corriente mediada por los canales BK es suprimida por el tratamiento con BAPTA, un quelante rápido de Ca^{2+} , pero no con

EGTA, un quelante lento (Lancaster y Nicoll, 1987; Storm, 1987b; Robitaille et al., 1993b; Edgerton y Reinhart, 2003; Müller et al., 2007). Los canales BK pueden estar asociados a cualquier tipo de CCDV (Robitaille et al., 1993b; Goldberg y Wilson, 2005; Grimes et al., 2009; Rehak et al., 2013; Gutzmann et al., 2019) y, en algunos casos, varios tipos de CCDVs pueden contribuir a su activación con distinta eficiencia (Prakriya y Lingle, 1999; Sun et al., 2003). En P9-11, la incubación de las preparaciones de cóclea con el antagonista de los canales BK, luego de prebloquear los CCDVs del tipo L no produce cambios en el contenido cuántico (Zorrilla de San Martín et al., 2010). La oclusión del efecto de la Iberiotoxina por el bloqueo de los CCDVs de tipo L indica que el influjo de Ca^{2+} para la activación de los canales BK proviene solamente de dichos canales. Considerando una posible menor compartimentalización de los componentes presinápticos en estadios tempranos del desarrollo, decidimos estudiar si en estas edades la activación de los canales BK se encuentra mediada sólo por los CCDVs de tipo L o si además participa alguno de los otros tipos de CCDVs presentes en el terminal sináptico. En P6-7, observamos que el bloqueo de los CCDVs de tipo L ocluye el posterior efecto de la Iberiotoxina, al igual que lo descrito en P9-11. Por ello, concluimos que a lo largo del desarrollo postnatal sólo el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L es capaz de activar a los canales BK.

En roedores altricios, las fibras MOC comienzan a contactar a las CCI entre P0 y P2. A partir de P5 existe una invasión simultánea de las CCI y las CCEs, y luego existe una pérdida progresiva de las sinapsis MOC-CCI, que desaparecen completamente luego del comienzo de la audición (alrededor de P12), con un aumento concomitante en los contactos MOC-CCE. En animales adultos, las fibras MOC inervan exclusivamente a las CCE (Simmons et al., 1996; Simmons, 2002). En la sinapsis MOC-CCE se han descrito cambios durante el desarrollo que recapitulan los observados en la sinapsis MOC-CCI. En particular, se demostró que los canales BK modulan negativamente la transmisión sináptica en dos estadios del desarrollo (P11-13 y P20-22) y que se encuentran acoplados funcionalmente a los CCDVs de tipo L. Para estudiar si existían cambios en dicho acoplamiento durante el desarrollo se utilizó el quelante lento de Ca^{2+} permeable a membrana EGTA-AM. La preincubación de las preparaciones de cóclea con EGTA-AM previno el efecto de IbTx en P11-13, pero no en P20-22 (Vattino et al., ARO Abstracts, 2018). Esto indica, en primer lugar, que en P11-13 existe un acoplamiento funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK más laxo que el presente en otras sinapsis y, en segundo lugar, que el mismo se vuelve más estrecho a lo largo del desarrollo. Dado el paralelismo encontrado en el desarrollo de ambas sinapsis, es muy probable que en la sinapsis MOC-CCI la asociación entre los CCDVs de tipo L y los canales BK se vuelva más cercana con

el transcurso del tiempo, lo cual estaría de acuerdo con un incremento gradual en la compartimentalización de los componentes presinápticos.

5.4.4. Efecto de las DHPs sobre la liberación evocada por alto K^+ extracelular

La liberación del neurotransmisor evocada por alto K^+ extracelular es producida por una elevación sostenida en la $[Ca^{2+}]_i$ resultante de la despolarización tónica de los terminales sinápticos (Heidelberger y Matthews, 1992; Angleson y Betz, 2001). En la sinapsis gabaérgica entre las neuronas de Purkinje y neuronas de los núcleos cerebelares profundos existen diferencias en los CCDVs que participan de la liberación evocada eléctricamente y la inducida por K^+ . Mientras que la primera está mediada por los CCDVs de tipo P/Q y N (Takahashi y Momiyama, 1993), la segunda depende de los CCDVs de tipo P/Q y L (Momiyama y Takahashi, 1994). Comparado con los CCDVs de tipo P/Q o L, los CCDVs de tipo N tienen una rápida cinética de inactivación (Mintz et al., 1992b), por lo que estarían inactivados durante la despolarización sostenida producida en presencia de alto K^+ extracelular. Los CCDVs de tipo L estarían presentes en el terminal sináptico pero alejados de los sitios de liberación, de tal forma que el Ca^{2+} que ingresa al terminal durante una despolarización breve, como la que ocurre durante un potencial de acción, no alcanzaría la maquinaria de liberación, mientras que durante una despolarización tónica sí lo haría (Momiyama y Takahashi, 1994). De acuerdo con esto, en experimentos de congelamiento y fractura en la placa neuromuscular de la rana se ha observado que en presencia de alto K^+ extracelular existe liberación del neurotransmisor desde sitios "ectópicos", por fuera de la zona activa (Ceccarelli et al., 1979; Ceccarelli y Fesce, 1988). Por otra parte, la liberación evocada por K^+ es independiente del disparo de potenciales de acción, debido a la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje durante una despolarización sostenida (Hodgkin y Huxley, 1952), por lo que no sería regulada por la actividad de los canales BK.

Con el objetivo de dilucidar si en la sinapsis MOC-CCI existe una menor compartimentalización de los componentes presinápticos al comienzo del desarrollo postnatal, en particular, si los CCDVs de tipo L varían su localización respecto de los sitios de liberación durante la maduración, decidimos estudiar en P6-7 y P9-11 el efecto de las DHPs en la liberación evocada por alto K^+ extracelular, que es independiente de la distancia entre los CCDVs y la maquinaria de liberación. Bajo estas condiciones, la aplicación del agonista de los CCDVs de tipo L incrementa la liberación de ACh en ambas edades, mientras que el tratamiento con el antagonista de dichos canales, la disminuye. Esto sugiere que el efecto diferencial del

Bay-K sobre la liberación evocada eléctricamente entre P4-7 y P9-11 se debería a que los CCDVs de tipo L se alejan de los sitios de liberación durante el desarrollo postnatal, y apoya nuestra hipótesis de una compartimentalización progresiva durante este periodo.

5.5. Significancia funcional de los cambios observados en la sinapsis transitoria MOC-CCI durante el desarrollo

Las CCIs neonatales disparan espontáneamente potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a), que se propagan a lo largo de la vía auditiva aferente (Tritsch et al., 2010). Se ha determinado que la modulación de esta actividad por parte de la sinapsis transitoria MOC-CCI es crucial para el correcto establecimiento de los mapas tonotópicos (Clause et al., 2014) y, por consiguiente, para la discriminación adecuada de frecuencias (Clause et al., 2017). Por otra parte, el patrón de disparo de las CCIs se modifica a lo largo del desarrollo, siendo más regular hacia el fin de la primera semana postnatal (Sendin et al., 2014). En este trabajo, hemos descrito que en la sinapsis transitoria MOC-CCI existen importantes modificaciones presinápticas durante el desarrollo, como el incremento en el tamaño y la tasa de reciclado del RRP y un cambio en los tipos de CCDVs que contribuyen o modulan la liberación de ACh (Figura 22), las cuales dan lugar a al aumento en la fuerza sináptica y al cambio en el patrón de STP. Es probable que estos cambios sean los causantes, al menos parcialmente, de la modificación del patrón de la actividad espontánea de las CCIs y, por lo tanto, sean imprescindibles para el correcto refinamiento de las conexiones sinápticas en la vía auditiva.

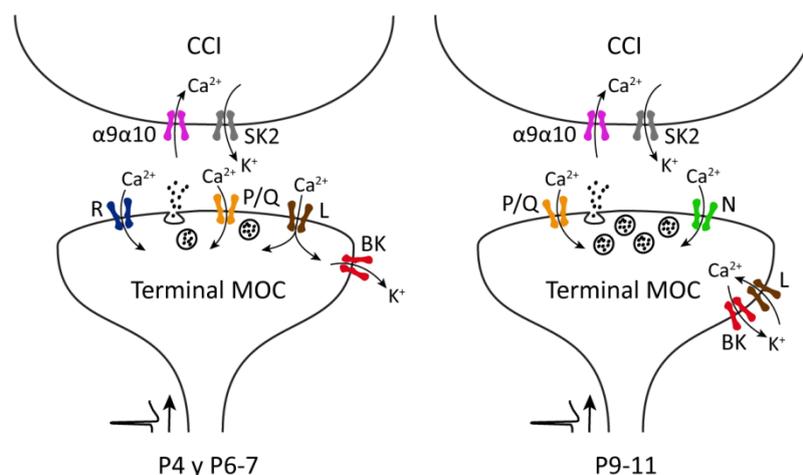


Figura 22. Esquema representativo de los canales iónicos que median y modulan la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal. Luego de la llegada de un potencial de acción al terminal sináptico, el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo P/Q, R y L contribuye a la liberación de ACh en los estadios tempranos del desarrollo (P4 y P6-7). En una etapa más tardía (P9-11), los CCDVs de tipo R dejan de participar de este proceso y son reemplazados por los CCDVs de tipo N. Durante todo este periodo, el Ca^{2+} que ingresa al terminal por los CCDVs de tipo L modula negativamente la liberación de ACh mediante la activación de los canales BK, los cuales aceleran la repolarización del potencial de acción, reduciendo la cantidad de neurotransmisor liberado por impulso nervioso.

6. Resultados: Segunda parte

6.1. La sinapsis MOC-CCI de ratones P9-11 que no expresan canales BK presenta una fuerza sináptica normal

Los canales de K^+ de alta conductancia dependientes de Ca^{2+} y de voltaje (canales BK) son reguladores universales de la excitabilidad celular, debido a su capacidad de actuar como detectores de coincidencia para la concomitante elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} y de la despolarización de la membrana y a su expresión ubicua (Salkoff et al., 2006; Contreras et al., 2013; Hoshi et al., 2013; Contet et al., 2016). Entre las funciones moduladas por estos canales se encuentran la contractilidad del músculo liso (Brenner et al., 2000; Meredith et al., 2004; Werner et al., 2005; Eichhorn y Dobrev, 2007; Dunn y Nelson, 2010), la tasa de disparo neuronal (Brenner et al., 2005; Meredith et al., 2006; Gu et al., 2007; Li et al., 2007b; Matthews et al., 2008), las fases de repolarización e hiperpolarización postpotencial del potencial de acción (Shao et al., 1999; Faber y Sah, 2002; Gu et al., 2007; Montgomery y Meredith, 2012) y la liberación del neurotransmisor (Robitaille et al., 1993a; Raffaelli et al., 2004; Grimes et al., 2009; Zorrilla de San Martín et al., 2010; Robles Gómez et al., 2018). Los canales BK están constituidos por un homotetrámero de subunidades α , que conforman el poro del canal (Shen et al., 1994), al cual se pueden sumar las subunidades regulatorias β y γ , que modifican sus propiedades biofísicas (Gonzalez-Perez y Lingle, 2019).

En el órgano de Corti se ha detectado la expresión de canales BK en varios tipos celulares (Pyott y Duncan, 2016). En las CCIs los canales BK comienzan a expresarse alrededor de P10-12, donde median una corriente rápida de K^+ denominada $I_{K,f}$ (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a). Esta corriente sería responsable de la disminución de la constante de tiempo de la membrana hacia el comienzo de la audición, contribuyendo al cese del disparo de potenciales de acción característico de las CCIs inmaduras, dando lugar al desarrollo de potenciales graduados. Asimismo, la reducción de la constante de tiempo aseguraría la repolarización rápida de los potenciales graduados, dando lugar a respuestas en fase con estímulos sonoros de baja frecuencia (Kros et al., 1998). Estudios de hibridización *in situ* e inmunocitoquímica han detectado la expresión de canales BK en las neuronas del ganglio espiral desde P3 en adelante (Adamson et al., 2002; Skinner et al., 2003; Hafidi et al., 2005), donde determinan la tasa de disparo ante estímulos auditivos (Oliver et al., 2006). Los canales BK también se expresan en las CCEs a lo largo de toda la cóclea, en cuyas regiones basal y medial contribuyen a la inhibición eferente junto a los canales SK2 mediante su acople funcional a los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Wersinger et al., 2010; Rohmann et al., 2015), y en los terminales MOC que contactan inicialmente a las CCIs y luego a las CCEs, donde modulan la liberación de ACh (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Vattino et al., ARO Abstracts, 2018).

En el presente trabajo demostramos que en la sinapsis transitoria MOC-CCI los canales BK ejercen una importante modulación negativa sobre la liberación de ACh desde P4 hasta P9-11, dado que al antagonizar específicamente estos canales el contenido cuántico se incrementa un 200% o aún más, según el estadio analizado (sección 4.4.3.). Por ello, decidimos investigar el efecto de una mutación nula en el gen que codifica para la subunidad α del canal BK (ratones $Slo^{-/-}$) (Meredith et al., 2004) sobre las propiedades de la liberación del neurotransmisor en esta sinapsis en el periodo P9-11. En primer lugar, postulamos que en los ratones $Slo^{-/-}$ la fuerza de la sinapsis MOC-CCI estaría significativamente incrementada. Para evaluar esta hipótesis, realizamos estimaciones del m evocado eléctricamente y de la $P_{\text{éxito}}$ en ratones $Slo^{+/+}$ y $Slo^{-/-}$ en P9-11. Cada estimación del m se hizo a partir de 100 estímulos consecutivos aplicados a una frecuencia de 1 Hz. Sorprendentemente, la ablación genética de los canales BK no produjo alteraciones significativas en el m ($m_{Slo^{+/+}} = 0,59 \pm 0,12$; $m_{Slo^{-/-}} = 0,61 \pm 0,11$; $p = 0,9021$; $n = 13$ CCIs, 8-10 ratones; Figura 23a y c) ni en la $P_{\text{éxito}}$ ($P_{\text{éxito}Slo^{+/+}} = 0,38 \pm 0,06$; $P_{\text{éxito}Slo^{-/-}} = 0,40 \pm 0,06$; $p = 0,8176$, Figura 23b y c). En vista de estos resultados, es posible que en ausencia de canales BK funcionales existan mecanismos compensatorios que conserven la fuerza sináptica.

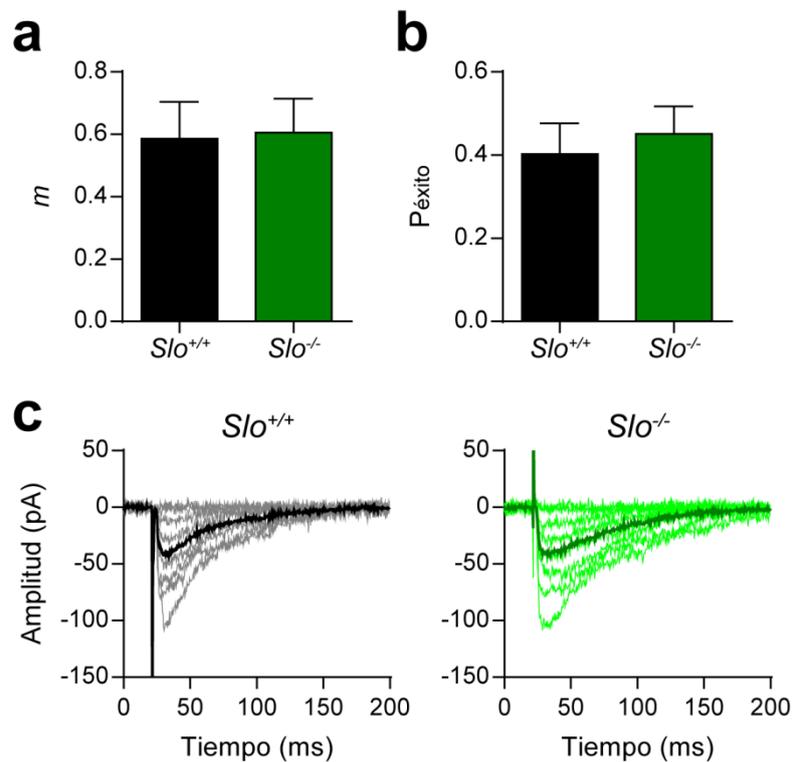


Figura 23. La fuerza sináptica en la sinapsis MOC-CCI no se encuentra alterada en ratones con una ablación genética de los canales BK. **a**, Contenido cuántico de la liberación evocada (m), en CCIs

P9-11 de ratones *Slo*^{+/+} (en negro) y *Slo*^{-/-} (en verde). **b**, Probabilidad de evocar exitosamente una respuesta sináptica ($P_{\text{éxito}}$) en CCI de ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. **c**, Trazos representativos individuales (en color claro) y promedio (en color oscuro) de eIPSCs registradas en ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. Las barras de error representan el SEM.

