



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Propiedades funcionales y moleculares de la sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo postnatal”

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

Lic. Lucas Gabriel Vattino

Directora de Tesis: Dra. Eleonora Katz

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular, "Dr. Hector N. Torres" (INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Abril 2019

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

Wedemeyer C*, **Vattino LG***, Moglie MJ, Ballestero J, Maison SF, Guilmi MN Di, Taranda J, Liberman MC, Fuchs PA, Katz E, Elgoyhen AB (2018) A Gain-of-Function Mutation in the $\alpha 9$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Alters Medial Olivocochlear Efferent Short-Term Synaptic Plasticity. J Neurosci 38:3939–3954.

* igual contribución

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires y, especialmente, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme una formación de primer nivel y enseñarme a cuestionarlo todo. Al CONICET, por financiar mi formación doctoral. Al INGEBI y sus integrantes, por generar el ambiente de trabajo apropiado para desarrollar un trabajo científico de calidad, aún en tiempos tan duros para la Ciencia.

A Eleonora, por la confianza y dedicación, el invaluable apoyo a lo largo de este camino y el compromiso en mi formación científica. Gracias por la paciencia cuando las cosas no salían y por el impulso cada vez que fue necesario. Espero haber estado a la altura.

A Belén, por el apoyo a este proyecto, los consejos y el genuino interés en el desarrollo de mi carrera científica. Gracias por el esfuerzo invertido en la construcción de este gran grupo de trabajo del que aprendo día a día, y por permitirme formar parte.

A Guchi, por la sinceridad ante todo, por dudar y hacerme dudar, por obligarme a buscar en los manuales. Gracias por el profesionalismo y la seriedad demostrados en todo momento. Gracias por la ayuda técnica cada vez que fue necesaria. Un ejemplo a seguir.

A Mariano, por la honestidad, los consejos y la eterna predisposición para discutir resultados. Gracias por el empuje y la perseverancia, y por la ayuda para resolver cualquier problema. Gracias por la paciencia infinita demostrada desde el primer día al explicarme las bases del potencial de acción, allá por el 2009. Gracias por tu compañía en todos estos años.

A Caro, por el compañerismo y el apoyo incondicional en los momentos más difíciles. Gracias por la afectuosa contención, por estar siempre al pie del cañón lista para cualquier conversación. Gracias por el aporte fundamental en la unión de este grupo de trabajo.

A Marce, excelso compañero y fuente de inspiración, gracias por estar ahí siempre para discutir resultados, ideas, proyectos. Gracias por marcar el camino, por no conformarte y querer patear el tablero. A Lucho, por la risa cómplice que me saca de cualquier pozo depresivo y por la franqueza a la hora de decir las cosas. A Agus, agente del caos, gracias por la alegría de todos los días, el reporte tecnológico y el consejo financiero. Fue un placer compartir estos años junto a ustedes, los mejores compañeros de trabajo que uno puede pedir, ahora amigos.

Al resto del laboratorio, por hacer que cada día sea un placer venir a trabajar. A Sofi, por tener siempre la respuesta irreverente y filosa en la punta de la lengua. A Tais, Pau, Vivi y Clau, por la buena onda y las sonrisas de cada mañana. A Clau especialmente por facilitar el trabajo de todos los días. A las chicas de FMED por el aguante incondicional. A Grace, por ayudarme a dar los primeros pasos.

A todo el personal de apoyo del INGEBI por su dedicación y compromiso para hacer posible nuestro trabajo a diario. Especialmente a Norma y Rubén, por su predisposición para dar una mano siempre, por los mates, empanadas, la sopa paraguaya y las birras.

A lxs amigxs que me dio la FCEN, gracias por la compañía a lo largo de todos estos años. A Nico, por su dedicación en la tarea científica que sirve como inspiración, por su honestidad, su apoyo y por ser mi handyman personal. A Pau, por el cariño demostrado a fuerza de incontables birras de descarga, por la contención y por las charlas francas en los momentos más necesarios. A Marcos, mi amigo de la Ciencia con el que ya no hablo de Ciencia, por el apoyo durante este proceso y por las anécdotas cosechadas. A Gus, por la motivadora curiosidad y los sabios consejos. A Melu, por soportar estoicamente el cariño en forma de bullying. A Dai y Ali, Ali y Dai, o Dali y Dali, por su cariño y por acompañar la transición del pampero al chupín, obligándome a reírme de mi mismo. A todxs ustedes por tolerar mi humor negro, a veces sin compartirlo.

Al grupo de escritura de Tesis, que a fuerza de comida y risas hizo que estar encerrado la mitad de diciembre y todo enero fuera menos doloroso.

A mis amigos de siempre, Lean, Chaco y Mati, por tantos años compartidos. Por las anécdotas pasadas y las que vendrán. Con ustedes todo es más fácil.

A mi familia núcleo, mamá, papá y hermana, por el apoyo a lo largo de toda mi carrera, y durante este doctorado en particular. Gracias por comprender mis ausencias. A mi familia política, Flavia y Marcelo, por su genuino interés en mi desarrollo profesional y toda la ayuda brindada.

A Iri, la mejor compañera en este camino, gracias por la inagotable paciencia, por apoyar mis decisiones, por creer en mí y cuestionar lo que corresponde. Cualquier cosa que escriba acá va a ser insuficiente. Gracias infinitas.

Resumen

“Propiedades funcionales y moleculares de la sinapsis eferente olivococlear durante el desarrollo postnatal”

En el órgano de Corti, el epitelio sensorial del sistema auditivo de los mamíferos ubicado dentro de la cóclea, se encuentran las células ciliadas internas y externas (CCIs y CCEs, respectivamente). Ambos tipos celulares se despolarizan en respuesta a la llegada de estímulos sonoros, pero sus funciones están claramente diferenciadas. Las CCIs, los fonorreceptores propiamente dichos, transducen los estímulos sonoros en señales eléctricas que son enviadas al sistema nervioso central (SNC) mientras que las CCEs, debido a su propiedad electromótil dependiente del voltaje, están principalmente involucradas en la amplificación y la sintonización fina de estos estímulos. La actividad de las CCEs es modulada a través del sistema olivococlear medial (MOC, por sus siglas en inglés), una inervación eferente que se origina en el sistema nervioso central (SNC), a nivel del tallo cerebral. La sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs (sinapsis MOC-CCE) es colinérgica e inhibitoria, ya que está mediada por el receptor colinérgico nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ que se encuentra funcionalmente acoplado a canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} del tipo SK2, resultando en la hiperpolarización y consecuente disminución de la actividad de las CCEs. En el presente trabajo se estudiaron las características moleculares y funcionales de la sinapsis MOC-CCE a través de la realización de registros electrofisiológicos en configuración *whole-cell* en las CCEs presentes en preparaciones del órgano de Corti del ratón, en respuesta a la estimulación eléctrica de las fibras MOC.

En primer lugar, mediante un abordaje experimental farmacológico, se estudiaron las propiedades funcionales y moleculares de la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal. Más precisamente, en los días postnatales (P)11-13, coincidente con el comienzo de la audición en roedores altriciales, y en P20-22, edad en la cual el sistema auditivo de estos animales ha madurado. Se demostró que tanto la composición molecular de los canales iónicos que sostienen o modulan la liberación de acetilcolina en la sinapsis MOC-CCE así como las propiedades de la transmisión sináptica sufren cambios entre dichos períodos. También se encontraron evidencias de que hay cambios en el grado de compartimentalización de las proteínas presinápticas involucradas en la liberación del neurotransmisor

entre ambos períodos, lo que sugiere una maduración sináptica incompleta al momento del comienzo de la audición.

En segundo lugar, se estudiaron las implicancias sobre la transmisión sináptica de una mutación puntual en la subunidad $\alpha 9$ del receptor colinérgico que media la sinapsis eferente MOC-CCE y que le confiere a la misma una ganancia de función. Para ello se utilizó una línea de ratones transgénicos (*L9'T*) desarrollada previamente en nuestro laboratorio, en la que se observó una mayor protección ante el trauma acústico en respuesta a intensidades elevadas de sonido. Valiéndonos de evidencias previas de nuestro laboratorio que indican que la sinapsis MOC-CCE presenta facilitación de corto término en respuesta a altas frecuencias de estimulación, se analizó el patrón de actividad sináptica en respuesta a trenes de estimulación de distinta duración y frecuencia, dentro del rango fisiológico de disparo de las fibras MOC. Se demostró que la plasticidad de corto término en los ratones *L9'T* se encuentra alterada, en consistencia con el fenómeno global de respuestas aumentadas en la vía eferente relacionada a la mayor protección ante el trauma acústico previamente descripta.

Palabras clave: cóclea, células ciliadas, receptor nicotínico, inervación eferente olivococlear, canales iónicos, compartimentalización presináptica, plasticidad sináptica de corto término.

Abstract

“Functional and molecular properties of the medial olivocochlear efferent synapses during postnatal development”

In mammals, the auditory sensory epithelium within the cochlea contains two types of mechanotransducer cells, inner and outer hair cells (IHCs and OHCs, respectively). Even though both cell types depolarize in response to incoming sound stimuli, they have different functions. The IHCs, the phonoreceptors proper, are involved in conveying acoustic stimuli to the central nervous system (CNS) while the OHCs are implicated in the fine tuning and amplification of incoming sounds. The OHCs respond to variations in membrane voltage with changes in their length, a phenomenon known as electromotility, causing an enhancement of basilar membrane motion thus increasing the activity of the IHCs in response to sounds. OHCs activity is regulated through the medial olivocochlear (MOC) system, an efferent innervation that originates in the brainstem. The synapse between MOC fibers and the OHCs (MOC-OHC synapse) is cholinergic and inhibitory. This synapse is mediated by the nicotinic cholinergic receptor $\alpha 9\alpha 10$ functionally coupled to SK2 Ca^{2+} -dependent K^+ channels. Thus, acetylcholine (ACh) released from the MOC presynaptic terminals causes OHCs to hyperpolarize, consequently reducing their electromotile activity. In this work we studied the molecular and functional characteristics of the MOC-OHC synapse in the mouse organ of Corti. The research project was carried out by performing “whole-cell” recordings in the OHCs upon electrical stimulation of MOC fibers.

The molecular and functional characteristics of the MOC-OHC synapse during postnatal development were first assessed by combining electrophysiological and pharmacological methods. Synaptic currents were recorded from mice at two developmental stages: around the onset of hearing, postnatal days (P)11-13 in altricial rodents, and at P20-22, when the auditory system of these animals is already mature. We demonstrated that the molecular composition of the ion channels supporting or modulating ACh release at the MOC-OHC synapse undergo significant changes during postnatal development. Moreover, we found strong evidences suggesting changes in the compartmentalization of the presynaptic proteins coupled to ACh release between the two developmental stages studied, indicating that at the onset of hearing the MOC-OHC synapse is still immature.

Secondly, we evaluated the properties of a transgenic mouse model developed in our laboratory, the *L9'T* mice, which bears a point mutation in the $\alpha 9$ subunit of the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. This mutation in the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR greatly enhances and prolongs the inhibitory postsynaptic currents thereby changing the dynamics of the MOC-OHC synapse. Previous work from our laboratory showed that the MOC-OHC synapse presents short-term facilitation in response to high-frequency stimulation. We therefore analyzed the synaptic responses of *L9'T* mice upon MOC fiber stimulation with different frequencies within their physiological firing range, and found that transgenic *L9'T* mice showed altered short-term synaptic plasticity patterns. These results are in agreement with the observed global enhanced responses in the efferent pathway that lead to an increased protection against acoustic trauma in this mouse model.

Keywords: cochlea, hair cells, nicotinic receptor, olivocochlear efferent innervation, ion channels, presynaptic compartmentalization, short-term synaptic plasticity.

ÍNDICE

Abreviaturas	4
INTRODUCCIÓN	5
<i>El sistema auditivo de los mamíferos.....</i>	<i>6</i>
<i>Características generales del sistema auditivo periférico de los mamíferos</i>	<i>6</i>
<i>Transducción del sonido en el sistema auditivo periférico de los mamíferos</i>	<i>6</i>
<i>Transmisión de la información sonora hacia el SNC: inervación aferente.....</i>	<i>12</i>
<i>El rol de las CCEs en el procesamiento de la información auditiva</i>	<i>14</i>
<i>Regulación de la amplificación coclear: inervación eferente sobre la cóclea</i>	<i>20</i>
<i>Desarrollo postnatal en el órgano de Corti.....</i>	<i>25</i>
Transmisión sináptica	29
<i>Fundamentos de la transmisión sináptica.....</i>	<i>29</i>
<i>Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CCDVs).....</i>	<i>32</i>
<i>Excitabilidad neuronal y canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺</i>	<i>34</i>
<i>Plasticidad sináptica de corto término.....</i>	<i>36</i>
OBJETIVOS	41
MATERIALES y MÉTODOS.....	42
<i>Disección del órgano de Corti.....</i>	<i>43</i>
<i>Registros electrofisiológicos.....</i>	<i>44</i>
<i>Estimulación eléctrica de los axones eferentes MOC</i>	<i>45</i>
<i>Estimación del contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE</i>	<i>46</i>
<i>Estimación de las propiedades eléctricas y los parámetros cinéticos de las CCEs.....</i>	<i>48</i>
<i>Protocolos de estimulación de doble pulso y trenes de estimulación</i>	<i>49</i>

<i>Estimación de los parámetros del conjunto de vesículas listas para ser liberadas (RRP).....</i>	50
<i>Drogas, toxinas y reactivos.....</i>	51
<i>Estadística.....</i>	51
RESULTADOS.....	53
<i>Capítulo I - Propiedades funcionales de la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las células ciliadas externas durante el desarrollo postnatal</i>	54
<i>I. Introducción</i>	55
<i>I. Resultados.....</i>	58
<i>Caracterización de la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal.....</i>	58
<i>Canales de Ca²⁺ que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal.....</i>	65
<i>El rol de los CCDVs de tipo L en la sinapsis MOC-CCE.....</i>	69
<i>Acople funcional entre CCDVs de tipo L y canales BK durante el desarrollo postnatal.....</i>	71
<i>Compartimentalización de los componentes presinápticos que participan de la liberación de ACh</i>	73
<i>Modulación de la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCE por los canales BK alrededor del comienzo de la audición</i>	77
<i>Modulación de la transmisión sináptica por GABA en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal.....</i>	81
<i>I. Apéndice de Resultados preliminares</i>	84
<i>I. Discusión</i>	87
<i>Capítulo II - Efecto de una mutación puntual en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ sobre las propiedades funcionales de la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las células ciliadas externas</i>	98
<i>II. Introducción</i>	99

<i>II. Resultados</i>	101
<i>Propiedades de la transmisión sináptica entre las fibras MOC y las CCEs de ratones L9'T. ..</i>	101
<i>Plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE de ratones L9'T.....</i>	102
<i>Efecto de la mutación L9'T sobre la respuesta de la sinapsis MOC-CCE frente a la estimulación de las fibras MOC en el rango fisiológico</i>	109
<i>II. Apéndice de Resultados</i>	115
<i>II. Discusión</i>	121
CONCLUSIONES	128
Bibliografía	131

Abreviaturas

A: amperes	nAChR: receptor colinérgico nicotínico (por sus siglas en inglés, <i>nicotinic acetylcholine receptor</i>)
ACh: acetilcolina	μ X: micro ($X \cdot 10^{-6}$)
ATP: adenosín trifosfato	mX: mili ($X \cdot 10^{-3}$)
BAPTA: ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N', -tetraacético	MOC: olivococlear medial (por sus siglas en inglés, <i>medial olivocochlear</i>)
C: coulombs	min: minutos
CCDVs: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	nX: nano ($X \cdot 10^{-9}$)
CCIs: células ciliadas internas	Ω : ohms
CCEs: células ciliadas externas	pX: pico ($X \cdot 10^{-12}$)
C_m : capacitancia de la membrana plasmática	PX: día postnatal X
CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina (por sus siglas en inglés, <i>calcitonin gene-related peptide</i>)	Q: carga
dB: decibeles	R_m : resistencia de la membrana plasmática
EGTA: ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético	RRP: pool de vesículas listas para ser liberadas (por sus siglas en inglés, <i>readily releasable pool</i>)
E_{rev} o E_x : potencial de reversión, o potencial de reversión de la corriente "x"	s: segundos
F: faradays	SEM: error estándar de la media (por sus siglas en inglés, <i>standard error of the mean</i>)
GABA: ácido γ -aminobutírico (por sus siglas en inglés, <i>γ-aminobutyric acid</i>)	τ : tau (tiempo característico)
Hz: hertz	V: volts
I: corriente	V_m : potencial de membrana
IF: índice de facilitación	V_s : potencial de sostén
IPSCs: corrientes postsinápticas inhibitorias (por sus siglas en inglés, <i>inhibitory postsynaptic currents</i> ; prefijo e: evocadas, por <i>evoked</i> ; prefijo s: espontáneas, por <i>spontaneous</i>)	
M: molar (moles de soluto/litro de solución)	
MX: mega ($X \cdot 10^6$)	

INTRODUCCIÓN

El sistema auditivo de los mamíferos

Características generales del sistema auditivo periférico de los mamíferos

La habilidad de un organismo de sobrevivir en la naturaleza depende en gran medida de desarrollar comportamientos adecuados frente a una multiplicidad de estímulos. Para ello son cruciales los distintos sistemas sensoriales, que permiten decodificar estos estímulos y generar las respuestas comportamentales correspondientes. En particular, el sistema auditivo es capaz de extraer información de los distintos sonidos que rodean a un animal en la naturaleza, resultando de vital importancia para su supervivencia.

En términos físicos, el sonido puede definirse como una onda que se propaga en un medio elástico como consecuencia de la vibración de un objeto. En un medio terrestre, por ejemplo, estas vibraciones generan cambios de presión en el aire con una determinada estructura temporal, propagándose con una amplitud particular que determinará la intensidad del sonido, y con una dada frecuencia, que puede ser única en el caso de un tono puro, o la combinación de varias frecuencias si el sonido es compuesto (Yost, 1993). En este contexto, el sistema auditivo periférico tiene como función convertir las señales mecánicas del ambiente en señales eléctricas que puedan ser procesadas por el sistema nervioso central (SNC).

En la **Figura 1A** se esquematiza el sistema auditivo periférico de los mamíferos. El mismo tiene una exquisita complejidad y sensibilidad, siendo capaz de detectar sonidos en el rango de frecuencias entre 20 Hz y 100 kHz. En particular, el rango audible para el oído humano comprende un rango de frecuencias que va entre 20 Hz y 20 kHz. Su sensibilidad es lo suficientemente alta como para discriminar entre dos tonos puros con diferencias de frecuencia de hasta 0.2%, mientras que en términos de intensidad, es capaz de percibir sonidos con energías en el orden del ruido térmico al que están expuestas las células receptoras del estímulo, de intensidades cercanas a 0 dB (Dallos, 1996).