Además, estudiamos si la amplitud y/o el curso temporal de las sIPSCs en la sinapsis MOC-CCI se ven afectadas debido a la pérdida de la expresión de los canales BK. No encontramos cambios entre los genotipos ni en la amplitud (*Slo*^{+/+} = 25,61 ± 1,79 pA; *Slo*^{-/-} = 22,59 ± 1,67 pA; $p = 0,3029$; $n = 14$ CCI, 9-10 ratones, 688-748 sIPSCs; Figura 24a y b) ni en el tiempo de crecimiento (medido como tiempo al pico, *Slo*^{+/+} = 7,32 ± 0,55 ms; *Slo*^{-/-} = 8,26 ± 0,59 ms; $p = 0,2555$, Figura 24a y c) ni en la constante de decaimiento (*Slo*^{+/+} = 34,69 ± 2,25 ms; *Slo*^{-/-} = 40,31 ± 2,85 ms, $p = 0,1337$, Figura 24a y d) de las sIPSCs.

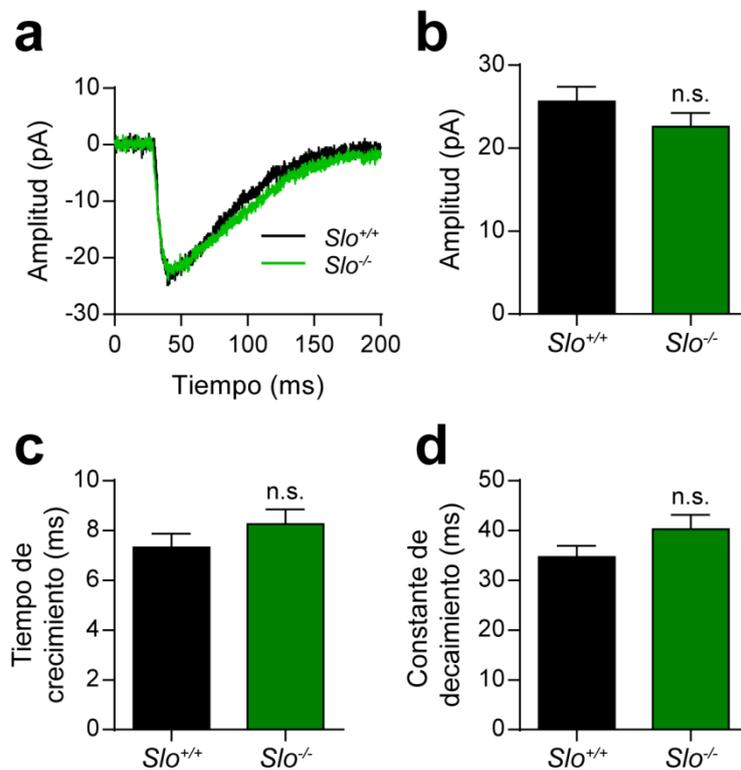


Figura 24. Las propiedades biofísicas de las sIPSC están conservadas en la sinapsis MOC-CCI de ratones *Slo*^{-/-}. **a**, Trazos representativos promedio de sIPSCs registradas en una célula representativa de cada genotipo, mostrando la similitud en la amplitud y la cinética de las corrientes entre ambos grupos. **b**, **c** y **d**, Amplitud (**b**), tiempo de crecimiento (**c**) y constante de decaimiento (**d**) promedio de las sIPSCs en CCI P9-11 *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. Las barras de error representan el SEM.

6.2. El patrón de STP se encuentra conservado en la sinapsis MOC-CCI de ratones *Slo*^{-/-}

A pesar de no haber encontrado cambios en la fuerza sináptica en la sinapsis MOC-CCI de ratones *Slo*^{-/-}, sería posible que el ensanchamiento de los potenciales de acción en el terminal sináptico debido a la ausencia del canal BK quede en evidencia durante la activación sináptica de mediana y alta frecuencia. Con el fin de evaluar esta posibilidad, analizamos la respuesta total (S), la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) y la amplitud promedio de las respuestas exitosas (A) para cada pulso durante trenes de estimulación de 10 pulsos a 10, 40 y 100 Hz en CCIs *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. Un resumen de los resultados de los análisis estadísticos se muestra en la Tabla 3. Los valores normalizados de estos parámetros durante los trenes de estimulación se muestran en la Figura 25 (S en los paneles superiores, $P_{\text{éxito}}$ en los paneles centrales, A en los paneles inferiores). En todas las frecuencias evaluadas en ambos genotipos observamos depresión, que se acentúa con el transcurso del tren y con la frecuencia de estimulación. No encontramos diferencias entre genotipos en ningún parámetro a ninguna de las frecuencias analizadas (Tabla 3).

Es llamativo no haber encontrado diferencias en la fuerza sináptica ni en el patrón de STP en la sinapsis MOC-CCI de ratones carentes de canales BK. Nuevamente, es posible que en los terminales MOC la ablación genética de los canales BK sea compensada por otros mecanismos regulatorios que prevengan alteraciones en la fuerza sináptica y en la plasticidad de corto término.

Frecuencia	Parámetro	<i>p</i>	<i>n Slo</i> ^{+/+}	<i>n Slo</i> ^{-/-}
10 Hz	S	0,5580	8	10
	$P_{\text{éxito}}$	0,2115		
	A	0,6622		
40 Hz	S	0,1688	6	8
	$P_{\text{éxito}}$	0,6084		
	A	0,1460		
100 Hz	S	0,8208	6	8
	$P_{\text{éxito}}$	0,7678		
	A	0,6456		

Tabla 3. Valores de *p* obtenidos de la comparación estadística del patrón de STP de CCIs *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. Se aplicaron trenes de estimulación de 10 pulsos a 10, 40 y 100 Hz en CCIs P9-11 *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. La respuesta total (S), la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) y la amplitud promedio de las respuestas exitosas (A) fueron computadas para cada pulso. Los valores de *p* corresponden al efecto del factor genotipo de ANOVAs de dos vías de medidas repetidas.

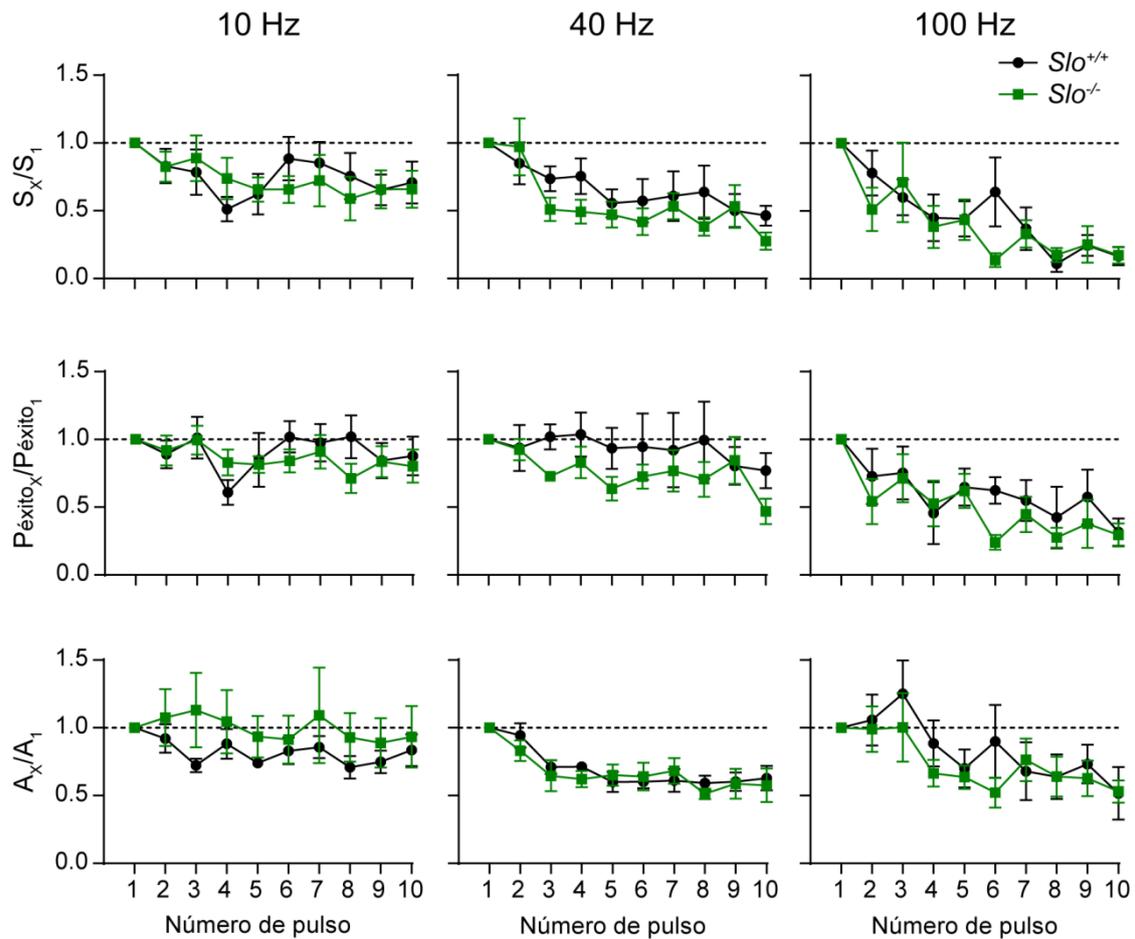


Figura 25. La sinapsis MOC-CCI de ratones *Slo*^{-/-} presenta patrones de STP normales. La respuesta total normalizada (S_x/S_1 , paneles superiores), la probabilidad normalizada de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}_x}/P_{\text{éxito}_1}$, paneles medios) y la amplitud normalizada de las respuestas exitosas (A_x/A_1 , paneles inferiores) fueron graficadas para cada pulso durante trenes de estimulación de 10 pulsos a 10, 40 y 100 Hz (paneles de izquierda a derecha) en CCIs de ratones *Slo*^{+/+} (círculos negros) y *Slo*^{-/-} (cuadrados verdes). Las barras de error representan el SEM.

6.3. El rol de los CCDVs de tipo L en la transmisión sináptica se encuentra alterado en las sinapsis MOC-CCI de los ratones *Slo*^{-/-}

Como hemos comentado anteriormente, en ratones P9-11 los CCDVs de tipo L ejercen una modulación negativa sobre la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI mediante su acople funcional con los canales BK (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Investigamos luego cuál era el rol de estos CCDVs en la transmisión sináptica en ratones en los cuales no hay expresión de canales BK (*Slo*^{-/-}). En los ratones *Slo*^{-/-} P9-11, la incubación de las preparaciones de cóclea con Bay-K 10 μ M, agonista específico de los CCDVs de tipo L, produjo un incremento en el *m*

($m_{\text{control}} = 0,93 \pm 0,26$, $m_{\text{Bay-K}} = 1,62 \pm 0,08$; $p = 0,0315$; $n = 4$ CCI, 4 ratones; Figura 26a y b) mientras que la aplicación del antagonista Nifedipina 3 μM no provocó cambios en este parámetro ($m_{\text{control}} = 1,05 \pm 0,16$, $m_{\text{Nife}} = 1,12 \pm 0,14$; $p = 0,3266$; $n = 4$ CCI, 4 ratones; Figura 26a y b). Estos efectos recapitulan aquellos obtenidos con DHPs en ratones *wild-type* P4-7 luego de prebloquear a los canales BK con IbTx (sección 4.4.4). En los ratones *Slo*^{+/+}, el tratamiento con Bay-K 10 μM redujo el m ($m_{\text{control}} = 1,27 \pm 0,23$, $m_{\text{Bay-K}} = 1,02 \pm 0,24$; $p = 0,0243$; $n = 4$ CCI, 4 ratones; Figura 26a y b) mientras que Nifedipina 3 μM lo aumentó ($m_{\text{control}} = 0,70 \pm 0,18$, $m_{\text{Nife}} = 1,28 \pm 0,35$; $p = 0,0459$; $n = 6$ CCI, 6 ratones; Figura 26a y b), lo cual sugiere el acoplamiento de los CCDVs de tipo L con los canales BK, como ha sido previamente descrito en esta edad (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Estos resultados indican un posible retraso en el desarrollo de la sinapsis MOC-CCI en ausencia de la expresión de los canales BK.

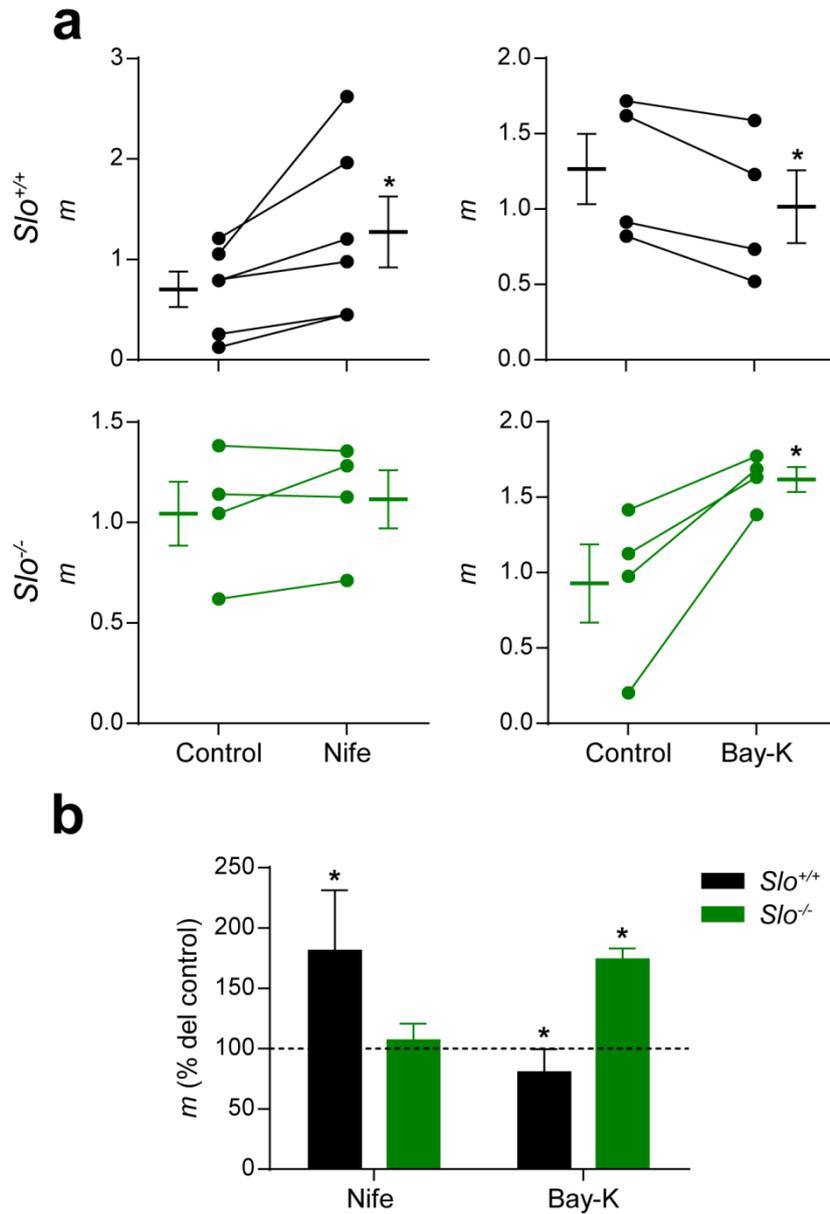


Figura 26. La falta de expresión de los canales BK en los terminales MOC altera el rol de los CCDVs de tipo L sobre la transmisión sináptica. **a**, Los gráficos muestran los valores de m de células individuales y promedio antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con Nife 3 μ M y Bay-K 10 μ M en CCI de ratones $Slo^{+/+}$ y $Slo^{-/-}$. **b**, Gráfico de barras resumen mostrando el efecto sobre el m de Nife 3 μ M y Bay-K 10 μ M (como % del control) en los diferentes genotipos evaluados (Nife m % del control: $Slo^{+/+}$ = 181,20 \pm 50,08; $Slo^{-/-}$ = 106,82 \pm 13,77; Bay-K m % del control: $Slo^{+/+}$ = 80,32 \pm 19,04; $Slo^{-/-}$ = 174,12 \pm 8,95). Las barras de error representan el SEM. * $p < 0,05$.