Transducción del sonido en el sistema auditivo periférico de los mamíferos

La transducción de las ondas sonoras en señales eléctricas tiene lugar en el interior de la cóclea, una estructura ósea en forma de caracol que, junto al sistema vestibular, forma parte del oído interno

(Figura 1A). Sin embargo, previo a este proceso, las ondas de sonido atraviesan el oído externo y oído medio: ingresan por el pabellón auditivo y son conducidas a través del canal auditivo hasta impactar en la membrana timpánica, que divide el oído externo del oído medio. Las vibraciones que en ella se

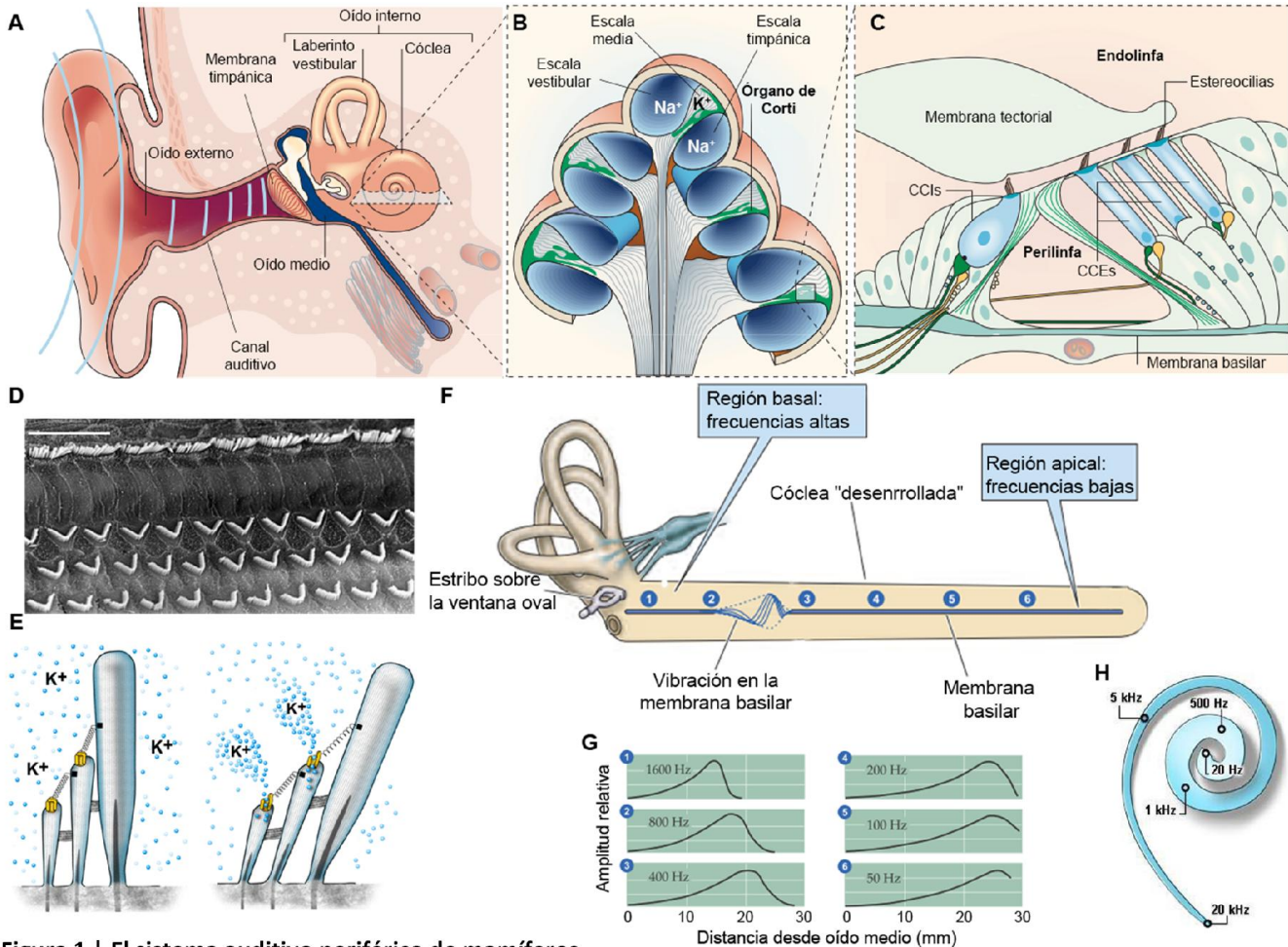


Figura 1 | El sistema auditivo periférico de mamíferos.

A, Estructura general del sistema auditivo periférico de mamíferos, que se divide en oído externo, medio e interno. **B**, Representación de un corte transversal a nivel de la cóclea. Se diferencian tres conductos: las escalas vestibular y timpánica, que presentan un fluido rico en Na^+ denominado perilinfia, y la escala media, conducto lleno de endolinfa, fluido enriquecido en K^+ . **C**, Esquema del órgano de Corti, el epitelio sensorial auditivo de los mamíferos que separa las escalas media y timpánica. En él se encuentran las CCIs y las CCEs, rodeadas por diversas células de soporte y ubicadas sobre la membrana basilar. En el esquema también se distinguen las estereocilias de las células ciliadas, ubicadas en la porción apical de las mismas, en contacto con la membrana tectorial. **D**, Imagen de una microscopía electrónica de barrido en la que se observan las estereocilias de las CCEs en su típico arreglo de tres filas, seguidas de una única fila de estereocilias pertenecientes a las CCIs. Barra de escala, $15 \mu\text{m}$. **E**, Representación del proceso de mecanotransducción en las células ciliadas, en el que las estereocilias, al chocar con la membrana tectorial, son sometidas a una deflexión que determina la apertura de canales iónicos, a través de los cuales ingresa K^+ . **F** y **G**, Representación de una cóclea “desenrollada” con la membrana basilar extendida. Gracias a su grosor y rigidez diferenciales, ésta permite discriminar las frecuencias componentes de los sonidos. Se muestran, de manera esquemática, seis puntos a lo largo de la membrana basilar en que la amplitud de movimiento es máxima para distintas frecuencias. **H**, Esquematación del gradiente de frecuencias para el rango de frecuencias correspondiente a humanos. Imágenes modificadas a partir de www.cochclea.eu y Purves, 2004.

generan son transmitidas a través de los tres huesecillos del oído medio, denominados martillo, yunque y estribo, hasta una segunda membrana que separa el oído medio del interno y se ubica en la ventana oval de la cóclea (**Figura 1A**). A partir de este punto, en el interior de la cóclea, las ondas de sonido se propagan en un medio líquido. Si se hiciera un corte transversal en la cóclea, se observaría que su interior está dividido en tres compartimentos que corren en paralelo a lo largo de la misma, formando así tres conductos que siguen el enrollamiento de la estructura coclear (**Figura 1B**). Dichos conductos se denominan escala vestibular, escala timpánica y escala media, y están llenos de fluido extracelular (Raphael y Altschuler, 2003). Los dos primeros conductos se conectan en la región apical de la cóclea y el fluido en su interior se conoce como perilinfa. Éste tiene una composición similar a la del fluido cerebro-espinal, es decir que presenta una baja concentración de K^+ (~5 mM), y altas concentraciones de Na^+ (~140 mM) y Ca^{2+} (~1.3 mM), respecto al interior celular. La escala media, en cambio, presenta en su interior una solución denominada endolinfa, en la que la relación entre las concentraciones de dichos iones es la inversa, es decir que presenta un alta concentración de K^+ (~150 mM), y una baja concentración de Na^+ (~1 mM) y Ca^{2+} (~0.2 mM).

El epitelio sensorial auditivo de los mamíferos, el órgano de Corti (**Figura 1B y C**), se encuentra entre las escalas media y timpánica. Debido a las concentraciones diferenciales de los fluidos que hay en ellas, se genera un potencial electroquímico de alrededor de +80 mV, conocido como potencial endococlear. En el órgano de Corti se encuentran las células ciliadas del oído, células mecanosensoriales que son las encargadas de la transducción del sonido. Los somas de las células ciliadas están embebidos en perilinfa y se encuentran rodeados por diversas células de soporte que participan en varios procesos. Las células ciliadas se diferencian en internas y externas (CCIs y CCEs, respectivamente) y comparten la peculiaridad de presentar estereocilias en su región apical (**Figura 1D**), estructuras compuestas por filamentos de actina que se insertan en la membrana plasmática de las células ciliadas (Hudspeth, 2014; Goutman et al., 2015). Éstas se encuentran bañadas por endolinfa y están en contacto con la membrana tectorial, que recubre el órgano de Corti. En particular, las estereocilias de las CCEs están firmemente unidas a esta membrana, a diferencia de las estereocilias de las CCIs que se encuentran libres (Robles y Ruggiero, 2001). A su vez, todo el sistema descrito hasta aquí se encuentra emplazado sobre la

membrana basilar, una estructura de vital importancia para el proceso de transducción del sonido, como se explicará a continuación.

Habiendo atravesado los oídos externo y medio, las ondas de sonido alcanzan el medio acuoso en el interior de la cóclea y se propagan a través del mismo, generando así oscilaciones en la membrana basilar, estructura acelular que se extiende a lo largo de la cóclea, por debajo del órgano de Corti (Hudspeth, 2014). El movimiento oscilatorio de la membrana basilar tendrá como consecuencia que todo el epitelio sensorial oscile, provocando deflexiones en las estereocilias de ambos tipos de células ciliadas al impactar éstas contra la membrana tectorial que las recubre. Estas deflexiones, que también son cíclicas y ocurren en direcciones opuestas para cada fase del ciclo, están coordinadas gracias a filamentos extracelulares que conectan a las estereocilias entre sí (**Figura 1E**), los cuales a su vez se unen a un complejo mecanotransductor en la membrana de las mismas y gatillan la apertura de canales catiónicos inespecíficos, con alta permeabilidad a Ca^{2+} (Beurg et al., 2006; Vollrath et al., 2007; Zhao y Müller, 2015; Fettiplace, 2017). Los componentes proteicos de esta maquinaria así como su mecanismo de acción, son conocidos desde hace tiempo, aunque la identidad molecular del canal que forma este complejo mecanotransductor fue una incógnita hasta hace muy poco, cuando se confirmó que el mismo está compuesto por un dímero de la proteína TMC1 (Pan et al., 2013, 2018; Ballesteros et al., 2018). Como resultado de la oscilación del epitelio sensorial y la consecuente deflexión de las estereocilias en una determinada dirección acorde a la fase de oscilación, las CCI y CCE estarán sometidas a ciclos de despolarizaciones e hiperpolarizaciones en un rango de entre 25 mV y 15 mV pico a pico, respectivamente (Russell y Sellick, 1978; Dallos et al., 1982; Dallos, 1985, 1992; Russell y Kössl, 1991). Esto se debe a que, si bien los canales mecanotransductores tienen una conductancia en condiciones de reposo, la probabilidad de apertura de los mismos varía según la posición de las estereocilias de las CCI y CCE (Russell et al., 1986; Russell y Kössl, 1991; Ricci y Fettiplace, 1998; Beurg et al., 2006, 2014; Peng y Ricci, 2011; Xiong et al., 2012; Fettiplace y Kim, 2014). De esta manera, cuando el epitelio sensorial se eleva, las estereocilias se deflexionan coordinadamente en una dirección, aumentando la probabilidad de apertura de los canales mecanotransductores y permitiendo la entrada del catión predominante en la endolinfa, el K^+ , a la región apical de ambos tipos de células ciliadas provocando su despolarización. Alternativamente, cuando el epitelio desciende, la membrana tectorial produce la