6.4. La maduración de las propiedades eléctricas de las CCIIs no está alterada en ratones *Slo*^{-/-}

Antes del comienzo de la audición, las CCIIs disparan potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} en forma espontánea o inducida por la inyección de corriente (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a; Tritsch et al., 2007), mientras que luego del inicio de la audición las CCIIs sólo son capaces de generar potenciales graduados (Matthews y Fuchs, 2010). La pérdida de la capacidad de las CCIIs de disparar potenciales de acción se ha asociado al incremento en la amplitud y a la disminución del voltaje de activación de la corriente de K^+ mediada por los canales de K^+ de activación tardía (*delayed outward rectifier K^+ channels*), sumado al comienzo de la expresión de los canales de K^+ KCNQ4 y BK (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a). En particular, se ha resaltado el rol de los canales BK en la maduración eléctrica de las CCIIs, ya que su expresión disminuye sustancialmente la constante de tiempo de membrana (Kros et al., 1998; Oliver et al., 2006). Por ello, investigamos si este proceso se encuentra alterado en ratones carentes de canales BK. Con este fin, evaluamos la capacidad de las CCIIs de ratones P15-16 de ambos genotipos de disparar potenciales de acción ante la aplicación de pulsos de corriente despolarizante. Utilizamos pulsos de 300, 500 y 700 pA y 10 segundos de duración, y también una rampa de corriente despolarizante de 700 pA y 12,5 segundos de duración. En la Figura 27 se muestran trazos representativos individuales de las respuestas de voltaje registradas en CCIIs de ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-} ante la aplicación de estos protocolos. No detectamos potenciales de acción en ninguna de las CCI evaluadas (*Slo*^{+/+} $n = 5$ CCIIs, 2 ratones; *Slo*^{-/-} $n = 7$ CCIIs, 3 ratones). La aplicación de los mismos protocolos en CCIIs P10-11 de ratones *Slo*^{+/+} fue capaz de evocar potenciales de acción ($n = 4$ CCIIs, 2 ratones, Figura 27 recuadro). Aunque sería necesario aumentar el número de réplicas, estos resultados sugieren que también en las CCIIs la falta de expresión de canales BK daría lugar a mecanismos compensatorios que aseguren una normal maduración eléctrica de estas células.

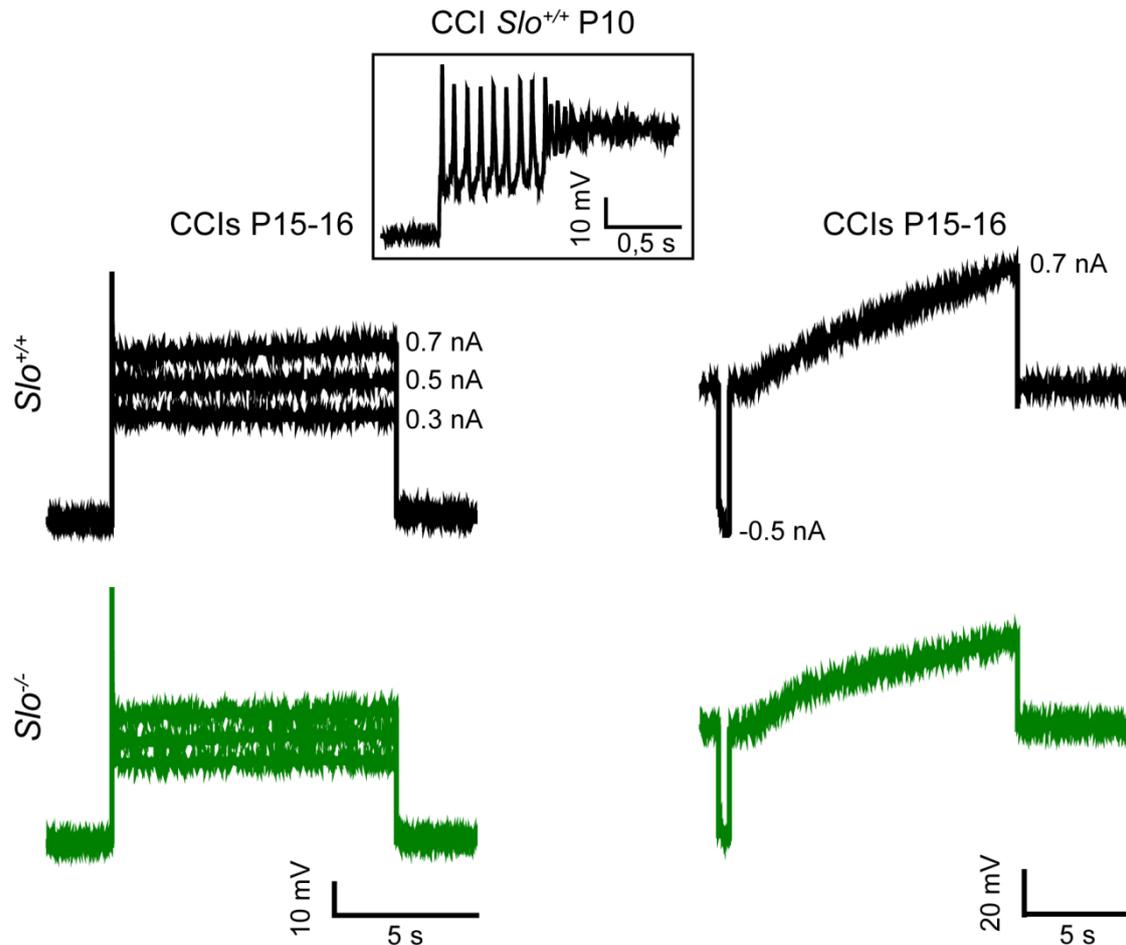


Figura 27. El desarrollo de las propiedades eléctricas de las CCIs es normal en ratones *Slo*^{+/-}. Respuestas de voltaje registradas en CCIs P15-16 de ratones *Slo*^{+/-} y *Slo*^{-/-} a pulsos cuadrados de corriente (izquierda) o a una rampa de corriente (derecha). Recuadro: respuesta de voltaje de una CCI P10 *Slo*^{+/-} a un pulso cuadrado de corriente de 0,5 nA mostrando un tren de potenciales de acción.

6.5. La pérdida de sinapsis MOC-CCI funcionales luego del comienzo de la audición es normal en ratones con una ablación genética de los canales BK

Se ha observado que las CCIs de ratones *knockout* para el canal $Ca_v1.3$, que media la liberación de glutamato en la sinapsis aferente entre las CCIs y las neuronas aferentes de tipo I, presentan defectos en su desarrollo postnatal. Entre ellos, la incapacidad para disparar potenciales de acción, la falta de expresión de canales BK funcionales y la presencia de una innervación eferente MOC persistente (hasta al menos P35) (Brandt et al., 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos si la pérdida de sinapsis MOC-CCI funcionales que ocurre luego del comienzo de la audición también se encuentra alterada en ratones que no

expresan canales BK. Para responder este interrogante, evaluamos la presencia de actividad sináptica eferente en CCIs P15-16 de ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-} utilizando una solución extracelular con alto K⁺ (40-80 mM). En la Figura 28 se muestran registros representativos de CCIs de ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-} con presencia de actividad sináptica. La proporción de CCIs en las que se pudo evocar actividad sináptica por despolarización con K⁺ no fue significativamente distinta entre ambos genotipos (*Slo*^{+/+} 3/8, 6 ratones; *Slo*^{-/-} 1/7, 3 ratones; $p = 0,5692$), aunque sería necesario evaluar un mayor número de células. En vista de estos resultados, es posible que en los ratones *Cav1.3*^{-/-} la invasión eferente persistente esté dada por una transmisión sináptica aferente deficiente o por un influjo de Ca²⁺ a las CCIs alterado, y que no presente una asociación directa con la falta de expresión de los canales BK.

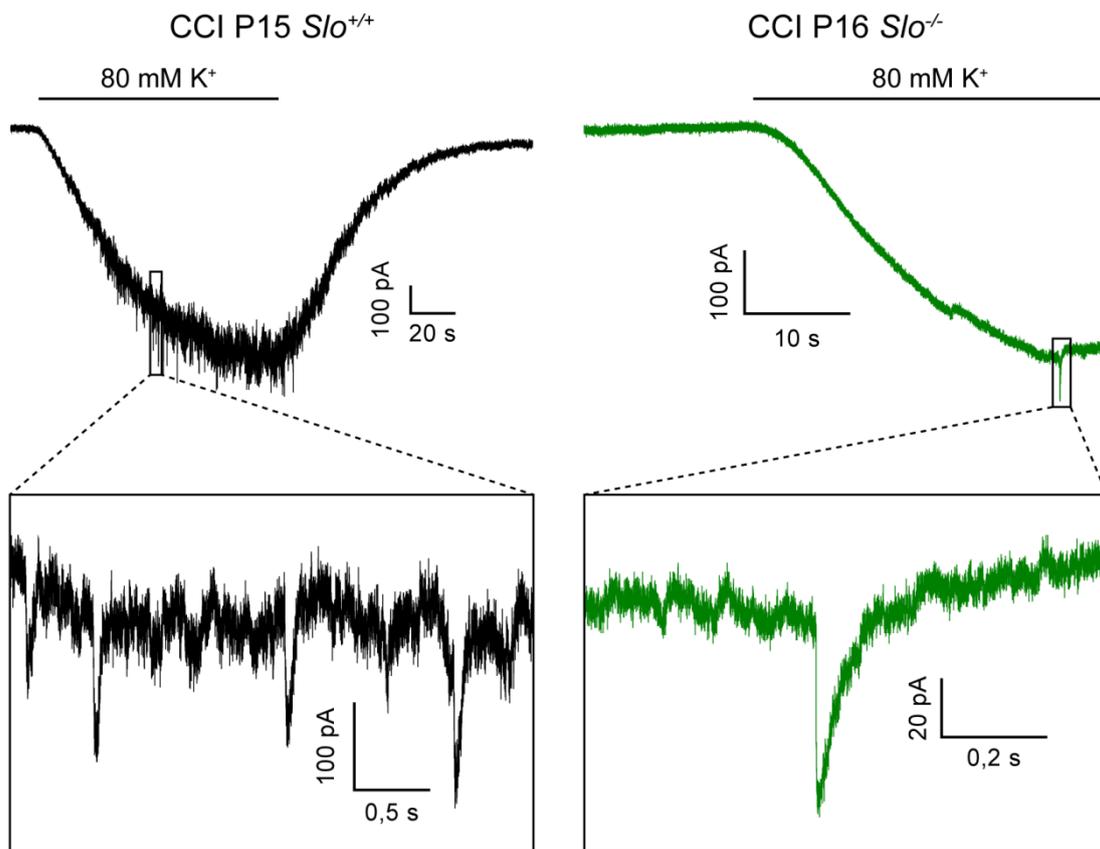


Figura 28. La proporción de CCIs con actividad sináptica eferente no difiere significativamente en ratones *Slo*^{+/+} y *Slo*^{-/-}. Se muestran registros representativos en presencia de alto K⁺ extracelular (80 mM) de una CCI P15 *Slo*^{+/+} (en negro) y una CCI P16 *Slo*^{-/-} (en verde) con actividad sináptica eferente.

6.6. La modulación positiva sobre la liberación de ACh ejercida por los receptores mGluR1 no estaría mediada por la inhibición de los canales BK

En un trabajo reciente, se ha descrito que la liberación de glutamato por las CCI en la sinapsis aferente modula positivamente la inhibición eferente a través de la activación de receptores mGluR1 presentes en los terminales MOC. De esta manera, la sinapsis aferente establece un control negativo sobre su propia actividad (Ye et al., 2017). El mecanismo subyacente al incremento en la liberación de ACh podría involucrar la activación de algún tipo de CCDV o la inhibición de las corrientes de K^+ que repolarizan al terminal, como la mediada por los canales BK. Con el fin de discernir si la inhibición de los canales BK media la modulación positiva ejercida por los receptores mGluR1 sobre la sinapsis MOC-CCI, estudiamos el efecto sobre el m de (S)-3,5-Dihidroxifenilglicina (DHPG) 50 μ M, un agonista de los mGluR1 y mGluR5, empleando ratones $Slo^{+/+}$ y $Slo^{-/-}$ P9-11. No existen agonistas específicos de los mGluR1, y la actividad basal del mGluR1 es baja, por lo que la aplicación de un antagonista específico no tiene efecto. La incubación de las preparaciones de cóclea con DHPG 50 μ M incrementó el m en la sinapsis MOC-CCI de ambos genotipos ($Slo^{+/+}$ $m_{Control} = 0,83 \pm 0,32$, $m_{DHPG} = 1,14 \pm 0,39$; $p = 0,059$; $Slo^{-/-}$ $m_{Control} = 0,53 \pm 0,10$, $m_{DHPG} = 1,16 \pm 0,38$; $p = 0,1272$; $n = 4-5$ CCI, 4-5 ratones; Figura 29a y b). El porcentaje de aumento no fue significativamente distinto entre ambos grupos ($Slo^{+/+}$ m % del control = $152,50 \pm 17,99$, $Slo^{-/-}$ m % del control = $212,40 \pm 45,89$; $p = 0,2263$; Figura 29c). Estos resultados indican que la acción estimuladora de la actividad eferente ejercida por los mGluR1 no estaría mediada por la inhibición de los canales BK.

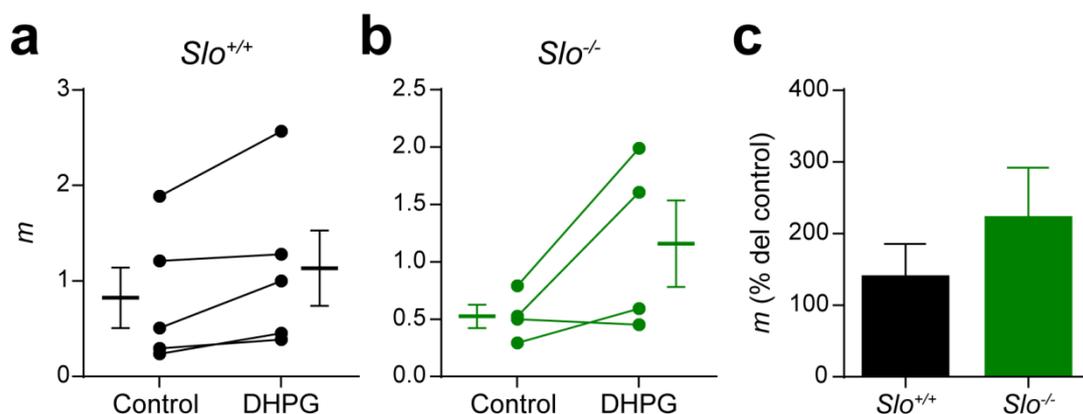


Figura 29. La modulación positiva sobre la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI ejercida por los receptores mGluR1 está conservada en los ratones $Slo^{-/-}$. a y b, Los gráficos muestran los valores

de m de células individuales y promedio antes y después de la incubación de las preparaciones de cóclea con (S)-3,5-Dihidroxifenilglicina (DHPG) 50 μ M, un agonista específico de los receptores mGluR1 y mGluR5, en CCIs $Slo^{+/+}$ (**a**) y $Slo^{-/-}$ (**b**). **c**, Gráfico de barras resumen mostrando el efecto sobre el m de DHPG 50 μ M (como % del control) en los diferentes genotipos evaluados. Las barras de error representan el SEM.

7. Discusión: Segunda parte

Los canales BK sensan y regulan el voltaje de membrana y la concentración de Ca^{2+} intracelular, disminuyendo la excitabilidad celular (Salkoff et al., 2006; Contreras et al., 2013; Hoshi et al., 2013; Contet et al., 2016). Debido a su expresión ubicua, regulan múltiples procesos fisiológicos, como la duración del potencial de acción (Storm, 1987a; Shao et al., 1999; Goldberg y Wilson, 2005; Kimm et al., 2015; Gutzmann et al., 2019), la tasa de disparo neuronal (Brenner et al., 2005; Meredith et al., 2006; Gu et al., 2007; Li et al., 2007b; Matthews et al., 2008) y la contractilidad del músculo liso (Brenner et al., 2000; Meredith et al., 2004; Werner et al., 2005; Eichhorn y Dobrev, 2007; Dunn y Nelson, 2010).

Con el fin de evaluar la participación de los canales BK en los distintos procesos fisiológicos antes mencionados, varios laboratorios han empleado ratones con una ablación del gen *Slo1* (ratones *Slo*^{-/-}), que codifica para la subunidad α que conforma el poro del canal (Meredith et al., 2004; Sausbier et al., 2004). En los ratones *Slo*^{-/-}, la ausencia de canales BK funcionales da lugar a ataxia cerebelar (Sausbier et al., 2004), osteopenia (Sausbier et al., 2011), vejiga urinaria hiperactiva (Meredith et al., 2004), hipertensión arterial asociada a un aumento en el tono vascular e hiperaldosteronismo (Sausbier et al., 2005), bradicardia (Lai et al., 2014), disminución en la secreción de insulina (Düfer et al., 2011), disfunción eréctil (Werner et al., 2005) y a alteraciones en el ritmo circadiano (Meredith et al., 2006). En el sistema auditivo, se han realizado estudios empleando dos líneas de ratones *Slo*^{-/-} obtenidas en forma independiente (Meredith et al., 2004; Sausbier et al., 2004). Una de estas líneas (Sausbier et al., 2004) muestra una pérdida auditiva progresiva en las frecuencias altas asociada a la degeneración de las CCEs de la región basal de la cóclea a partir de las 8 semanas de edad (Ruttiger et al., 2004). Mientras que la otra línea *knockout* presenta umbrales auditivos normales al menos hasta las 15 semanas de edad (Pyott et al., 2007; Maison et al., 2013). Las diferencias observadas podrían deberse al trasfondo genético de los animales empleados, ya que una de las líneas fue desarrollada en ratones 129SvJ (Sausbier et al., 2004) y la otra en FVB/NJ (Meredith et al., 2004). Por otra parte, las respuestas supraumbrales del nervio auditivo a estímulos sonoros de distintas frecuencias se encuentran disminuidas y sus latencias aumentadas en los ratones *Slo*^{-/-} con trasfondo FVB/NJ (Maison et al., 2013). Las CCI *Slo*^{-/-} presentan una constante de tiempo de membrana 3 veces mayor que las CCI *Slo*^{+/+}. Esto conduce a un enlentecimiento de los potenciales receptores y al incremento en la varianza de la latencia al primer potencial de acción evocado por un tono en fibras auditivas individuales (*Slo*^{-/-} con trasfondo 129SvJ) (Oliver et al., 2006). Esto último disminuiría la sincronización de las respuestas de las fibras auditivas, dando lugar a una reducción en la respuesta global del nervio auditivo y a un incremento en su latencia (Maison et al., 2013). Asimismo, la menor precisión en la sincronización del primer potencial de acción en respuesta a un tono afectaría el grado de acoplamiento en fase con estímulos

sonoros de baja frecuencia (<4 kHz) (Oliver et al., 2006) que normalmente expresa el nervio auditivo (Palmer y Russell, 1986). Por último, los ratones *Slo*^{-/-} exhiben una mayor vulnerabilidad al daño acústico temporal inducido por sonido, probablemente debido a la supresión olivococlear reducida por la falta de expresión de los canales BK (Maison et al., 2013), que están acoplados funcionalmente a los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ junto a los canales SK2 en la región medial y basal de la cóclea (Wersinger et al., 2010; Maison et al., 2013; Rohmann et al., 2015).

En la primera parte de este trabajo demostramos el rol de los canales BK en la modulación negativa de la liberación de ACh en la sinapsis transitoria MOC-CCI a lo largo del desarrollo postnatal. En esta sección, evaluamos si la falta de expresión constitutiva de estos canales en los ratones *Slo*^{-/-} (con trasfondo FVB/NJ) afectaba distintos aspectos de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCI. Evaluamos además si las propiedades eléctricas de las CCIs estaban alteradas debido a la falta de expresión de los canales BK.

7.1. La fuerza de la sinapsis MOC-CCI no está alterada en los ratones *Slo*^{-/-}

Sorprendentemente, el contenido cuántico de la liberación evocada (m) y la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) no fueron significativamente diferentes entre ratones *Slo*^{-/-} y *Slo*^{+/+} en el estadio P9-11, por lo que concluimos que la fuerza de la sinapsis MOC-CCI está conservada en ausencia de canales BK funcionales. La amplitud y cinética de las sIPSCs tampoco resultaron alteradas por esta modificación genética. Una explicación posible sería que exista un ensanchamiento en los potenciales de acción de los terminales MOC debido a la ausencia de canales BK, con el consiguiente incremento del influjo de Ca^{2+} y de la $P_{\text{vesicular}}$, y que concomitantemente haya una reducción en el tamaño del RRP, neutralizando los cambios en el m . Los terminales MOC que contactan a las CCEs incrementan su tamaño durante el desarrollo postnatal, pero en ausencia de canales BK este proceso se ve alterado y como consecuencia de esta alteración los terminales MOC conservan un tamaño reducido semejante al de estadios inmaduros (Rohmann et al., 2015). Por otra parte, se ha observado una correlación directa entre el tamaño de un terminal sináptico y el tamaño del RRP (Murthy et al., 2001). Por lo tanto, es posible que en la sinapsis MOC-CCI de los ratones *Slo*^{-/-} los terminales sean más pequeños y tengan un RRP menor, y que esto dé lugar a que el m se encuentre conservado. Alternativamente, las diferencias observadas en los efectos del bloqueo agudo de los canales BK con IbTx en comparación con la ablación genética constitutiva de estos

canales pueden deberse a que en este último caso se desarrollen mecanismos compensatorios que intenten mantener la funcionalidad del sistema. De acuerdo con esto, la ablación genética de los canales BK inducible por tamoxifeno y específica de las células musculares lisas provoca una mayor contractibilidad del músculo liso de la vejiga urinaria asociada a una mayor frecuencia de micción que la ablación constitutiva. El fenotipo más moderado exhibido por los ratones *knockout* constitutivos es explicado por el desarrollo de mecanismos adaptativos de largo plazo ante la carencia crónica de canales BK funcionales en estos animales, entre ellos, un menor influjo de Ca^{2+} dependiente de voltaje y una mayor actividad de la vía de señalización del receptor β -adrenérgico (acoplados a una proteína G_s que activa a la adenililciclase), expresada como una mayor sensibilidad a agonistas específicos, un nivel basal de AMPc aumentado y una mayor expresión de las subunidades regulatoria y catalítica de la proteína kinasa A (PKA). La activación de estos receptores produce relajación muscular (Andersson y Arner, 2004). Además, el análisis del proteoma de la vejiga urinaria de los ratones *knockout* constitutivos con respecto a los *wild-type* reveló que existe una regulación compensatoria de otras proteínas (Sprossmann et al., 2009). La aparición de mecanismos compensatorios en los ratones *Slo*^{-/-} también ha sido descrita en el músculo liso traqueal. En este tejido, la activación de los receptores adrenérgicos β_2 acoplados a una proteína G_s provocan la relajación de las fibras musculares, mientras que los receptores muscarínicos M_2 acoplados a una proteína G_i producen contracción (Kume et al., 2015). Sorprendentemente, en ratones *Slo*^{-/-} la broncoconstricción mediada por agonistas colinérgicos examinada *in vitro* e *in vivo* se encuentra reducida, mientras que la broncodilatación por agonistas adrenérgicos está aumentada. Al examinar posibles mecanismos compensatorios, se observó una mayor expresión de la guanililciclase y la proteína kinasa dependiente de GMPc (PKG) y un mayor nivel basal de GMPc, cuya vía de señalización induce broncodilatación (Sausbier et al., 2007). Sin embargo, el análisis de los transcritos de la cóclea no demostró diferencias en la expresión génica entre los ratones *Slo*^{-/-} y *Slo*^{+/+} (Pyott et al., 2007). Aún así, la compensación podría ocurrir a un nivel no transcripcional.

7.2. El patrón de STP es normal en ratones con una ablación genética de los canales BK

A pesar de no haber encontrado diferencias en la fuerza de la sinapsis MOC-CCI entre ratones *Slo*^{-/-} y *Slo*^{+/+} en el estadio P9-11, sería posible que la falta de expresión de los canales BK afectara la transmisión sináptica ante la estimulación de las fibras MOC a mediana y alta frecuencia. Por ello, decidimos estudiar si en esta sinapsis la ausencia crónica de canales BK funcionales alteraba el patrón de facilitación de corto término durante la aplicación de trenes de

estimulación a distintas frecuencias. No encontramos diferencias significativas entre ambos genotipos en la respuesta total (S), en la probabilidad de evocar exitosamente un evento de liberación ($P_{\text{éxito}}$) o en la amplitud promedio de las respuestas exitosas (A) en ninguna de las frecuencias de estimulación analizadas (10, 40 y 100 Hz). Como hemos argumentado en la sección anterior, es probable que la falta de alteraciones en el patrón de STP se deba a la expresión de mecanismos compensatorios en respuesta a la ausencia crónica de canales BK funcionales.

En la sinapsis entre las neuronas de Purkinje y las neuronas de los núcleos cerebelares profundos se ha descrito que la ablación genética de los canales BK no produce cambios en la amplitud ni en la cinética de las eIPSCs, sin embargo, la depresión de corto término evaluada mediante pulsos pareados es más intensa para frecuencias de estimulación mayores a 10 Hz. Las neuronas de Purkinje *Slo*^{-/-} presentan potenciales de acción con una hiperpolarización post potencial reducida, por lo que el incremento en la depresión podría deberse a una menor remoción de la inactivación de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, provocando potenciales de acción de menor amplitud con un influjo de Ca²⁺ disminuido, dando lugar a respuestas sinápticas más pequeñas (Sausbier et al., 2004). Por otra parte, en ratones *knockout* del canal Cav2.3 (CCDV de tipo R) existe un ensanchamiento de los potenciales de acción somáticos en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo debido a que no se produce la activación de los canales BK y SK involucrados en la fase de repolarización, ya que dependen del influjo de Ca²⁺ a través de este tipo de CCDV. Al evocar un tren de potenciales de acción, el ensanchamiento se vuelve más pronunciado con los sucesivos disparos. Este fenómeno es recapitulado al bloquear los canales BK o SK con IbTx o apamina, respectivamente, en los animales *wild-type*. En cuanto al impacto de los cambios en la forma del potencial de acción sobre la transmisión sináptica entre las neuronas piramidales de la región CA1 y las neuronas piramidales del subículo, a pesar de que no se encontraron cambios en la amplitud ni en la cinética de los eEPSPs, la facilitación de corto término en protocolos de pulsos pareados está incrementada en los ratones *knockout* (Gutzmann et al., 2019). Si bien la falta de activación de los canales BK y SK probablemente está implicada en el aumento de la facilitación debido a la mayor duración de los potenciales de acción con el consiguiente incremento en el influjo de Ca²⁺, no se pueden descartar otros efectos debido a la falta de expresión crónica de los Cav2.3.

7.3. Los CCDVs de tipo L median la liberación de ACh en los ratones *Slo*^{-/-}

La incubación de preparaciones de cóclea de ratones *Slo*^{+/+} P9-11 con Bay-K, un agonista específico de los CCDVs de tipo L, produjo una disminución en el m , mientras que la aplicación

de Nifedipina, un antagonista de estos CCDVs, incrementó este parámetro, de manera semejante a la observada en ratones Balb/C P9-11. Estos efectos se deben a la regulación negativa que ejercen los CCDVs de tipo L sobre la liberación de ACh a través de la activación de los canales BK (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Sorprendentemente, al repetir estos experimentos en ratones *Slo*^{-/-}, el tratamiento con Bay-K aumentó el *m* mientras que con Nifedipina no hubo efecto, recapitulando los resultados obtenidos en ratones Balb/C en los estadios tempranos (P4 y P6-7) con estas drogas luego de prebloquear los canales BK con IbTx. Es decir, en la sinapsis MOC-CCI en ausencia de canales BK funcionales los CCDVs de tipo L contribuyen a la liberación de ACh, tal y como hemos observado en los estadios iniciales del desarrollo, sugiriendo una menor compartimentalización de los elementos presinápticos que intervienen en el proceso de liberación. De acuerdo con esto, en la sinapsis MOC-CCE se ha descrito que la ablación genética de los canales BK altera el desarrollo de los terminales sinápticos, que son más pequeños (Rohmann et al., 2015). Por otra parte, las proteínas de andamiaje de la zona activa determinan el posicionamiento de los distintos componentes de la maquinaria de liberación. En particular, las proteínas RIM y las proteínas de unión a RIM (RBP, del inglés *RIM binding proteins*) median el anclaje de las vesículas sinápticas a la zona activa y el reclutamiento de los CCDVs a esta región (Kaeser et al., 2011; Acuna et al., 2015, 2016; Müller et al., 2015). Recientemente se ha demostrado que las RBP median la asociación entre los canales BK y distintos tipos de CCDVs, reclutando a los primeros hacia los terminales sinápticos (Sclip et al., 2018). Además, distintos tipos de proteínas del andamiaje están asociados a diferentes distancias de acoplamiento entre los CCDVs y el sensor de Ca²⁺ que promueve la liberación (Yang et al., 2010; Kusch et al., 2018; para una revisión ver Böhme et al., (2018)). Por lo tanto, es posible que la falta de unión de los canales BK a las RBP en los ratones *Slo*^{-/-} produzca una arquitectura alterada en la zona activa, manteniéndose una asociación cercana entre los CCDVs de tipo L y la maquinaria de liberación, característica de estadios inmaduros.

7.4. La maduración de las propiedades eléctricas de las CCIs no está alterada en los ratones *Slo*^{-/-}

Luego del comienzo de la audición, alrededor del día P12 en roedores altricios, las CCIs pasan de ser células capaces de disparar potenciales de acción dependientes de Ca²⁺, espontáneamente o inducidos por la aplicación de corriente, a células que solamente desarrollan potenciales graduados. Esta transformación se debería principalmente a un cambio en las conductancias expresadas por las CCIs (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a, 2003b). Luego

del comienzo de la audición, la corriente de Ca^{2+} a través de los $\text{Cav}1.3$, que media los potenciales de acción, disminuye sustancialmente y desaparece la corriente de Na^+ , que acorta el tiempo necesario para llegar al umbral de disparo (Marcotti et al., 2003b). Además, comienzan a expresarse los canales BK, que median una corriente rápida de K^+ que disminuye la constante de tiempo de la membrana (Kros et al., 1998). Asimismo, aumenta la expresión de los canales KCNQ4, que se activan a potenciales hiperpolarizados, aumentando así la amplitud de la corriente de K^+ a través de los canales de activación tardía (*delayed outward rectifier K^+ channels*), cuyo voltaje de activación se vuelve más negativo. Estas últimas dos corrientes contribuyen a que el potencial de reposo de las CCIs se torne más hiperpolarizado (Marcotti et al., 2003a). Por otra parte, se postula que la actividad espontánea de las CCIs dependería de la liberación de ATP por las células de soporte del órgano de Kölliker, el cual despolariza a las CCIs por dos mecanismos posibles: actuando sobre las mismas células de soporte, en las que induce la secreción de KCl, aumentando la concentración de K^+ en el medio externo de las CCIs (Wang et al., 2015), o mediante la acción directa sobre receptores purinérgicos presentes en las CCIs (Tritsch et al., 2007). De acuerdo con esto, la pérdida de la actividad espontánea en las CCIs estaría asociada al cese de la liberación de ATP por las células de soporte debido a su degeneración poco después del comienzo de la audición y a la disminución de la expresión de receptores purinérgicos en las CCIs (Tritsch y Bergles, 2010).