deflexión de las estereocilias en sentido opuesto, disminuyendo la probabilidad de apertura de los mecanotransductores por debajo de su valor en el reposo, hiperpolarizando así a las CCI y CCEs. Las células ciliadas son, por lo tanto, células mecanosensoriales, capaces de convertir una señal mecánica en una respuesta eléctrica, lo que las convierte en piezas fundamentales del proceso de transducción del sonido en el órgano de Corti, junto con las membranas tectorial y basilar. Este mecanismo es, además, fuertemente dependiente del potencial endococlear, sin el cual no habría movimiento de iones entre la endolinfa y las células ciliadas. No obstante, la variación en el potencial de membrana en las CCI y CCEs tiene efectos distintos sobre ellas, determinando así sus diferentes funciones, como se detallará más adelante.

Además de ser una pieza clave en la transducción del sonido en el órgano de Corti gracias a su respuesta mecánica, la membrana basilar merece especial atención porque permite la decodificación de las frecuencias componentes de los estímulos entrantes. Esto se debe a que presenta un grosor y una rigidez variables a lo largo de su extensión, lo que le confiere selectividad de frecuencias, es decir, sensibilidad diferencial a las distintas frecuencias que llegan al oído interno (von Békésy, 1960). La región apical de la membrana basilar es delgada ($\sim 0.7 \mu\text{m}$) y flexible en comparación con la región basal, de mayor grosor ($\sim 3 \mu\text{m}$) y rigidez, presentado un gradiente entre ambos extremos (Nam y Fettiplace, 2010). Esto determina que, si bien los estímulos entrantes generan vibraciones a lo largo de toda la membrana, habrá puntos a lo largo de la misma en los cuales estas oscilaciones serán máximas, según la composición de frecuencias del estímulo: las más bajas generan desplazamientos máximos en la región apical de la cóclea, mientras que las frecuencias altas, lo hacen en la región basal (**Figura 1F-H**). Esto sienta las bases mecánicas para la discriminación de frecuencias en el oído interno de los mamíferos: al generarse vibraciones máximas en puntos específicos a lo largo de la membrana basilar en respuesta a las distintas frecuencias, las porciones del órgano de Corti correspondientes a esas ubicaciones se desplazarán hacia la membrana tectorial, de manera tal que principalmente las estereocilias de las CCI y CCEs en dichos puntos se deflexionan, despolarizando a las células. La discriminación de frecuencias mediante la membrana basilar es un proceso pasivo, conocido como sintonización macromecánica, y está a su vez complementado por un mecanismo activo que amplifica la señal entrante y, como se verá más adelante, depende de las CCEs. Por ejemplo, se ha observado que

las CCEs presentan longitud diferencial a lo largo de la cóclea (Fettiplace, 2017), determinando cambios también en la capacitancia de la membrana (Johnson et al., 2011a). También se han descrito cambios en las conductancias de K^+ dependientes de voltaje y de los canales mecanotransductores, así como del potencial de membrana de las CCEs en función de la posición de las mismas a lo largo de la extensión de la cóclea (Johnson et al., 2011a). Además, si bien la sintonización macromecánica es el principal mecanismo de sintonización de frecuencias en la cóclea de los mamíferos, podría no ser el único, ya que también se han observado procesos micromecánicos basados en las propiedades intrínsecas de las estereocilias. Estos mecanismos constituyen la principal estrategia de sintonización en vertebrados no mamíferos, pero su contribución en el linaje de los mamíferos es aún un tema de debate (Hudspeth, 2008, 2014; Fettiplace, 2017). Más aún, estos mecanismos alternativos podrían cobrar mayor relevancia en las regiones apicales de la cóclea de los mamíferos, donde se procesan las frecuencias de sonido más bajas, ya que recientemente se ha demostrado que las propiedades mecánicas de la membrana basilar son insuficientes para explicar la sintonización de estas frecuencias (Recio-Spinoso y Oghalai, 2017). En suma, todos estos mecanismos contribuyen al funcionamiento de la cóclea de los mamíferos como un analizador de frecuencias y determinan que la contribución del oído interno, en comparación con los oídos externo y medio, sea fundamental para determinar el espectro de frecuencias que el oído de los mamíferos puede percibir (Ruggero y Temchin, 2002; Ashmore, 2008).

Por último, la membrana basilar está sujeta a un proceso de compresión no lineal que se complementa con la selectividad de frecuencias (Ruggero et al., 1997; Hudspeth, 2008). Este mecanismo se evidencia, por ejemplo, en el hecho de que sonidos con intensidades en el orden del umbral de detección en humanos (0 dB) provocan oscilaciones de ± 0.1 nm en la membrana basilar, mientras que sonidos en el orden de la mayor intensidad tolerable sin daño en el epitelio auditivo (120 dB, comparable al sonido producido por el motor de un avión) generan oscilaciones de ± 10 nm. En otras palabras, si tenemos en cuenta que la unidad de medición de la intensidad del sonido, el dB, se mide en escala logarítmica, esto implica que el estímulo más intenso que el oído puede tolerar es millones de veces más potente que aquellos sonidos cercanos al umbral de audición. No obstante, el desplazamiento de la membrana basilar es sólo cien veces superior entre ambos extremos de intensidad. La explicación a este fenómeno radica en que la sensibilidad de la membrana no sigue una

relación lineal con la intensidad de los estímulos, sino que tiene un comportamiento altamente no lineal. Esto garantiza una máxima sensibilidad frecuencia-específica frente a estímulos apenas perceptibles, de la mano de una menor ganancia para estímulos de elevada intensidad y frecuencias no representadas en el estímulo sonoro.

Transmisión de la información sonora hacia el SNC: inervación aferente

Como se explicó anteriormente, la mecanotransducción en las células ciliadas provoca que tanto las CCI como las CCEs modifiquen su potencial de membrana de manera cíclica. No obstante, este fenómeno origina distintos mecanismos en ambos tipos celulares. En primer lugar se describirán los efectos de la despolarización sobre las CCIs. En particular, se dice que estas células son los fonorreceptores del sistema auditivo, ya que son las que efectivamente transducen el estímulo mecánico en una señal eléctrica que viajará hacia el SNC. En la **Figura 2A** se observa que la entrada de K^+ a través del complejo mecanotransductor genera una despolarización, cuya magnitud será dependiente de la intensidad del estímulo, y que viaja en forma de potencial graduado hasta la región basal de la CCI. Esto permite la entrada de Ca^{2+} y determina la fusión de vesículas sinápticas cargadas con glutamato a la membrana plasmática de las CCIs (Fuchs et al., 2003; Fuchs, 2005; Goutman et al., 2015). Estas vesículas sinápticas se encuentran ancladas a una estructura proteica conocida como “cinta sináptica”, y a las sinapsis que la contienen se las denomina sinapsis en cinta (Smith y Sjöstrand, 1961; Fuchs y Glowatzki, 2015). Una vez liberado, el glutamato actúa sobre receptores de tipo AMPA presentes en las dendritas de neuronas del ganglio espiral (NGEs) de tipo I, que inervan las CCIs (Glowatzki y Fuchs, 2002; Fuchs et al., 2003). Estas neuronas llevan su nombre debido a que sus somas se encuentran en el ganglio espiral, ubicado en el modiollo, una estructura ósea que constituye el eje de la cóclea. Sus axones están mielinizados y en conjunto forman el nervio auditivo, que comunica la periferia con el SNC (Perkins y Morest, 1975; Berglund y Ryugo, 1987; Brown, 1987). Como se esquematiza en la **Figura 2B**, las NGEs forman contactos sinápticos con neuronas presentes en el núcleo coclear ipsilateral, que se divide en ventral y dorsal. Éste, a su vez, envía proyecciones contralaterales al siguiente núcleo de la vía ascendente. Esto implica que la transmisión de la información auditiva es principalmente contralateral, aunque a lo largo de la vía existen proyecciones cruzadas que determinan cierto grado de transmisión ipsilateral (Purves, 2004). La sinapsis aferente entre las CCIs y las NGEs de

tipo I constituye entonces el primer paso en la transmisión de la información sonora desde la periferia hacia la corteza auditiva, y es la encargada de codificar la estructura temporal e intensidad de los estímulos sonoros (Hudspeth, 1997; Fuchs et al., 2003; Fuchs, 2005; Goutman et al., 2015).

La llegada de un sonido con una determinada composición de frecuencias al órgano de Corti provoca que la membrana basilar oscile diferencialmente a lo largo de su extensión, por lo que se despolarizan únicamente a las CCI ubicadas sobre aquellas porciones de la membrana basilar que

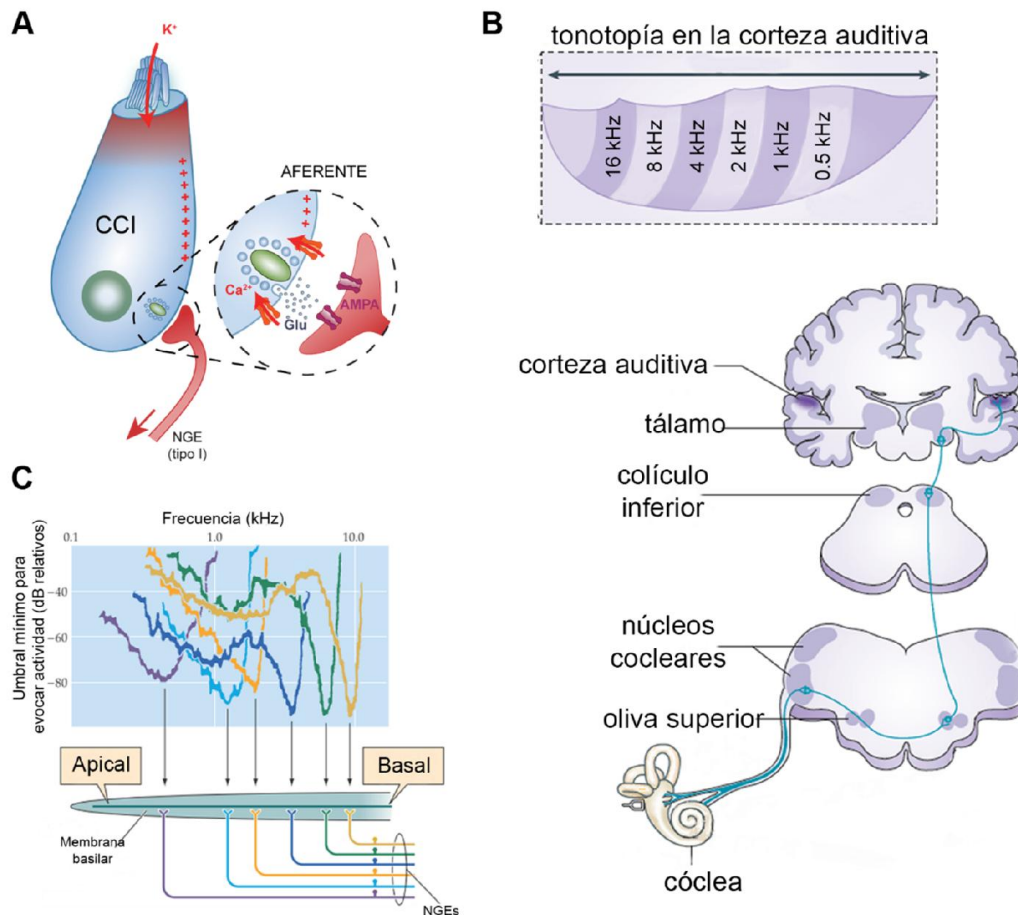


Figura 2 | Transducción del sonido en CCI y transmisión de la información al SNC: vía aferente.

A, La despolarización en las CCI luego de la entrada de K^+ por el complejo mecanotransductor determina la liberación de glutamato en la base de las mismas, donde se distinguen las sinapsis en cinta que integran las sinapsis aferentes entre las CCI y las dendritas de neuronas del ganglio espiral (NGEs) de tipo I. **B**, Esquema de la vía auditiva aferente. La sinapsis en cinta (**A**) entre CCI y NGEs (tipo I) es la primera sinapsis de la vía ascendente, formada por diversos núcleos a lo largo del SNC. Figura modificada a partir de Elgoyhen et al., 2015. **C**, Curva de sintonización para distintas NGEs, según la posición de las CCI que inervan a lo largo de la cóclea. Esta organización de frecuencias en la cóclea constituye un mapa tonotópico que se conserva en los distintos núcleos del SNC, a lo largo de la vía auditiva ascendente (**B**). Figura modificada a partir de Purves, 2004.

hayan oscilado frente al estímulo. Esto implica que, producto de la sintonización macromecánica impuesta por la membrana basilar, las CCI responderán específicamente frente a algunas frecuencias y no frente a otras. En consecuencia, sólo las NGEs de tipo I inervando a las CCIs que se despolarizan ante la llegada de un sonido, dispararán potenciales de acción, de manera tal que cada NGE de tipo I posee una curva de sintonización de frecuencias individual, tal como se muestra en la **Figura 2C**. Esto significa que, para una determinada NGE de tipo I, habrá un acotado rango de frecuencias que le permitirá superar el umbral para disparar potenciales de acción y así continuar la transmisión de información hacia el SNC. Dentro de dicho rango habrá un valor de frecuencia, o frecuencia característica, para el cual la respuesta de la NGE será máxima (Liberman, 1982). Este mecanismo de discriminación de frecuencias que comienza con la oscilación diferencial de la membrana basilar, sienta las bases para la conformación de un mapa topográfico en la cóclea, o mapa tonotópico, en el que las respuestas a las distintas frecuencias que un mamífero puede procesar se encuentran organizadas espacialmente a partir del órgano de Corti (Rubel y Fritzsche, 2002). Un rasgo sumamente importante del sistema auditivo, y que es compartido con otros sistemas sensoriales (Mombaerts, 1999; Gogos et al., 2000; Huberman et al., 2008; Renier et al., 2017), es que esta organización topográfica en la representación de frecuencias se conserva a lo largo de los distintos núcleos que componen la vía auditiva ascendente, determinando la existencia de un mapa tonotópico que se mantiene hasta la corteza auditiva (**Figura 2B**) (Hudspeth, 1997; Kandler et al., 2009). Cabe destacar además que, si bien cada CCI es contactada por entre diez y veinte contactos aferentes (Liberman, 1980, 1982), cada NGE contacta a una única CCI, garantizando simultáneamente la transmisión confiable de la información auditiva hacia el SNC y la organización del mapa tonotópico.

El rol de las CCEs en el procesamiento de la información auditiva

La llegada de un estímulo sonoro produce oscilaciones en la membrana basilar y gatilla el proceso de mecanotransducción sobre ambos tipos de células ciliadas. En respuesta a esto, las CCIs inician la transmisión de la información del sonido hacia el SNC, con una particularidad: las señales transmitidas están sujetas a un proceso de amplificación mecánica, conocido como amplificación coclear (Gold, 1948; Davis, 1983). Este mecanismo activo complementa al movimiento pasivo de la membrana basilar (**Figura 3A**), y funciona como un sistema de retroalimentación positiva que mejora

la sensibilidad de respuesta a los estímulos sonoros, contribuyendo también a la selectividad de frecuencias en la cóclea (Robles y Ruggero, 2001; Hudspeth, 2008, 2014). La amplificación depende de la despolarización de las CCEs en respuesta a la llegada del estímulo mecánico, y es posible gracias a una propiedad exclusiva de estas células, denominada electromotilidad, que les confiere la capacidad de modificar su longitud en función del potencial de membrana: cuando se despolarizan, las CCEs reducen hasta un 4% su longitud, mientras que cuando se hiperpolarizan, se elongan (Brownell et al., 1985; Ashmore, 1987). De este modo, ante la llegada de un estímulo sonoro, las CCI y CCEs se despolarizan e hiperpolarizan cíclicamente siguiendo las oscilaciones de la membrana basilar, y en cada fase de despolarización, producto de la corriente a través de los canales mecanotransductores, las CCEs se contraen (Evans y Dallos, 1993). Producto de esta reducción en su longitud, las CCEs ejercen tensión sobre la membrana basilar, y en consecuencia el órgano de Corti se comprime (**Figura 3B**). Al mismo tiempo, dado que las estereocilias de las CCEs se encuentran ancladas a la membrana tectorial, ésta será traccionada hacia el epitelio, aumentando su superficie de contacto con las estereocilias de las

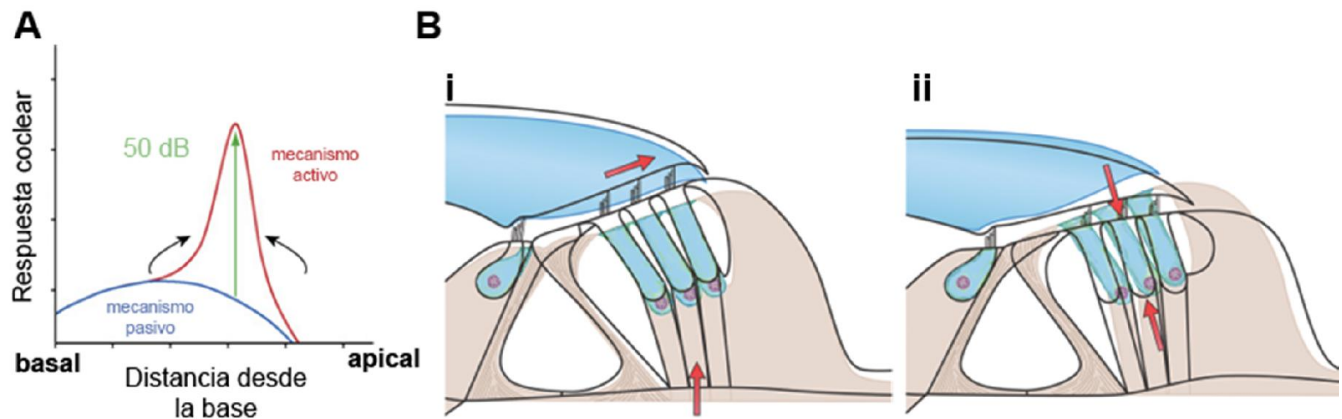


Figura 3 | La amplificación coclear y su contribución a la selectividad de frecuencias.