Entre los factores mencionados que impiden que las CCIs puedan disparar potenciales de acción, se ha resaltado la importancia de la adquisición de los canales BK, cuya corriente rápida de K^+ evitaría que se alcance el umbral de disparo a cualquier nivel de corriente inyectada (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a). Consistente con esto, las CCIs maduras de ratones *Slo*^{-/-} carecen de corrientes rápidas de K^+ (Oliver et al., 2006; Pyott et al., 2007) y tienen una constante de tiempo de membrana aproximadamente 3 veces mayor que las CCIs *Slo*^{+/+} (Oliver et al., 2006). Por ello, decidimos estudiar si las CCIs *Slo*^{-/-} eran capaces de disparar potenciales de acción evocados por la inyección de corriente luego del comienzo de la audición. En CCIs *Slo*^{-/-} P15-16, la aplicación de pulsos cuadrados o de rampas de corriente despolarizante de hasta 700 pA no logró evocar el disparo de potenciales de acción. En cambio, en CCIs *Slo*^{+/+} P10-11 la inyección de pulsos cuadrados de corriente a partir de 300 pA produjo actividad regenerativa, mostrando la efectividad de este protocolo. A pesar de que es necesario aumentar el número de réplicas y realizar un control positivo en CCIs *Slo*^{-/-} P9-11, los resultados obtenidos sugieren que la corriente de Ca^{2+} remanente en las CCIs luego del comienzo de la audición no logra contrarrestar a las conductancias de K^+ , incluso en ausencia de los canales BK, lo que evita que estas células disparen potenciales de acción.

7.5. La pérdida de las conexiones eferentes sobre las CCI's luego del comienzo de la audición no está alterada en los ratones *Slo*^{-/-}

La alteración de distintas conductancias de las CCI's impide su correcta maduración y está asociada a la permanencia o el restablecimiento de la inervación eferente MOC. En las CCI's tanto inmaduras como maduras una fracción de los canales mecanotransductores está abierto en reposo, dando lugar a una corriente despolarizante en el estado basal (Ricci y Fettiplace, 1998; Johnson et al., 2012). La ablación genética de componentes esenciales del proceso de mecanotransducción provoca la pérdida de la corriente mecanotransductora en las CCI's. La ausencia de esta corriente en las CCI's inmaduras evita el comienzo de la expresión de las corrientes de K⁺ mediadas por los canales BK y KCNQ4, y mantiene la habilidad de estas células de disparar potenciales de acción luego del comienzo de la audición. Además, la disrupción genética de componentes de la maquinaria de transducción de expresión tardía ocasiona la pérdida gradual de la corriente mecanotransductora después del comienzo de la audición. Esto da lugar a la pérdida de las corrientes de K⁺ características de las CCI's maduras y a un restablecimiento de la inervación eferente MOC (Corns et al., 2018). Por otra parte, las CCI's de ratones *knockout* de los canales Cav1.3 exhiben una supresión casi total de la corriente de Ca²⁺, no disparan potenciales de acción, no adquieren canales BK durante el desarrollo y presentan una inervación MOC persistente al menos hasta P35 (Brandt et al., 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería posible que la ausencia crónica de los canales BK en las CCI's *Slo*^{-/-}, que constituyen un marcador de madurez, prevenga la eliminación de las conexiones MOC-CCI que ocurre normalmente luego del comienzo de la audición. Sin embargo, cuando analizamos en el estadio P15-16 la proporción de CCI's *Slo*^{-/-} y *Slo*^{+/+} con respuestas sinápticas evocadas por alto K⁺ extracelular no encontramos diferencias significativas entre ambos genotipos, lo cual indica que la pérdida de las sinapsis MOC-CCI en ausencia de canales BK funcionales ocurre normalmente. La corriente despolarizante a través de los canales mecanotransductores (constituida principalmente por K⁺) y la corriente de Ca²⁺ mediada por los Cav1.3 podrían activar cascadas de señalización que den lugar a la expresión de las proteínas que caracterizan a las CCI's maduras, entre ellas los canales BK, que no regularían la expresión génica de otros componentes de las CCI's.

7.6. La modulación positiva de los mGluR1 sobre la liberación de ACh por los terminales MOC no estaría mediada por la inhibición de los canales BK

Antes del comienzo de la audición, el disparo de potenciales de acción por las CCI's provoca la liberación de glutamato en la primera sinapsis de la vía aferente auditiva, generando la propagación de la actividad espontánea a lo largo de la misma (Tritsch et al., 2010). Las CCI's tienen la capacidad de regular su excitabilidad mediante la acción del glutamato sobre receptores metabotrópicos mGluR1 presentes en los terminales MOC, que estimula la liberación de ACh y, por lo tanto, la inhibición eferente (Ye et al., 2017). Se desconoce cuál es el mecanismo por el que la activación de los mGluR1 conduce a una mayor liberación de ACh. La estimulación de los mGluR1 podría dar lugar a la activación de los CCDVs que median la liberación de ACh o a la inhibición de los canales BK, actuando a nivel de los CCDVs de tipo L o sobre los propios canales BK. Con el fin de determinar si los canales BK están involucrados en el mecanismo de acción de los receptores mGluR1, estudiamos el efecto sobre el m del DHPG, un agonista de los mGluR1 y mGluR5, en ratones $Slo^{-/-}$ y $Slo^{+/+}$ P9-11. Los resultados preliminares muestran que el tratamiento con DHPG incrementaría la liberación de ACh por los terminales MOC en ambos genotipos, y que la proporción del incremento no sería significativamente distinta entre los mismos. Esto sugiere que la inhibición de los canales BK no intervendría en la estimulación de la actividad eferente mediada por los receptores mGluR1, la cual podría deberse a la activación de los CCDVs que participan de la liberación de ACh. En el estudio realizado por Ye et al. (2017), se concluyó que los receptores mGluR1 estaban localizados en la presinapsis porque la aplicación de DHPG aumentó el m en la sinapsis MOC-CCI sin cambios en la amplitud de las sIPSCs. Los receptores mGluR1 pueden encontrarse en la presinapsis, sin embargo, en la mayor parte de los casos se ubican en la postsinapsis (Niswender y Conn, 2010). Existe la posibilidad de que los mGluR1 se encuentren en la membrana de las CCI's, y que su activación produzca la liberación de un mensajero retrógrado que estimule la liberación de ACh por los terminales MOC. Las CCI's son capaces incrementar la liberación de ACh mediante la síntesis de óxido nítrico, que actúa en la presinapsis (Kong et al., 2013). No obstante, esta regulación se observa incluso en presencia de antagonistas de los mGluR y en ratones con una ablación genética del transportador vesicular de glutamato VGlut3, cuyas CCI's fallan en liberar este neurotransmisor (Kong et al., 2013). Otro compuesto que puede actuar como un mensajero retrógrado excitatorio es el ácido araquidónico. En la sinapsis entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo el ácido araquidónico liberado desde la postsinapsis actúa sobre los canales de K^+ dependientes de voltaje presinápticos disminuyendo su voltaje de inactivación, lo que da como resultado el ensanchamiento de los potenciales de acción y el incremento en la liberación del neurotransmisor (Carta et al., 2014). Un mecanismo análogo podría mediar el efecto estimulador de los mGluR1 sobre la liberación de ACh por los terminales MOC.

8. Conclusiones

- En la sinapsis transitoria MOC-CCI la fuerza sináptica aumenta significativamente entre los estadios P4 y P9-11 debido a un incremento concurrente en el tamaño del RRP y en su tasa de reciclado, sin cambios en la $P_{vesicular}$.
- El incremento en la fuerza sináptica se encuentra asociado a un cambio en el patrón de STP, que pasa de facilitación a depresión.
- En los estadios iniciales del desarrollo (P4 y P6-7), la liberación de ACh es mediada por CCDVs de tipo P/Q, R y L, mientras que en P9-11 es mediada por los CCDVs de tipo P/Q y N, lo que podría subyacer al cambio en el patrón de STP.
- Durante todo este periodo el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L modula negativamente la liberación de ACh debido a la activación de los canales BK, que aceleran la repolarización del potencial de acción, acotando la entrada de Ca^{2+} y reduciendo la liberación del neurotransmisor.
- En estadios tempranos (P4 y P6-7) los CCDVs de tipo L presentan un rol dual en la liberación de ACh, por un lado contribuyen a la liberación de ACh y por otra parte modulan negativamente este proceso mediante la activación de los canales BK. Esto sugiere que al comienzo del desarrollo postnatal existe una menor compartimentalización de los componentes presinápticos involucrados en el proceso de liberación.
- La fuerza sináptica y el patrón de STP están conservados en la sinapsis MOC-CCI de ratones con una ablación genética de los canales BK (ratones $Slo^{-/-}$), lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación que compensan la ausencia de estos canales.
- Los CCDVs de tipo L contribuyen a la liberación de ACh en ratones $Slo^{-/-}$ P9-11, semejante a lo observado en ratones Balb/C en los estadios P4 y P6-7. Esto sugiere que la falta de expresión de canales BK podría alterar la compartimentalización de los componentes presinápticos involucrados en la liberación de ACh en los terminales MOC.

- La ausencia crónica de canales BK en las CCI no altera su maduración eléctrica ni la pérdida de las sinapsis MOC-CCI funcionales que ocurre luego del comienzo de la audición.
- La estimulación de la liberación de ACh ejercida por receptores mGluR1 presinápticos no estaría mediada por la inhibición de los canales BK.

9. Bibliografía

- Acuna C, Liu X, Gonzalez A, Südhof TC (2015) RIM-BPs Mediate Tight Coupling of Action Potentials to Ca²⁺-Triggered Neurotransmitter Release. *Neuron* 87:1234-1247.
- Acuna C, Liu X, Südhof TC (2016) How to Make an Active Zone: Unexpected Universal Functional Redundancy between RIMs and RIM-BPs. *Neuron* 91:792-807.
- Adamson CL, Reid MA, Mo Z-L, Bowne-English J, Davis RL (2002) Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. *J Comp Neurol* 447:331-350.
- Adler E, Augustine G, Duffy S, Charlton M (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11:1496-1507.
- Alabi AA, Tsien RW (2012) Synaptic Vesicle Pools and Dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a013680.
- Allene C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R (2008) Sequential Generation of Two Distinct Synapse-Driven Network Patterns in Developing Neocortex. *J Neurosci* 28:12851-12863.
- Andersson K-E, Arner A (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 84:935-986.
- Angleon J, Betz W (2001) Intraterminal Ca²⁺ and spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 85:287-294.
- Anniko M, Wróblewski R (1986) Ionic environment of cochlear hair cells. *Hear Res* 22:279-293.
- Arikkath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG, Campbell KP (2003) Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem* 278:1212-1219.
- Armstrong CM, Matteson DR (1985) Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* (80-) 227:65-67.
- Arnold T, Oestreicher E, Ehrenberger K, Felix D (1998) GABA(A) receptor modulates the activity of inner hair cell afferents in guinea pig cochlea. *Hear Res* 125:147-153.
- Art JJ, Fettiplace R, Fuchs PA (1984) Synaptic hyperpolarization and inhibition of turtle cochlear hair cells. *J Physiol* 356:525-550.
- Artalejo CR, Adams ME, Fox AP (1994) Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367:72-76.
- Ashmore J (2008) Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88:173-210.
- Assad JA, Shepherd GMG, Corey DP (1991) Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron* 7:985-994.
- 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.
- Augustine G, Santamaria F, Tanaka K (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331-346.
- Ballesteros J, Zorrilla de San Martín J, Goutman J, Elgoyhen AB, Fuchs P a, Katz E (2011) Short-term synaptic plasticity regulates the level of olivocochlear inhibition to auditory hair cells. *J Neurosci* 31:14763-14774.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM, Kusumi K, Perez-Reyes E, Lander ES, Frankel WN, Gardiner RM, Dolphin AC, Rees M (2001) Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6095-6104.
- Barnes S, Kelly MEM (2002) Calcium Channels at the Photoreceptor Synapse. En: *Photoreceptors and calcium* (Baehr W, Palczewski K, eds), pp 465-476. Springer, Boston, MA.

- Baur D, Bornschein G, Althof D, Watanabe M, Kulik a., Eilers J, Schmidt H (2015) Developmental Tightening of Cerebellar Cortical Synaptic Influx-Release Coupling. *J Neurosci* 35:1858-1871.
- Bean B (1989) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Bean BP (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86:1-30.
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:264-267.
- Berkefeld H, Fakler B, Schulte U (2010) Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* 90:1437-1459.
- Berkefeld H, Sailer C a, Bildl W, Rohde V, Thumfart J-O, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus H-G, Schulte U, Fakler B (2006) BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* (80-) 314:615-620.
- Bertram R, Sherman A, Stanley EF (1996) Single-domain/bound calcium hypothesis of transmitter release and facilitation. *J Neurophysiol* 75:1919-1931.
- 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.
- Beurg M, Fettiplace R, Nam J-H, Ricci AJ (2009) Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nat Neurosci* 12:553-558.
- Beurg M, Michalski N, Safieddine S, Bouleau Y, Schneggenburger R, Chapman ER, Petit C, Dulon D (2010) Control of exocytosis by synaptotagmins and otoferlin in auditory hair cells. *J Neurosci* 30:13281-13290.
- Blatow M, Caputi A, Burnashev N, Monyer H, Rozov A (2003) Ca²⁺ buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* 38:79-88.
- Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni ME, Sinnegger-Brauns MJ, Herzig S, Striessnig J, Koschak A (2011) Functional properties of a newly identified C-terminal splice variant of Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 286:42736-42748.
- Boero LE, Castagna VC, Di Guilmi MN, Goutman JD, Belén Elgoyhen A, Gómez-Casati ME (2018) Enhancement of the medial olivocochlear system prevents hidden hearing loss. *J Neurosci*:0363-18.
- Böhme MA, Grasskamp AT, Walter AM (2018) Regulation of synaptic release-site Ca²⁺ channel coupling as a mechanism to control release probability and short-term plasticity. *FEBS Lett* 592:3516-3531.
- 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.
- Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, Zamponi GW (2001) Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophys J* 81:79-88.
- Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832-10840.
- Brelidze TI, Niu X, Magleby KL (2003) A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9017-9022.
- Brenner R, Chen QH, Vilaythong A, Toney GM, Noebels JL, Aldrich RW (2005) BK channel $\beta 4$ subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures.

- Nat Neurosci 8:1752-1759.
- Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407:670-676.
- Brice NL, Dolphin AC (1999) Differential plasma membrane targeting of voltage-dependent calcium channel subunits expressed in a polarized epithelial cell line. *J Physiol* 515:685-694.
- Brown A, Kunze D, Yatani A (1984) The agonist effect of dihydropyridines on Ca channels. *Nature* 311:570-572.
- Brown M (1987) Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol* 260:605-618.
- Brown MC, De Venecia RK, Guinan JJ (2003) Responses of medial olivocochlear neurons: Specifying the central pathways of the medial olivocochlear reflex. *Exp Brain Res* 153:491-498.
- Brownell W, Bader C, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* (80-) 227:194-196.
- Buraei Z, Yang J (2010) The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiol Rev* 90:1461-1506.
- Cang J, Rentería RC, Kaneko M, Liu X, Copenhagen DR, Stryker MP (2005) Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron* 48:797-809.
- Cantí C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11230-11235.
- Carbone E, Lux H (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.
- Carta M, Lanore F, Rebola N, Szabo Z, Da Silva SV, Lourenço J, Verraes A, Nadler A, Schultz C, Blanchet C, Mülle C (2014) Membrane lipids tune synaptic transmission by direct modulation of presynaptic potassium channels. *Neuron* 81:787-799.
- Castro-Alamancos MA, Connors BW (1997) Distinct forms of short-term plasticity at excitatory synapses of hippocampus and neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4161-4166.
- Catterall W a (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
- Catterall WA, Few AP (2008) Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* 59:882-901.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.
- Ceccarelli B, Fesce R (1988) The effect of potassium on exocytosis of transmitter at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 401:163-183.
- Ceccarelli B, Grohovaz F, Hurlbut W (1979) Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. II. Effects of electrical stimulation and high potassium. *J Cell Biol* 81:178-192.
- Chandrasekaran AR (2005) Evidence for an Instructive Role of Retinal Activity in Retinotopic Map Refinement in the Superior Colliculus of the Mouse. *J Neurosci* 25:6929-6938.
- Charlton MP, Bittner GD (1978) Facilitation of transmitter release at squid synapses. *J Gen Physiol* 72:471-486.
- Chaudhuri D, Chang S-Y, DeMaria CD, Alvania RS, Soong TW, Yue DT (2004) Alternative splicing as a molecular switch for Ca^{2+} /calmodulin-dependent facilitation of P/Q-type Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 24:6334-6342.
- Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P (2001) Alternatively spliced alpha(1G) ($\text{Ca}(\text{V})3.1$) intracellular loops promote specific T-type Ca^{2+} channel gating properties. *Biophys J* 80:1238-1250.

- Chen C, Blitz DM, Regehr WG (2002) Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron* 33:779-788.
- Chen H-X, 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.
- Clause A, Kim G, Sonntag M, Weisz CJC, Vetter DE, Rubsamén R, Kandler K (2014) The Precise Temporal Pattern of Prehearing Spontaneous Activity Is Necessary for Tonotopic Map Refinement. *Neuron* 82:822-835.
- Clause A, Lauer AM, Kandler K (2017) Mice Lacking the Alpha9 Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Exhibit Deficits in Frequency Difference Limens and Sound Localization. *Front Cell Neurosci* 11:1-12.
- Cochran SL (1995) Cationic influences upon synaptic transmission at the hair cell-afferent fiber synapse of the frog. *Neuroscience* 68:1147-1165.
- Cole K, Robertson D (1992) Early efferent innervation of the developing rat cochlea studied with a carbocyanine dye. *Brain Res* 575:223-230.
- Contet C, Goulding SPP, Kuljis D a. A, Barth ALL (2016) BK Channels in the Central Nervous System. En: *Big on BK: Current Insights into the Function of Large Conductance Voltage- and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels at the Molecular, Cellular and Systemic Levels*, 1.^a ed. (Contet C, ed), pp 281-342. Elsevier Inc.
- Contreras GF, Castillo K, Enrique N, Carrasquel-Ursulaez W, Castillo JP, Milesi V, Neely A, Alvarez O, Ferreira G, González C, Latorre R (2013) A BK (Sl_o1) channel journey from molecule to physiology. *Channels* 7:442-458.
- Corey D, Hudspeth A (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature* 281:675-677.
- Corey DP, Holt JR (2016) Are TMCs the Mechanotransduction Channels of Vertebrate Hair Cells? *J Neurosci* 36:10921-10926.
- Corns LF, Johnson SL, Roberts T, Ranatunga KM, Hendry A, Ceriani F, Safieddine S, Steel KP, Forge A, Petit C, Furness DN, Kros CJ, Marcotti W (2018) Mechanotransduction is required for establishing and maintaining mature inner hair cells and regulating efferent innervation. *Nat Commun* 9.
- Cox DH, Cui J, Aldrich RW (1997) Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K⁺ channel. *J Gen Physiol* 110:257-281.
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Crins TTH, Rusu SI, Rodriguez-Contreras A, Borst JGG (2011) Developmental Changes in Short-Term Plasticity at the Rat Calyx of Held Synapse. *J Neurosci* 31:11706-11717.
- Cui J, Cox DH, Aldrich RW (1997) Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol* 109:647-673.
- Darrow KN, Simons EJ, Dodds L, Liberman MC (2006) Dopaminergic innervation of the mouse inner ear: Evidence for a separate cytochemical group of cochlear efferent fibers. *J Comp Neurol* 498:403-414.
- Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer C, Pratt W, Dolphin A (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 Boer E (1983) No sharpening? a challenge for cochlear mechanics. *J Acoust Soc Am* 73:567-573.
- De Robertis E, Bennett H (1955) Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J Biophys Biochem Cytol* 1:47-58.
- deKay JGT, Chang TC, Mills N, Speed HE, Dobrunz LE (2006) Responses of excitatory hippocampal synapses to natural stimulus patterns reveal a decrease in short-term facilitation and increase in short-term depression during postnatal development. *Hippocampus* 16:66-79.

- del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- del Castillo J, Stark L (1952) The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. *J Physiol* 116:507-515.
- Delano PH, Elgueda D, Hamame CM, Robles L (2007) Selective Attention to Visual Stimuli Reduces Cochlear Sensitivity in Chinchillas. *J Neurosci* 27:4146-4153.
- Dittman JS, Kretzner AC, Regehr WG (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20:1374-1385.
- 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 F, Rahamimoff R (1967) Co-operative action of 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 (2013) The $\alpha\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1541-1549.
- Dubel S, Starr T, Hell J, Ahlijanian M, Enyeart J, Catterall WA, Snutch T (1992) Molecular cloning of the alpha1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5058-5062.
- Düfer M, Neye Y, Hörth K, Krippeit-Drews P, Hennige A, Widmer H, McClafferty H, Shipston MJ, Häring HU, Ruth P, Drews G (2011) BK channels affect glucose homeostasis and cell viability of murine pancreatic beta cells. *Diabetologia* 54:423-432.
- Dunn KM, Nelson MT (2010) Potassium Channels and Neurovascular Coupling. *Circ J* 74:608-616.
- Edgerton JR, Reinhart PH (2003) Distinct contributions of small and large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* 548:53-69.
- Eichhorn B, Dobrev D (2007) Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: Functional role and therapeutic potential. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376:145-155.
- Elgoyhen a B, 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 a B, Vetter DE, Katz E, Rothlin C V, 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.
- Ellinor PT, Yang J, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW (1995) Ca^{2+} channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca^{2+} interactions. *Neuron* 15:1121-1132.
- Elmqvist D, Feldman DS (1965) Spontaneous Activity at a Mammalian Neuromuscular Junction in Tetrodotoxin. *Acta Physiol Scand* 64:475-476.
- Emmerling MR, Sobkowicz HM, Levenick C V., Scott GL, Slapnick SM, Rose JE (1990) Biochemical and morphological differentiation of acetylcholinesterase-positive efferent fibers in the mouse cochlea. *J Electron Microscop Tech* 15:123-143.
- Erazo-Fischer E, Striessnig J, Taschenberger H (2007) The role of physiological afferent nerve activity during in vivo maturation of the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 27:1725-1737.
- Ermolyuk YS, Alder FG, Surges R, Pavlov IY, Timofeeva Y, Kullmann DM, Volynski KE (2013) Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca^{2+} channels. *Nat Neurosci* 16:1754-1763.
- Ertel E, Campbell K, Harpold M, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch T, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien R, Catterall W a (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Evans MG, Lagostena L, Darbon P, Mammano F (2000) Cholinergic control of membrane conductance and intracellular free Ca^{2+} in outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Cell Calcium* 28:195-203.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol*

- Rev 73:309-373.
- Faber ESL, Sah P (2002) Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J Neurosci* 22:1618-1628.
- Fakler B, Adelman JP (2008) Control of K_{Ca} Channels by Calcium Nano/Microdomains. *Neuron* 59:873-881.
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109-128.
- Fedchyshyn MJ, Wang L-Y (2005) Developmental transformation of the release modality at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 25:4131-4140.
- Felix D, Ehrenberger K (1992) The efferent modulation of mammalian inner hair cell afferents. *Hear Res* 64:1-5.
- Felmy F, Neher E, Schneggenburger R (2003) Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37:801-811.
- Fettiplace R, Hackney CM (2006) The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci* 7:19-29.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21:269-274.
- Flavell S, Greenberg M (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:563-590.
- Flores EN, Duggan A, Madathany T, Hogan AK, Márquez FG, Kumar G, Seal RP, Edwards RH, Liberman MC, García-Añoveros J (2015) A non-canonical pathway from cochlea to brain signals tissue-damaging noise. *Curr Biol* 25:606-612.
- Foster KA, Kreitzer AC, Regehr WG (2002) Interaction of Postsynaptic Receptor Saturation with Presynaptic Mechanisms Produces a Reliable Synapse. *Neuron* 36:1115-1126.
- Francis HW, Rivas A, Lehar M, Saito Y, Mouton PR, Ryugo DK (2006) Efficient quantification of afferent cochlear ultrastructure using design-based stereology. En: *Journal of Neuroscience Methods*, pp 150-158.
- Freise D, Held B, Wissenbach U, Pfeifer A, Trost C, Himmerkus N, Schweig U, Freichel M, Biel M, Hofmann F, Hoth M, Flockerzi V (2000) Absence of the γ subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties. *J Biol Chem* 275:14476-14481.
- 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 D (1993) DiI reveals a prenatal arrival of efferents at the differentiating otocyst of mice. *Hear Res* 65:51-60.
- Fuchs PA, Lauer AM (2019) Efferent Inhibition of the Cochlea. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9:a033530.
- Fuchs PA, Lehar M, Hiel H (2014) Ultrastructure of cisternal synapses on outer hair cells of the mouse cochlea. *J Comp Neurol* 522:717-729.
- Fujikawa T, Petralia RS, Fitzgerald TS, Wang YX, Millis B, Morgado-Díaz JA, Kitamura K, Kachar B (2014) Localization of kainate receptors in inner and outer hair cell synapses. *Hear Res* 314:20-32.
- Furness D, Hackney C (1985) Cross-links between stereocilia in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 18:177-188.
- Furness DN, Katori Y, Nirmal Kumar B, Hackney CM (2008) The dimensions and structural attachments of tip links in mammalian cochlear hair cells and the effects of exposure to different levels of extracellular calcium. *Neuroscience* 154:10-21.
- Gabashvili IS, Sokolowski BHA, Morton CC, Giersch ABS (2007) Ion Channel Gene Expression in the Inner Ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:305-328.
- Galambos R (1956) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19:424-437.
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben J, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski G, Garcia M (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for

- the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus*. *J Biol Chem* 265:11083-11090.
- Garrett AR, Robertson D, Sellick PM, Mulders WHAM (2011) The actions of dopamine receptors in the guinea pig cochlea. *Audiol Neurotol* 16:145-157.
- Gasparini S, Kasyanov AM, Pietrobon D, Voronin LL, Cherubini E (2001) Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus. *J Neurosci* 21:8715-8721.
- Gifford M, Guinan JJ (1987) Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear Res* 29:179-194.
- Gil-Loyzaga P, Pujol R (1988) Synaptophysin in the developing cochlea. *Int J Dev Neurosci* 6:155-160.
- Glowatzki E, Fuchs P a (2000) Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288:2366-2368.
- Glowatzki E, Fuchs P a (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147-154.
- Glueckert R, Wietzorrek G, Kammen-Jolly K, Scholtz A, Stephan K, Striessnig J, Schrott-Fischer A (2003) Role of class D L-type Ca²⁺ channels for cochlear morphology. *Hear Res* 178:95-105.
- Goldberg J a, Wilson CJ (2005) Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 25:10230-10238.
- Gómez-Casati ME, Fuchs P a, 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-Perez V, Lingle CJ (2019) Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits. *Annu Rev Physiol* 81:113-137.
- 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.
- Graydon CW, Cho S, Li G-L, Kachar B, von Gersdorff H (2011) Sharp Ca²⁺ Nanodomains beneath the Ribbon Promote Highly Synchronous Multivesicular Release at Hair Cell Synapses. *J Neurosci* 31:16637-16650.
- Green GE, Khan KM, Beisel DW, Drescher MJ, Hatfield JS, Drescher DG (1996) Calcium channel subunits in the mouse cochlea. *J Neurochem* 67:37-45.
- Grimes WN, Li W, Chávez AE, Diamond JS (2009) BK channels modulate pre- and postsynaptic signaling at reciprocal synapses in retina. *Nat Neurosci* 12:585-592.
- Gu N, Vervaeke K, Storm JF (2007) BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 580:859-882.
- Guinan JJ, Gifford ML (1988a) Effects of electrical stimulation of efferent olivocochlear neurons on cat auditory-nerve fibers. III. Tuning curves and thresholds at CF. *Hear Res* 37:29-45.
- Guinan JJ, Gifford ML (1988b) Effects of electrical stimulation of efferent olivocochlear neurons on cat auditory-nerve fibers. I. Rate-level functions. *Hear Res* 33:97-113.
- Gutzmann JJ, Lin L, Hoffman DA (2019) Functional Coupling of Cav2.3 and BK Potassium Channels Regulates Action Potential Repolarization and Short-Term Plasticity in the Mouse Hippocampus. *Front Cell Neurosci* 13:1-14.
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Chan CS, Surmeier DJ (2009) Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 29:11011-11019.
- Hackney CM, Furness DN (2013) The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *J Cell Sci* 126:1721-1731.
- Hafidi A, Beurg M, Dulon D (2005) Localization and developmental expression of BK channels in mammalian cochlear hair cells. *Neuroscience* 130:475-484.
- Hall Z (1972) Release of neurotransmitters and their interaction with receptors. *Annu Rev Biochem* 41:925-952.

- Harrus A-G, Ceccato J-C, Sendin G, Bourien J, Puel J-L, Nouvian R (2018) Spiking Pattern of the Mouse Developing Inner Hair Cells Is Mostly Invariant Along the Tonotopic Axis. *Front Cell Neurosci* 12:1-10.
- Haug T, Olcese R, Toro L, Stefani E (2004) Regulation of K⁺ flow by a ring of negative charges in the outer pore of BKCa channels. Part II: Neutralization of aspartate 292 reduces long channel openings and gating current slow component. *J Gen Physiol* 124:185-197.
- Heidelberger R, Matthews G (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J Physiol* 447:235-256.
- Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1984) Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311:538-544.
- Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L (1979) Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81:275-300.
- Hienz RD, Stiles P, May BJ (1998) Effects of bilateral olivocochlear lesions on vowel formant discrimination in cats. *Hear Res* 116:10-20.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:497-506.
- Hoshi T, Pantazis A, Olcese R (2013) Transduction of Voltage and Ca²⁺ Signals by Slo1 BK Channels. *Physiology* 28:172-189.
- Howard J, Hudspeth AJ (1988) Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the Bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1:189-199.
- 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.
- Hui E, Bai J, Wang P, Sugimori M, Llinas RR, Chapman ER (2005) Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5210-5214.
- Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K, Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R (2013) Quantitative Localization of Cav2.1 (P/Q-Type) Voltage-Dependent Calcium Channels in Purkinje Cells: Somatodendritic Gradient and Distinct Somatic Coclustering with Calcium-Activated Potassium Channels. *J Neurosci* 33:3668-3678.
- Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T (2000) Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20:59-65.
- Iwasaki S, Takahashi T (2001) Developmental regulation of transmitter release at the calyx of Held in rat auditory brainstem. *J Physiol* 534:861-871.
- Jackman SL, Turecek J, Belinsky JE, Regehr WG (2016) The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* 529:88-91.
- Jensen K, Jensen MS, Lambert JDC (1999) Role of Presynaptic L-Type Ca²⁺ Channels in GABAergic Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Neurons. *J Neurophysiol* 81:1225-1230.
- Johnson SL, Eckrich T, Kuhn S, Zampini V, Franz C, Ranatunga KM, Roberts TP, Masetto S, Knipper M, Kros CJ, Marcotti W (2011) Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat Neurosci* 14:711-717.
- Johnson SL, Kennedy HJ, Holley MC, Fettiplace R, Marcotti W (2012) The Resting Transducer Current Drives Spontaneous Activity in Prehearing Mammalian Cochlear Inner Hair Cells. *J Neurosci* 32:10479-10483.
- Kachar B, Brownell W, Altschuler R, Fex J (1986) Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322:365-368.
- Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144:282-295.