A, Esquematación de la respuesta coclear frente a un determinado estímulo sonoro, en función de la distancia a lo largo de la membrana basilar. Ante un estímulo, la respuesta pasiva de esta membrana (azul) se complementa con la respuesta activa provista por la amplificación dependiente de CCEs (rojo), dando lugar a la respuesta que efectivamente se obtiene en la cóclea. Como puede verse, la amplificación no sólo incrementa la respuesta de la cóclea produciendo una señal equivalente a la que se obtendría por un estímulo 50 dB más intenso (en este ejemplo representativo) que el estímulo real, sino que además contribuye a la discriminación de frecuencias, maximizando las oscilaciones de la membrana basilar en aquellos puntos que se correspondan con las frecuencias presentes en el estímulo. Figura modificada a partir de Hudspeth, 2008. **B**, El movimiento de la membrana basilar y del órgano de Corti sobre ella induce ciclos de despolarización-hiperpolarización en las CCEs por la deflexión de sus estereocilias al impactar con la membrana tectorial (i), lo que determina que éstas modifiquen su longitud, acortándose y alargándose en función del potencial de membrana. Ante una reducción en su longitud, el epitelio se comprime (ii), lo que tracciona a la membrana tectorial hacia el mismo. En consecuencia, la superficie de contacto entre esta membrana y las estereocilias de las CCI se incrementa, aumentando su deflexión y por ende la transmisión sináptica en la vía ascendente descrita en la **Figura 2**. Figura modificada a partir de Fettiplace, 2017.

CCIs y generando una mayor deflexión de las mismas. En respuesta a una mayor deflexión, el mecanotransductor en las estereocilias de las CCIs permite un mayor paso de corriente, lo que genera potenciales graduados de mayor amplitud y determina, en última instancia, una mayor liberación de glutamato en la base de las mismas, aumentando así la señalización en la vía ascendente (Dallos, 1992).

Se ha demostrado que la actividad contráctil de las CCEs, que depende del potencial de membrana, presenta un rango de acción que abarca valores de potencial desde -50 mV hasta 30 mV (Ashmore, 2008), aunque se sabe que en condiciones fisiológicas las oscilaciones en el potencial de membrana obtenidas por las corrientes del mecanotransductor no superan los 0 mV (Johnson et al., 2011a). El hecho de que el umbral de actividad electromótil se encuentre cercano al potencial de reposo de las CCEs determina que éstas tengan una alta sensibilidad a la amplificación de los estímulos. Además los canales mecanotransductores son extremadamente sensibles al desplazamiento, y en consecuencia se requieren estímulos mecánicos muy sutiles para generar cambios en la probabilidad de apertura (Russell et al., 1986; Beurg et al., 2006; Xiong et al., 2012). Más aún, se ha observado que en las CCEs en reposo y al exponer sus estereocilias a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , esta probabilidad es de entre 0.4 y 0.5, valor considerablemente elevado en comparación con el de las CCIs, de entre 0.1 y 0.2 (Johnson et al., 2011a; Peng y Ricci, 2011; Corns et al., 2014; Fettiplace y Kim, 2014). En conjunto, todas estas características determinan la altísima sensibilidad del amplificador coclear, garantizando la respuesta del mismo incluso frente a estímulos débiles, que generan despolarizaciones de escasa magnitud en ambos tipos de células ciliadas (Ashmore, 2008; Peng y Ricci, 2011; Fettiplace y Kim, 2014).

La habilidad de las CCEs de contraerse en respuesta a cambios en el potencial de membrana, y por ende de contribuir a la amplificación coclear, se debe a la presencia de una proteína motora en su membrana basolateral, la prestina, que pertenece a la superfamilia de transportadores aniónicos SLC26 y, como se observa en la **Figura 4** es capaz de cambiar su conformación en función del potencial de membrana y así modificar la geometría de las CCEs (Oghalai et al., 1998, 2000; Zheng et al., 2000; Liberman et al., 2002; Yu et al., 2006; Ashmore, 2008; Dallos et al., 2008). En una CCE pueden encontrarse hasta diez millones de copias de prestina, las cuales forman multímeros que se agrupan en la membrana y forman cúmulos similares a las balsas lipídicas (Dallos, 2008; Hudspeth, 2008). Estos

múltímeros pueden llegar a encontrarse en una densidad de $10000/\mu\text{m}^2$ (Mahendrasingam et al., 2010), confiriéndoles a las CCEs la capacidad de ejercer una fuerza isométrica de 0.1 nN por cada mV de despolarización, sin necesidad de ATP ni ninguna otra fuente de energía química (Iwasa y Adachi, 1997; Hudspeth, 2014). Se ha demostrado, además, que la electromotilidad dependiente de prestina es crítica para la selectividad de frecuencias en la cóclea (Dallos et al., 2008). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que, ante la llegada de un estímulo sonoro, las CCEs que se despolarizan son

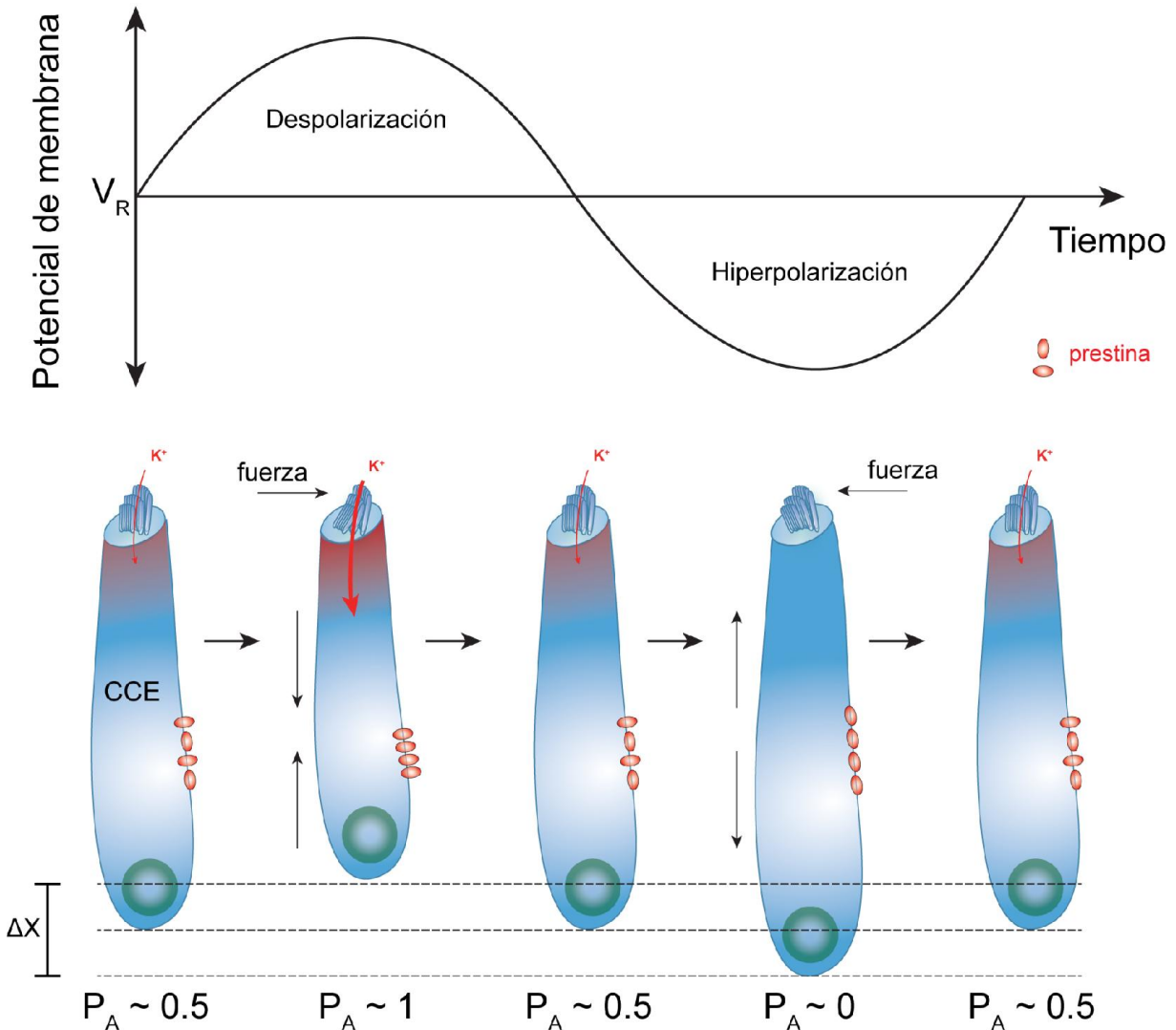


Figura 4 | Electromotilidad de las CCEs en respuesta a los cambios en el potencial de membrana.

Representación de la actividad electromotil de las CCEs en relación a los ciclos de variación del potencial de membrana. Se esquematiza un ciclo completo, partiendo desde el potencial de una CCE en reposo (V_R). Cuando las estereocilias son sometidas a una fuerza mecánica, los canales mecanotransductores varían su probabilidad de apertura (P_A) en función de la dirección de dicha fuerza, modificando la cantidad de K^+ que ingresa a la región apical, en comparación con las condiciones de reposo. Esto da lugar a los ciclos de despolarización-hiperpolarización de las CCEs. Los dímeros de prestina en la membrana basolateral de las células se encuentran en dos posibles conformaciones durante el reposo, y dependiendo de los cambios en el potencial de membrana, tenderán hacia una conformación u otra, determinando un aumento o una reducción en la longitud (ΔX) de la CCE.

aquellas que se ubican junto a las CCI sintonizadas para las frecuencias componentes de dicho estímulo, de manera que la amplificación contribuye a la discriminación de esas frecuencias en particular (**Figura 3A**). En otras palabras, las CCI y CCEs que se ubican en la misma posición sobre la membrana basilar están sintonizadas para las mismas frecuencias, contribuyendo al mapa tonotópico de la vía auditiva ascendente. Esto es consistente con que ambos tipos de células ciliadas presenten diferentes propiedades en función de su posición a lo largo de la extensión coclear (Fettiplace, 2017), como se mencionó anteriormente.