- Kaesler PS, Regehr WG (2017) The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol* 43:63-70.
- Kandler K, Clause A, Noh J (2009) Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. *Nat Neurosci* 12:711-717.
- Katz B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J Physiol* 192:407-436.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Katz E, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs P a, Glowatzki E (2004) Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24:7814-7820.
- 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* 497:687-697.
- Kawase T, Liberman MC (1993) Antimasking effects of the olivocochlear reflex. I. Enhancement of compound action potentials to masked tones. *J Neurophysiol* 70:2519-2532.
- Kiang NYS, Rho JM, Northrop CC, Liberman MC, Ryugo DK (1982) Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science* (80-) 217:175-177.
- Kim SH, Frisina DR, Frisina RD (2002) Effects of age on contralateral suppression of distortion product otoacoustic emissions in human listeners with normal hearing. *Audiol Neuro-Otology* 7:348-357.
- Kimm T, Khaliq ZM, Bean BP (2015) Differential Regulation of Action Potential Shape and Burst-Frequency Firing by BK and Kv2 Channels in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 35:16404-16417.
- Kochubey O, Babai N, Schneggenburger R (2016) A Synaptotagmin Isoform Switch during the Development of an Identified CNS Synapse. *Neuron* 90:984-999.
- Kojima H, Takahashi T (1985) Characterization of miniature inhibitory post-synaptic potentials in rat spinal motoneurons. *J Physiol* 368:627-640.
- Kollmar R, Montgomery LG, Fak J, Henry LJ, Hudspeth AJ (1997) Predominance of the alpha1D subunit in L-type voltage-gated Ca²⁺ channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14883-14888.
- Kong JH, Zachary S, Rohmann KN, Fuchs PA (2013) Retrograde facilitation of efferent synapses on cochlear hair cells. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol* 14:17-27.
- Kros CJ, Ruppersberg J, Rüscher A (1998) Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 2:281-284.
- Kume H, Fukunaga K, Oguma T (2015) Research and development of bronchodilators for asthma and COPD with a focus on G protein/KCa channel linkage and β 2-adrenergic intrinsic efficacy. *Pharmacol Ther* 156:75-89.
- Kusch V, Bornschein G, Loreth D, Bank J, Jordan J, Baur D, Watanabe M, Kulik A, Heckmann M, Eilers J, Schmidt H (2018) Munc13-3 Is Required for the Developmental Localization of Ca²⁺ Channels to Active Zones and the Nanopositioning of Ca^v 2.1 Near Release Sensors. *Cell Rep* 22:1965-1973.
- Lai MH, Wu Y, Gao Z, Anderson ME, Dalziel JE, Meredith AL (2014) BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. *Am J Physiol Circ Physiol* 307:H1327-H1338.
- Lancaster B, Nicoll RA (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 389:187-203.
- Latorre R, Brauchi S (2006) Large conductance Ca²⁺-activated K⁺(BK) channel: activation by Ca²⁺ and voltage. *Biol Res* 39:385-401.
- Latorre R, Vergara C, Hidalgo C (1982) Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:805-809.
- Lauer AM, Fuchs P a, Ryugo DK, Francis HW (2012) Efferent synapses return to inner hair

- cells in the aging cochlea. *Neurobiol Aging* 33:2892-2902.
- Le Prell CG, Dolan DF, Hughes LF, Altschuler RA, Shore SE, Bledsoe SCB (2014) Disruption of lateral olivocochlear neurons with a dopaminergic neurotoxin depresses spontaneous auditory nerve activity. *Neurosci Lett* 582:54-58.
- Lee J-H, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klöckner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and Expression of a Novel Member of the Low Voltage-Activated T-Type Calcium Channel Family. *J Neurosci* 19:1912-1921.
- Li L, Bischofberger J, Jonas P (2007a) Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27:13420-13429.
- Li Q, Yan J (2016) Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits. En: *Big on BK: Current Insights into the Function of Large Conductance Voltage- and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels at the Molecular, Cellular and Systemic Levels*, 1.^a ed. (Contet C, ed), pp 51-90. Elsevier Inc.
- Li W, Gao SB, Lv CX, Wu Y, Guo ZH, Ding JP, Xu T (2007b) Characterization of voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Cell Physiol* 212:348-357.
- Lieberman M, Dodds L, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443-460.
- Lieberman MC (1980) Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: An electron-microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:45-63.
- Lieberman MC, Liberman LD, Maison SF (2014) Efferent Feedback Slows Cochlear Aging. *J Neurosci* 34:4599-4607.
- Liley AW, North KAK (1953) An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 16:509-527.
- Lin Y, McDonough SI, Lipscombe D (2004) Alternative splicing in the voltage-sensing region of N-Type CaV2.2 channels modulates channel kinetics. *J Neurophysiol* 92:2820-2830.
- Lioudyno M, Hiel H, Kong J, Katz E, Waldman E, Parameshwaran-Iyer S, Glowatzki E, Fuchs PA (2004) A «synaptoplasmic cistern» mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci* 24:11160-11164.
- Lipscombe D, Allen SE, Toro CP (2013) Control of neuronal voltage-gated calcium ion channels from RNA to protein. *Trends Neurosci* 36:598-609.
- Liu C, Glowatzki E, Fuchs PA (2015) Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proc Natl Acad Sci* 112:14723-14727.
- Llinás 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.
- Llinás R, Steinberg IZ, Walton K (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 33:323-351.
- Llinás R, Sugimori M, Cherksey B (1989) Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci* 560:103-111.
- Llinás R, Sugimori M, Silver R (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* (80-) 256:677-679.
- Llinás R, Sugimori M, Simon S (1982) Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2415-2419.
- Loane DJ, Lima PA, Marrion N (2007) Co-assembly of N-type Ca²⁺ and BK channels underlies functional coupling in rat brain. *J Cell Sci* 120:985-995.
- Lopez-Poveda EA (2018) Olivocochlear efferents in animals and humans: From anatomy to clinical relevance. *Front Neurol* 9:1-18.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L (2006) MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* 570:65-72.
- Luo L, Bennett T, Jung H, Ryan A (1998) Developmental expression of alpha 9 acetylcholine receptor mRNA in the rat cochlea and vestibular inner ear. *J Comp Neurol* 393:320-331.
- Ma Z, Lou X, Horrigan F (2006) Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *J Gen Physiol* 127:309-328.
- Magleby KL (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen*

- Physiol 121:81-96.
- Maison SF, Liu X-P, Eatock RA, Sibley DR, Grandy DK, Liberman MC (2012) Dopaminergic Signaling in the Cochlea: Receptor Expression Patterns and Deletion Phenotypes. *J Neurosci* 32:344-355.
- Maison SF, Liu XP, Vetter DE, Eatock RA, Nathanson NM, Wess J, Liberman MC (2010) Muscarinic Signaling in the Cochlea: Presynaptic and Postsynaptic Effects on Efferent Feedback and Afferent Excitability. *J Neurosci* 30:6751-6762.
- Maison SF, Pyott SJ, Meredith AL, Liberman MC (2013) Olivocochlear suppression of outer hair cells in vivo: evidence for combined action of BK and SK2 channels throughout the cochlea. *J Neurophysiol* 109:1525-1534.
- Malgrange B, Rigo JM, Lefebvre PP, Coucke P, Goffin F, Xhaufaire G, Belachew S, Van De Water TR, Moonen G (1997) Diazepam-insensitive GABA(A) receptors on postnatal spiral ganglion neurones in culture. *Neuroreport* 8:591-596.
- Mallart A, Martin AR (1967) An analysis of facilitation of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 193:679-694.
- Mallart A, Martin AR (1968) The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 196:593-604.
- Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, Kros CJ (2003a) Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J Physiol* 548:383-400.
- Marcotti W, Johnson SL, Rüsçh A, Kros CJ (2003b) Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 552:743-761.
- Marcotti W, Kros CJ (1999) Developmental expression of the potassium current I_{K} , n contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* 520.3:653-660.
- Marrion N, Tavalin S (1998) Selective activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature* 395:900-905.
- Martinez-Monedero R, Liu C, Weisz C, Vyas P, Fuchs PA, Glowatzki E (2016) GluA2-Containing AMPA Receptors Distinguish Ribbon-Associated from Ribbonless Afferent Contacts on Rat Cochlear Hair Cells. *eNeuro* 3.
- Matthews EA, Weible AP, Shah S, Disterhoft JF (2008) The BK-mediated fAHP is modulated by learning a hippocampus-dependent task. *Proc Natl Acad Sci* 105:15154-15159.
- Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812-822.
- May BJ, Budelis J, Niparko JK (2004) Behavioral Studies of the Olivocochlear Efferent System: Learning to Listen in Noise. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg* 130:660-664.
- May BJ, McQuone SJ (1995) Effects of Bilateral Olivocochlear Lesions on Pure-Tone Intensity Discrimination in Cats. *Audit Neurosci* 1:385-400.
- McKay SM, Oleskevich S (2007) The role of spontaneous activity in development of the endbulb of Held synapse. *Hear Res* 230:53-63.
- Meera P, Wallner M, Song M, Toro L (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K^{+} channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14066-14071.
- Mennerick S, Matthews G (1996) Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuron* 17:1241-1249.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW (2004) Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *J Biol Chem* 279:36746-36752.
- Meredith AL, Wiler SW, Miller BH, Takahashi JS, Fodor AA, Ruby NF, Aldrich RW (2006) BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat Neurosci* 9:1041-1049.
- Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egnér A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12:444-453.

- Meyer AC, Moser T (2010) Structure and function of cochlear afferent innervation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 18:441-446.
- Middlemiss D, Spedding M (1985) A functional correlate for the dihydropyridine binding site in rat brain. *Nature* 314:94-96.
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340:230-233.
- Mintz I, Adams M, Bean B (1992a) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85-95.
- Mintz I, Venema V, Swiderek K, Lee T, Bean B, Adams M (1992b) P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 355:827-829.
- Moglie MJ, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Goutman JD (2018) Compartmentalization of antagonistic Ca²⁺ signals in developing cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci* 115:E2095-E2104.
- Momiyama A, Takahashi T (1994) Calcium channels responsible for potassium-induced transmitter release at rat cerebellar synapses. *J Physiol* 476:197-202.
- Montgomery JR, Meredith AL (2012) Genetic activation of BK currents in vivo generates bidirectional effects on neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci* 109:18997-19002.
- Mori Y, Friedrich T, Kim M, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350:398-402.
- Morley B, 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.
- Moser T, Brandt A, Lysakowski A (2006) Hair cell ribbon synapses. *Cell Tissue Res* 326:347-359.
- Mostafapour S, Cochrane S, Del Puerto N, Rubel E (2000) Patterns of cell death in mouse anteroventral cochlear nucleus neurons after unilateral cochlea removal. *J Comp Neurol* 426:561-571.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET (2002) Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 22:654-665.
- Müller A, Kukley M, Uebachs M, Beck H, Dietrich D (2007) Nanodomains of single Ca²⁺ channels contribute to action potential repolarization in cortical neurons. *J Neurosci* 27:483-495.
- Müller M, Genç Ö, Davis GW (2015) RIM-binding protein links synaptic homeostasis to the stabilization and replenishment of high release probability vesicles. *Neuron* 85:1056-1069.
- Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y (2001) Inactivity Produces Increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size. *Neuron* 32:673-682.
- Nakagawa T, Yamashita M, Hisashi K, Usami SI, Kakazu Y, Shibata S, Nakashima T, Koike K, Kubo K, Komune S (2005) GABA-induced response in spiral ganglion cells acutely isolated from guinea pig cochlea. *Neurosci Res* 53:396-403.
- Nakamura Y, Harada H, Kamasawa N, Matsui K, Rothman JS, Shigemoto R, Silver RA, DiGregorio D a., Takahashi T (2015) Nanoscale Distribution of Presynaptic Ca²⁺ Channels and Its Impact on Vesicular Release during Development. *Neuron* 85:145-159.
- Nanou E, Catterall WA (2018) Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* 98:466-481.
- Neher E (2015) Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles. *Neuron* 87:1131-1142.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron* 59:861-872.
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo J, Dooley D, Nadasdi L, Tsien R, Lemos J (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37:15353-15362.
- Nimigean CM, Chappie JS, Miller C (2003) Electrostatic Tuning of Ion Conductance in

- Potassium Channels. *Biochemistry* 42:9263-9268.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:295-322.
- Nouvian R, Eybalin M, Puel JL (2015) Cochlear efferents in developing adult and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 361:301-309.
- Nowycky M, Fox A, Tsien R (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Oatman LC, Anderson BW (1977) Effects of visual attention on tone burst evoked auditory potentials. *Exp Neurol* 57:200-211.
- Oleskevich S, Clements J, Walmsley B (2000) Release probability modulates short-term plasticity at a rat giant terminal. *J Physiol* 524:513-523.
- Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppersberg J, Fakler B (2000) Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595-601.
- Oliver D, Taberner AM, Thurm H, Sausbier M, Arntz C, Ruth P, Fakler B, Liberman MC (2006) The Role of BKCa Channels in Electrical Signal Encoding in the Mammalian Auditory Periphery. *J Neurosci* 26:6181-6189.
- Olivera B, Miljanich G, Ramachandran J, Adams ME (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The omega-Conotoxins and omega-Agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867.
- Orio P, Rojas P, Ferreira G, Latorre R (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* 17:156-161.
- Palade G, Palay S (1954) Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat Rec* 118:335-336.
- Palmer A, Russell I (1986) Phase-locking in the cochlear nerve of the guinea-pig and its relation to the receptor potential of inner hair-cells. *Hear Res* 24:1-15.
- Pan B, Akyuz N, Liu XP, Asai Y, Nist-Lund C, Kurima K, Derfler BH, György B, Limapichat W, Walujkar S, Wimalasena LN, Sotomayor M, Corey DP, Holt JR (2018) TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron* 99:736-753.e6.
- Pan B, Zucker RS (2009) A General Model of Synaptic Transmission and Short-Term Plasticity. *Neuron* 62:539-554.
- Pantazis A, Olcese R (2012) Relative transmembrane segment rearrangements during BK channel activation resolved by structurally assigned fluorophore-quencher pairing. *J Gen Physiol* 140:207-218.
- Parthasarathy TK (2001) Aging and contralateral suppression effects on transient evoked otoacoustic emissions. *J Am Acad Audiol* 12:80-85.
- Perez-Reyes E (2003) Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Perez-Reyes E, Cribbs L, Daud A, Lacerda A, Barclay J, Williamson M, Fox M, Rees M, Lee J (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Perkins RE, Morest DK (1975) A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski optics. *J Comp Neurol* 163:129-158.
- Perney TM, Hirning LD, Leeman SE, Miller RJ (1986) Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci* 83:6656-6659.
- 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.
- Purves D (2004) *Neuroscience* (Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM, eds), Third Edit. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.

- Pyott SJ, Duncan RK (2016) BK Channels in the Vertebrate Inner Ear. En: Big on BK: Current Insights into the Function of Large Conductance Voltage- and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels at the Molecular, Cellular and Systemic Levels, 1.^a ed. (Contet C, ed), pp 369-399. Elsevier Inc.
- Pyott SJ, Meredith AL, Fodor A a, Vázquez AE, Yamoah EN, Aldrich RW (2007) Cochlear function in mice lacking the BK channel alpha, beta1, or beta4 subunits. *J Biol Chem* 282:3312-3324.
- 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.
- Raingo J, Castiglioni AJ, Lipscombe D (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci* 10:285-292.
- Rajan R (2001) Noise Priming and the Effects of Different Cochlear Centrifugal Pathways on Loud-Sound-Induced Hearing Loss. *J Neurophysiol* 86:1277-1288.
- Rajan R, Johnstone BM (1988) Binaural acoustic stimulation exercises protective effects at the cochlea that mimic the effects of electrical stimulation of an auditory efferent pathway. *Brain Res* 459:241-255.
- Regehr WG (2012) Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005702.
- Rehak R, Bartoletti TM, Engbers JD, Berecki G, Turner RW, Zamponi GW (2013) Low Voltage Activation of KCa1.1 Current by Cav3-KCa1.1 Complexes Dryer SE, ed. *PLoS One* 8:e61844.
- Reuter H (1979) Properties of Two Inward Membrane Currents in the Heart. *Annu Rev Physiol* 41:413-424.
- Ricci A, Fettiplace R (1998) Calcium permeation of the turtle hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph. *J Physiol* 506 (Pt 1:159-173.
- Ricoy UM, Frerking ME (2014) Distinct roles for Ca^v 2.1–2.3 in activity-dependent synaptic dynamics. *J Neurophysiol* 111:2404-2413.
- Ritzau-Jost A, Delvendahl I, Rings A, Byczkiewicz N, Harada H, Shigemoto R, Hirrlinger J, Eilers J, Hallermann S (2014) Ultrafast Action Potentials Mediate Kilohertz Signaling at a Central Synapse. *Neuron* 84:152-163.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6:57-69.
- Roberts WM, Jacobs RA, Hudspeth AJ (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci* 10:3664-3684.
- Robertson J (1956) The ultrastructure of a reptilian myoneural junction. *J Biophys Biochem Cytol* 2:381-394.
- Robitaille R, Adler E, Charlton M (1993a) Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Paris* 87:15-24.
- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP (1993b) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11:645-655.
- Robles Gómez AA, Vega A V., González-Sandoval C, Barral J (2018) The role of Ca²⁺-dependent K⁺ channels at the rat corticostriatal synapses revealed by paired pulse stimulation. *Synapse* 72:e22017.
- Robles L, Ruggero M a (2001) Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81:1305-1352.
- Rohmann KN, Wersinger E, Braude JP, Pyott SJ, Fuchs PA (2015) Activation of BK and SK Channels by Efferent Synapses on Outer Hair Cells in High-Frequency Regions of the Rodent Cochlea. *J Neurosci* 35:1821-1830.
- 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.