A pesar de la importancia de la prestina en el procesamiento auditivo, cuya actividad es necesaria para la amplificación coclear (Dallos et al., 2008), el mecanismo de acción de esta proteína motora es aún tema de debate en el campo de la fisiología auditiva. En este sentido, se sabe que en vertebrados no mamíferos existen ortólogos de esta proteína que actúan como transportadores aniónicos, aunque esta función no está conservada en el linaje de los mamíferos (Schaechinger y Oliver, 2007). No obstante esto, se ha demostrado que la presencia de Cl^- en el citoplasma de las CCEs es condición necesaria para que haya electromotilidad, por lo que se ha propuesto que la prestina de los mamíferos es capaz de unir Cl^- intracelular, y que esto sería lo que gatilla el cambio conformacional necesario para modificar la longitud de las CCEs (Oliver et al., 2001; Ashmore, 2008; Gorbunov et al., 2014; Fettiplace, 2017). Por otra parte, si bien está aceptado que la electromotilidad dependiente de la prestina es el mecanismo predominante en la amplificación coclear de los mamíferos, aún está en discusión la posible contribución de mecanismos activos originados a partir del movimiento de las estereocilias, los que, como se mencionó anteriormente, también podrían estar involucrados en la sintonización en la cóclea de los mamíferos. De hecho, si bien ese tipo de mecanismos son los que median la amplificación del sonido en los vertebrados no mamíferos (Hudspeth, 2008, 2014; Fettiplace, 2017), hay evidencias de que también podrían cumplir un rol en los mamíferos (Chan y Hudspeth, 2005; Kennedy et al., 2005, 2006; Dewey et al., 2018). En este sentido, se postula que los mecanismos activos a nivel de las estereocilias podrían contribuir específicamente a la amplificación de sonidos compuestos por las frecuencias más altas del rango auditivo de los mamíferos, de alrededor de 100 kHz ya que, para amplificarlos exclusivamente mediante la propiedad electromotil de las CCEs, se requeriría que éstas lograsen contraerse y elongarse a las mismas frecuencias que los sonidos que procesan. Sin embargo,

estudios en CCEs aisladas del órgano de Corti sugieren que el límite de frecuencia para este mecanismo ronda los 80 kHz (Preyer et al., 1994; Gale y Ashmore, 1997; Frank et al., 1999), y que esto podría deberse a una limitación intrínseca en la respuesta cinética de la prestina, por sobre impedimentos eléctricos intrínsecos a la membrana de las CCEs (Johnson et al., 2011a; Santos-Sacchi y Tan, 2018). Por esta razón se cree que, en los mamíferos, la amplificación de sonidos mediada por la prestina podría haber complementado, más que remplazado, el mecanismo de amplificación más ancestral, mediado por el movimiento activo de las estereocilias (Hudspeth, 2008).

Por último, si bien dentro del campo de la fisiología auditiva existe un claro consenso a favor de que las CCEs cumplen un rol central en la amplificación coclear, existen evidencias que indican que éstas también podrían estar involucradas en otros procesos relevantes para el sistema auditivo. Al igual que las CCI, las CCEs reciben una inervación aferente que proviene de neuronas cuyos somas se ubican en el ganglio espiral de la cóclea. Sin embargo, las NGEs que contactan a las CCEs, denominadas de tipo II, son morfológicamente distinguibles de las que inervan a las CCI (Perkins y Morest, 1975; Berglund y Ryugo, 1987; Brown, 1987): a diferencia de las NGEs de tipo I, los axones de las de tipo II carecen de mielina y contactan a varias CCEs al mismo tiempo. Además, el número total de fibras de tipo II en el órgano de Corti es considerablemente menor que las de tipo I ya que, del total de fibras aferentes, el 95% corresponde a fibras de tipo I y el 5% restante corresponde a fibras de tipo II. Al igual que las CCI, las CCEs también tienen sinapsis en cinta en su región basal, a través de la cual liberan glutamato, que activa receptores de tipo AMPA en la membrana de las dendritas pertenecientes a NGEs de tipo II, las que, al igual que las de tipo I también contactan al núcleo coclear (Smith y Sjöstrand, 1961; Benson y Brown, 2004; Weisz et al., 2009; Fuchs y Glowatzki, 2015). Estudios recientes sugieren, además, que se necesita la liberación de glutamato de al menos seis CCEs para que se generen potenciales de acción en las NGEs de tipo II (Weisz et al., 2014), lo que, junto al hecho de que estas fibras son marcadamente menos numerosas que las de tipo I, permite suponer que la sinapsis aferente sobre las CCEs no contribuye significativamente a la transmisión de la información auditiva hacia el SNC. En este sentido, en los últimos años se han propuesto dos posibles funciones para la inervación aferente en las CCEs: una de ellas propone que los contactos sinápticos entre las CCEs y las NGEs de tipo II podrían ser lo que dispare el reflejo olivococlear que, como se explicará más adelante, es un mecanismo de gran

importancia para regular la amplificación coclear (Froud et al., 2015); la otra, en cambio, postula que las NGEs de tipo II estarían involucradas en la señalización de daño en el epitelio auditivo frente a la exposición a sonidos de alta intensidad (Flores et al., 2015; Liu et al., 2015), siendo ésta la que ha tomado más fuerza debido a numerosas críticas sobre el abordaje experimental empleado para corroborar la primera hipótesis (Maison et al., 2016).

Regulación de la amplificación coclear: inervación eferente sobre la cóclea

Un rasgo común a todos los vertebrados es que las células ciliadas, presentes en el sistema auditivo, vestibular y la línea lateral de peces, reciben información descendente que proviene del SNC y regula el funcionamiento de las mismas (Simmons, 2002). En este sentido, el sistema auditivo periférico de los mamíferos no es una excepción, ya que también recibe una inervación eferente que se origina en el tallo cerebral y permite regular la ganancia del sistema a través de la modulación de la amplificación coclear (Simmons, 2002; Guinan Jr., 2006; Elgoyhen y Katz, 2012; Katz y Elgoyhen, 2014). Dicha inervación proviene de neuronas cuyos somas se encuentran en el núcleo ventral del cuerpo trapezoidal (VNTB, por sus siglas en inglés) y el núcleo lateral de la oliva superior (LSO, por sus siglas en inglés) (Warr y Guinan, 1979; Guinan et al., 1983), que se encuentran a la altura del IV ventrículo y forman parte del complejo olivar superior, dando lugar a las fibras olivococleares mediales y laterales (MOC y LOC, respectivamente, por sus siglas en inglés; **Figura 5**). Las fibras MOC presentan mielina en sus axones mientras que los axones de las fibras LOC carecen de esta sustancia (Guinan Jr., 2006). Ambos tipos de fibras son colinérgicas, pero también se han encontrado otros neurotransmisores y neuromoduladores como GABA, dopamina y CGRP en las mismas, aunque el rol de éstos permanece aún en discusión (Eybalin, 1993). Las neuronas MOC y LOC presentan, además, distintas propiedades electrofisiológicas (Fujino et al., 1997) así como diferentes destinos postsinápticos, ya que las MOC contactan directamente a las CCEs en su región basal, permitiendo la regulación de la electromotilidad de las mismas (Liberman et al., 1990; Guinan Jr., 2006), mientras que las LOC forman contactos axodendríticos con las NGEs de tipo I que inervan a las CCI en el órgano de Corti, ejerciendo un control sobre su excitabilidad y previniendo la excitotoxicidad inducida por glutamato en las mismas (Liberman et al., 1990; Reijntjes y Pyott, 2016). Si bien el rol de las fibras MOC ha sido extensamente estudiado, poco se conoce aún de la relevancia de las LOC, más allá de su rol regulatorio sobre las NGEs de tipo I,

aunque se postula que podrían estar involucradas en la localización espacial del sonido (Nouvian et al., 2015).

En conjunto, las fibras MOC y LOC conforman el sistema eferente olivococlear, que opera en forma de reflejo en respuesta a sonidos contra e ipsilaterales, dando lugar al reflejo olivococlear, que se detalla en la **Figura 5** (Buño, 1978; Liberman, 1989). Los somas de las neuronas MOC reciben información auditiva proveniente de los núcleos cocleares contralaterales, lo que produce el disparo

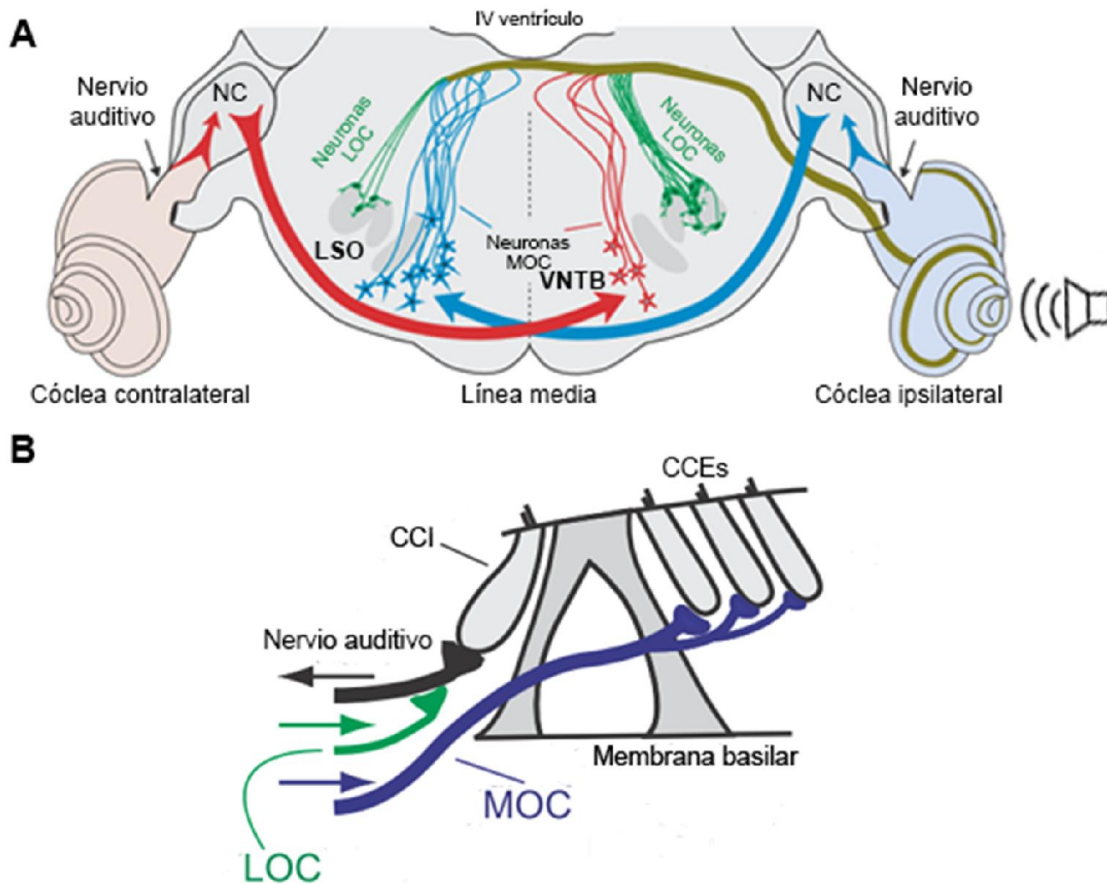


Figura 5 | El reflejo olivococlear y la inervación eferente a la cóclea.