- Rothberg BS, Magleby KL (1999) Gating kinetics of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in high Ca^{2+} suggest a two-tiered allosteric gating mechanism. *J Gen Physiol* 114:93-124.
- Roux I, Wersinger E, McIntosh JM, Fuchs P a, Glowatzki E (2011) Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J Neurosci* 31:15092-15101.
- Ruel J, Nouvian R, Gervais d'Aldin C, Pujol R, Eybalin M, Puel JL (2001) Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. *Eur J Neurosci* 14:977-986.
- Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel J-L (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res* 227:19-27.
- Russell I, Murugasu E (1997) Medial efferent inhibition suppresses basilar membrane responses to near characteristic frequency tones of moderate to high intensities. *J Acoust Soc Am* 102:1734-1738.
- Rusu SI, Borst JGG (2011) Developmental changes in intrinsic excitability of principal neurons in the rat medial nucleus of the trapezoid body. *Dev Neurobiol* 71:284-295.
- Ruth P, Röhrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer H, Flockerzi V, Hofmann F (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* (80-) 245:1115-1118.
- Rüttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Müller M, Kopschall I, Pfister M, Munkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rusch A, Ruth P, Knipper M (2004) Deletion of the Ca^{2+} -activated potassium (BK) - subunit but not the BK 1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc Natl Acad Sci* 101:12922-12927.
- Sakaba T (2008) Two Ca^{2+} -Dependent Steps Controlling Synaptic Vesicle Fusion and Replenishment at the Cerebellar Basket Cell Terminal. *Neuron* 57:406-419.
- Sakaba T, Neher E (2001) Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron* 32:1119-1131.
- Saldaña E (2015) All the Way from the Cortex: a Review of Auditory Corticosubcollicular Pathways. *The cerebellum* 14:584-596.
- 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.
- Sausbier M et al. (2005) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 112:60-68.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus H-GH, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P (2004) Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^{+} channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 101:9474-9478.
- Sausbier M, Zhou X-B, Beier C, Sausbier U, Wolpers D, Maget S, Martin C, Dietrich A, Rössmeier A-R, Renz H, Schlossmann J, Hofmann F, Neuhuber W, Gudermann T, Uhlir S, Korth M, Ruth P (2007) Reduced rather than enhanced cholinergic airway constriction in mice with ablation of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *FASEB J* 21:812-822.
- Sausbier U, Dullin C, Missbach-Guentner J, Kabagema C, Flockerzi K, Kuscher GM, Stuehmer W, Neuhuber W, Ruth P, Alves F, Sausbier M (2011) Osteopenia Due to Enhanced Cathepsin K Release by BK Channel Ablation in Osteoclasts Gimble JM, ed. *PLoS One* 6:e21168.
- Scheuss V, Schneggenburger R, Neher E (2002) Separation of presynaptic and postsynaptic contributions to depression by covariance analysis of successive EPSCs at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* 22:728-739.
- Schikorski T, Stevens CF (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci* 4:391-395.
- Schneggenburger R, Meyer A, 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.
- Schofield BR (2011) Central descending auditory pathways. En: *Auditory and Vestibular Efferents* (Ryugo DK, Fay RR, Popper AN, eds), pp 262-289. Springer.
- Schreiber M, Yuan A, Salkoff L (1999) Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci* 2:416-421.
- Schrott-Fischer A, Kammen-Jolly K, Scholtz A, Rask-Andersen H, Glueckert R, Eybalin M (2007) Efferent neurotransmitters in the human cochlea and vestibule. *Acta Otolaryngol* 127:13-19.
- Sclip A, Acuna C, Luo F, Südhof TC (2018) RIM-binding proteins recruit BK-channels to presynaptic release sites adjacent to voltage-gated Ca²⁺-channels. *EMBO J*:e98637.
- Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* 57:263-275.
- Sendin G, Bourien J, Rassendren F, Puel J-L, Nouvian R (2014) Spatiotemporal pattern of action potential firing in developing inner hair cells of the mouse cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:1999-2004.
- Sewell W (2011) Pharmacology and Neurochemistry of Olivocochlear Efferents. En: *Auditory and Vestibular Efferents* (Ryugo DK, Fay RR, Popper AN, eds), pp 83-101. Springer.
- Shao LR, Halvorsrud R, Borg-Graham L, Storm JF (1999) The role of BK-type Ca²⁺-dependent K⁺ channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 521 Pt 1:135-146.
- Sharp AH, Campbell KP (1989) Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J Biol Chem* 264:2816-2825.
- Shefner SA, Levy RA (1981) The contribution of increases in extracellular potassium to primary afferent depolarization in the bullfrog spinal cord. *Brain Res* 205:321-335.
- Shen KZ, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP, North RA (1994) Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: Evidence for tetrameric channel formation. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 426:440-445.
- Shnerson A, Devigne C, Pujol R (1982) Age-related changes in the C57BL/6J mouse cochlea. II. Ultrastructural findings. *Dev Brain Res* 2:77-88.
- Shnerson A, Pujol R (1982) Age-related changes in the C57BL/6J mouse cochlea. I. Physiological findings. *Dev Brain Res* 2:65-75.
- Shotwell SL, Jacobs R, Hudspeth AJ (1981) Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles. *Ann N Y Acad Sci* 374:1-10.
- Simmons DD (2002) Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53:228-250.
- 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, Morley B (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.
- Simms BA, Zamponi GW (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82:24-45.
- Skinner LJ, Enée V, Beurg M, Jung HH, Ryan AF, Hafidi A, Aran J-M, Dulon D (2003) Contribution of BK Ca²⁺-Activated K⁺ Channels to Auditory Neurotransmission in the Guinea Pig Cochlea. *J Neurophysiol* 90:320-332.
- Smith CA, Sjöstrand FS (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J Ultrastructure Res* 5:184-192.
- Snutch T, Reiner P (1992) Calcium channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 2:247-253.
- Snutch TP, Peloquin J, Mathews E, McRory JE (2005) Molecular Properties of Voltage-Gated

- Calcium Channels. En: Voltage-Gated Calcium Channels, 1.^a ed. (Zamponi GW, ed), pp 61-94. Boston, MA: Springer US.
- Sobkowicz H, Emmerling M (1989) Development of acetylcholinesterase-positive neuronal pathways in the cochlea of the mouse. *J Neurocytol* 18:209-224.
- Soong T, Stea A, Hodson C, Dubel S, Vincent S, Snutch T (1994) Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* (80-) 260:1133-1136.
- Speed HE, Dobrunz LE (2008) Developmental Decrease in Short-Term Facilitation at Schaffer Collateral Synapses in Hippocampus Is mGluR1 Sensitive. *J Neurophysiol* 99:799-813.
- Spoendlin H (1975) Neuroanatomical basis of cochlear coding mechanisms. *Int J Audiol* 14:383-407.
- Spoendlin H (1979) Sensory neural organization of the cochlea. *J Laryngol Otol* 93:853-877.
- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P, Sausbier M (2009) Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *FEBS J* 276:1680-1697.
- Stanley EF, Atrakchi AH (1990) Calcium currents recorded from a vertebrate presynaptic nerve terminal are resistant to the dihydropyridine nifedipine. *Proc Natl Acad Sci* 87:9683-9687.
- Stevens CF, Williams JH (2007) Discharge of the Readily Releasable Pool With Action Potentials at Hippocampal Synapses. *J Neurophysiol* 98:3221-3229.
- Storm JF (1987a) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385:733-759.
- Storm JF (1987b) Intracellular injection of a Ca²⁺ chelator inhibits spike repolarization in hippocampal neurons. *Brain Res* 435:387-392.
- Südhof TC (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011353.
- Sugita S, Han W, Butz S, Liu X, Fernández-Chacón R, Lao Y, Südhof TC (2001) Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca²⁺ sensor in exocytosis. *Neuron* 30:459-473.
- Sugiura Y, Ko CP (1997) Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17:1101-1111.
- Sun JY, Wu LG (2001) Fast kinetics of exocytosis revealed by simultaneous measurements of presynaptic capacitance and postsynaptic currents at a central synapse. *Neuron* 30:171-182.
- 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 T-B, 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 M, Jones J, Reber B, Catterall W a (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482.
- Takahashi T (2015) Strength and precision of neurotransmission at mammalian presynaptic terminals. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91:305-320.
- Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156-158.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Tang YG, Schlumpberger T, Kim TS, Lueker M, Zucker RS (2000) Effects of mobile buffers on facilitation: Experimental and computational studies. *Biophys J* 78:2735-2751.
- Taranda J, Maison SF, Ballesterro JA, Katz E, Savino J, Vetter DE, Boulter J, Liberman MC, Fuchs PA, Elgoyhen AB (2009) A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biol* 7.

- Taschenberger H, Leão RM, Rowland KC, Spirou GA, Von Gersdorff H (2002) Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* 36:1127-1143.
- 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.
- Terreros G, Delano PH (2015) Corticofugal modulation of peripheral auditory responses. *Front Syst Neurosci* 9.
- Thaler C, Gray AC, Lipscombe D (2004) Cumulative inactivation of N-type CaV2.2 calcium channels modified by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci* 101:5675-5679.
- Thalhammer A, Contestabile A, Ermolyuk YS, Ng T, Volynski KE, Soong TW, Goda Y, Cingolani LA (2017) Alternative Splicing of P/Q-Type Ca²⁺ Channels Shapes Presynaptic Plasticity. *Cell Rep* 20:333-343.
- Thanawala MS, Regehr WG (2016) Determining synaptic parameters using high-frequency activation. *J Neurosci Methods* 264:136-152.
- Tollin DJ (2003) The Lateral Superior Olive: A Functional Role in Sound Source Localization. *Neurosci* 9:127-143.
- Torborg CL, Feller MB (2005) Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol* 76:213-235.
- Torres YP, Morera FJ, Carvacho I, Latorre R (2007) A marriage of convenience: beta-subunits and voltage-dependent K⁺ channels. *J Biol Chem* 282:24485-24489.
- Tritsch NX, Bergles DE (2010) Developmental regulation of spontaneous activity in the mammalian cochlea. *J Neurosci* 30:1539-1550.
- Tritsch NX, Rodríguez-contreras A, Crins TTH, Wang HC, Borst JG, Bergles DE, Rodríguez-Contreras A (2010) Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat Neurosci* 13:1050-1052.
- 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.
- Trussell LO, Zhang S, Ramant IM (1993) Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release. *Neuron* 10:1185-1196.
- Tsien R, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431-438.
- 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.
- Vattino LG, Elgoyhen AB, Katz E (2018) Presynaptic voltage-gated Ca²⁺ channels differentially contribute to transmitter release at the mouse medial olivocochlear-outer hair cell synapse at two postnatal stages. En: 41st Annual MidWinter Meeting of the Association of Research in Otolaryngology, pp 449-450.
- von Békésy G (1952) DC Resting Potentials Inside the Cochlear Partition. *J Acoust Soc Am* 24:72.
- Wadiche JI, Jahr CE (2001) Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32:301-313.
- 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.
- Wakamori M, Mikala G, Mori Y (1999) Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca²⁺ channel current in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 517:659-672.
- Wang HC, Lin CC, Cheung R, Zhang-Hooks Y, Agarwal A, Ellis-Davies G, Rock J, Bergles DE (2015) Spontaneous Activity of Cochlear Hair Cells Triggered by Fluid Secretion Mechanism in Adjacent Support Cells. *Cell* 163:1348-1359.
- Wang L, Sigworth FJ (2009) Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature* 461:292-295.
- Wang Y, Manis PB (2008) Short-Term Synaptic Depression and Recovery at the Mature

- Mammalian Endbulb of Held Synapse in Mice. *J Neurophysiol* 100:1255-1264.
- Wang ZW (2008) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CAMKII and BK channels. *Mol Neurobiol* 38:153-166.
- Warr W, Guinan JJ (1979) Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res* 173:152-155.
- Warr WB (1975) Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: Their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J Comp Neurol* 161:159-181.
- Wedemeyer C, Zorrilla de San Martin J, Ballesterro J, Gomez-Casati ME, Torbidoni A V., Fuchs PA, Bettler B, Elgoyhen AB, Katz E (2013) Activation of Presynaptic GABAB(1a,2) Receptors Inhibits Synaptic Transmission at Mammalian Inhibitory Cholinergic Olivocochlear-Hair Cell Synapses. *J Neurosci* 33:15477-15487.
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E (2002) The alpha9alpha10 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.
- Weisz CJC, Lehar M, Hiel H, Glowatzki E, Fuchs PA (2012) Synaptic transfer from outer hair cells to type II afferent fibers in the rat cochlea. *J Neurosci* 32:9528-9536.
- Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT (2005) Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol* 567:545-556.
- Wersinger E, McLean WJ, Fuchs PA, Pyott SJ (2010) BK channels mediate cholinergic inhibition of high frequency cochlear hair cells. *PLoS One* 5.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* (80-) 264:107-111.
- Wiederhold M, Kiang N (1970) Effects of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on cat single auditory nerve fibers. *J Acoust Soc Am* 48:950-965.
- Williams M, Brust P, Feldman D, Patthi S, Simerson S, Moroufi A, McCue A, Velicelebi G, Ellis S, Harpold M (1992a) Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* (80-) 257:389-395.
- Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992b) Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8:71-84.
- Winslow RL, Sachs MB (1987) Effect of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on auditory nerve response to tones in noise. *J Neurophysiol* 57:1002-1021.
- Wu LG, Borst JGG, Sakmann B (1998) R-type Ca²⁺ currents evoke transmitter release at a rat. *J Neurosci* 95:4720-4725.
- 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.
- Xia X-M, Zeng X, Lingle CJ (2002) Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 418:880-884.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2004) Structural Contributions to Short-Term Synaptic Plasticity. *Physiol Rev* 84:69-85.
- Yamamoto Y, Matsubara A, Ishii K, Makinae K, Sasaki A, Shinkawa H (2002) Localization of gamma-aminobutyric acid a receptor subunits in the rat spiral ganglion and organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 122:709-714.
- Yan J, Aldrich RW (2012) BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci* 109:7917-7922.
- Yang J, Eillnor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW (1993) Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* 366:158-161.
- Yang S, Berggren P (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:621-676.

- Yang Y-MM, Fedchyshyn MJ, Grande G, Aitoubah J, Tsang CW, Xie H, Ackerley CA, Trimble WS, Wang L-Y (2010) Septins regulate developmental switching from microdomain to nanodomain coupling of Ca²⁺ influx to neurotransmitter release at a central synapse. *Neuron* 67:100-115.
- Ye Z, Goutman JD, Pyott SJ, Glowatzki E (2017) mGluR1 enhances efferent inhibition of inner hair cells in the developing rat cochlea. *J Physiol* 595:3483-3495.
- Yu CR, Power J, Barnea G, O'Donnell S, Brown HEV, Osborne J, Axel R, Gogos JA (2004) Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 42:553-566.
- Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R (2010) Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science* (80-) 329:182-186.
- Zachary S, Fuchs PA (2014) Age related hearing loss is accompanied by efferent innervation of inner hair cells. *Assoc Res Otolaryngol* 37:288-289.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67:821-870.
- Zhang J, Yan J (2014) Regulation of BK channels by auxiliary γ subunits. *Front Physiol* 5:1-7.
- Zorrilla de San Martín J, Alvarez Heduan F, Elgoyhen AB, Katz E (2012) Functional development of the medial olivocochlear efferent innervation before the onset of hearing. *En: Association for Research in Otolaryngology*, pp 265-266.
- Zorrilla de San Martín J, Pyott SJ, Ballesterero J, Katz E (2010) Ca²⁺ and Ca²⁺-activated K⁺ channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *J Neurosci* 30:12157-12167.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.