Esquematización del reflejo olivococlear en una sección del tallo cerebral a la altura del IV ventrículo (A) y de la inervación eferente que recibe el órgano de Corti (B). En el ejemplo se observa un estímulo proveniente de una fuente de sonido a la derecha del animal y las vías contra e ipsilaterales se definen en función de la posición de la fuente. En este caso, la señal producida por el estímulo se percibe con mayor intensidad en la vía derecha (ipsilateral, en azul). El núcleo coclear (NC) derecho proyectará al VNTB contralateral, activando las neuronas MOC que vuelven hacia la cóclea donde comenzó la señalización ascendente. Al mismo tiempo, aunque con menor intensidad, el sonido percibido también activará la vía auditiva ascendente del oído izquierdo (vía contralateral, en rojo) que actuará sobre el VNTB del hemisferio opuesto, e ipsilateral respecto de la fuente de sonido. Por lo tanto, ambos VNTBs inervan la cóclea ipsilateral para la fuente de sonido, aunque con distinta densidad de fibras, de manera que el VNTB contralateral es más influyente en el control de la actividad aferente. Las fibras MOC, junto a las fibras LOC que nacen de los LSOs de ambos hemisferios, constituyen el haz olivococlear que inerva el órgano de Corti. Figura modificada a partir de Guinan Jr., 2006.

de estas neuronas, cuyas fibras envían proyecciones hacia ambos oídos. Cada oído recibe, sin embargo, una mayor inervación de fibras MOC contralaterales, en comparación con las ipsilaterales, de manera que las primeras tienen una mayor contribución en el reflejo mediado por fibras MOC (Maison et al., 2003a). Cabe destacar además que, si bien está demostrada la participación de las fibras MOC activadas por las neuronas del núcleo coclear, el circuito responsable del reflejo es todavía asunto de debate, ya que por un lado, se ha propuesto que podría incluir a las NGEs de tipo II, y por otro, también existen evidencias de que las neuronas MOC podrían ser reclutadas directamente por proyecciones provenientes desde la corteza auditiva y el colículo inferior (Guinan Jr., 2006; Terreros y Delano, 2015; Maison et al., 2016).

El reflejo olivococlear constituye por lo tanto un mecanismo que permite controlar la ganancia del sistema auditivo periférico de los mamíferos. Las fibras MOC tienen la capacidad de regular negativamente la actividad electromotil de las CCEs, provocando que éstas tiendan a su configuración elongada, reduciendo en consecuencia el movimiento de la membrana basilar y por ende la amplificación de los sonidos (Murugasu y Russell, 1996; Russell y Murugasu, 1997; Cooper y Guinan Jr, 2006; Guinan Jr., 2006; Fuchs y Lauer, 2018). Esta actividad inhibitoria aumenta con la intensidad del estímulo y reduce, en última instancia, la sensibilidad de las fibras que componen el nervio auditivo, producto de la menor liberación de glutamato en la sinapsis en cinta entre las CCI y las NGEs de tipo I (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987; Brown, 1989). Más aún, se ha demostrado la relevancia de la inhibición mediada por las fibras eferentes MOC a través del reflejo olivococlear durante la exposición del sistema auditivo a sonidos de intensidad elevada, ya que puede brindar protección frente al trauma acústico, un proceso vinculado a la pérdida de células ciliadas por daño en el epitelio auditivo (Lieberman, 1991; Rajan, 2000; Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018). También se ha propuesto que la actividad de las fibras MOC interviene en mecanismos de atención selectiva mediante la supresión de la amplificación coclear en el contexto de ambientes en los que se combinan estímulos multimodales, siendo relevante tanto en humanos (Wittekindt et al., 2014) como en otros mamíferos (Oatman, 1971, 1976; Delano et al., 2007; Terreros et al., 2016). No obstante, el reflejo olivococlear no sería la única estrategia subyacente en los procesos de atención selectiva, ya que hay evidencias que sugieren la participación de distintos niveles dentro de la jerarquía del SNC (Kerlin

et al., 2010; Mesgarani y Chang, 2012; Ding y Simon, 2013; Park et al., 2016; Dai et al., 2018) que podrían tanto suprimir estímulos irrelevantes como reforzar los más relevantes (Fritz et al., 2007; Couperus y Mangun, 2010).

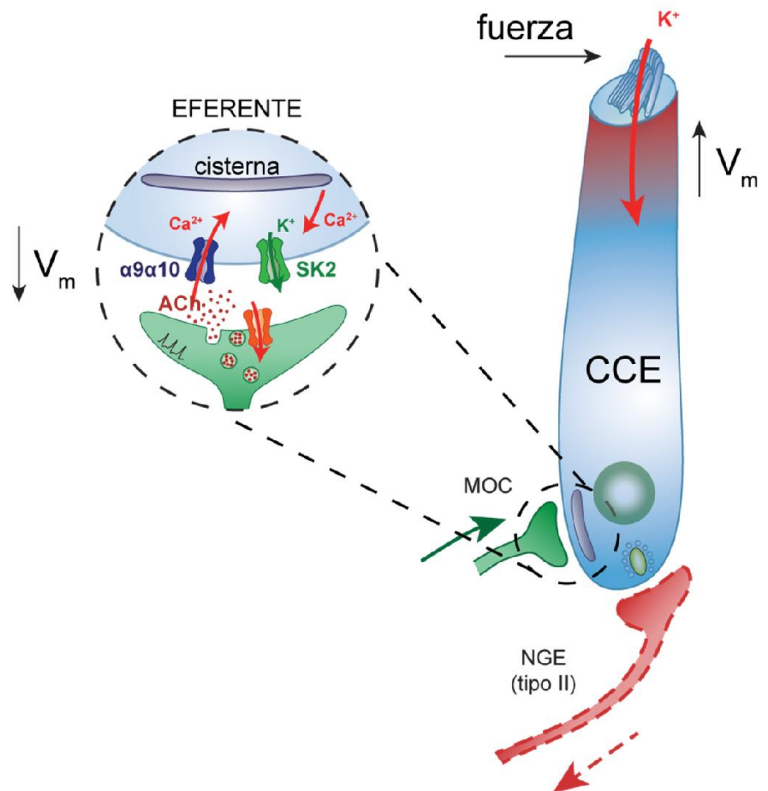
En última instancia, el mecanismo de acción de las fibras MOC subyacente al reflejo olivococlear de los mamíferos depende de la sinapsis colinérgica e inhibitoria entre estas fibras y las CCEs (**Figura 6**; Elgoyhen y Katz, 2012; Fuchs, 2014; Katz y Elgoyhen, 2014). Los primeros indicios de la existencia de una actividad eferente inhibitoria y colinérgica provienen de experimentos en los que se observó que la aplicación de ACh producía una hiperpolarización en las células ciliadas que reciben inervaciones eferentes, tanto en los mamíferos (Housley y Ashmore, 1991) como en los no mamíferos (Art et al., 1984; Fuchs y Murrow, 1992a; Sugai et al., 1992). Sin embargo, el efecto inhibitorio de la ACh sobre las células ciliadas resultaba contradictorio debido a que la rapidez de la respuesta sugería la participación de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs, por sus siglas en inglés) en lugar de receptores metabotrópicos muscarínicos (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992b; Blanchet et al., 1996), y hasta el momento no se habían descrito nAChRs involucrados en mecanismos inhibitorios. En particular en los mamíferos, el efecto colinérgico sobre la actividad de las CCEs fue confirmado *in vivo* a través de técnicas que permiten medir la amplificación mediada por estas células en respuesta a estímulos sonoros (Kujawa et al., 1993, 1994). La resolución definitiva de esta incógnita llegó con el descubrimiento de la identidad molecular del nAChR que se expresa en la cóclea de mamíferos y que, por lo tanto, participa en la respuesta inhibitoria a través de las fibras MOC. La misma fue develada a partir del clonado de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ que lo componen (Elgoyhen et al., 1994, 2001). El nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es un canal catiónico inespecífico con una estequiometría prevalente de dos subunidades $\alpha 9$ y tres $\alpha 10$ (Plazas et al., 2005b). Este receptor tiene propiedades farmacológicas y biofísicas que le confieren características mixtas entre receptores nicotínicos y muscarínicos, y presenta una alta permeabilidad relativa al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 8$) (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Elgoyhen y Katz, 2012). Además, el receptor $\alpha 9\alpha 10$ tiene la particularidad de que, a pesar de formar parte de la familia de nAChRs, es bloqueado por nicotina, así como por un amplio espectro de drogas que actúan como antagonistas naturales de otros tipos de receptores (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Erostequi et al., 1994b; Rothlin et al., 1999; Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005). Más aún, se demostró que tanto en las

CCEs de los mamíferos (Housley y Ashmore, 1992; ErosteGUI et al., 1994a; Blanchet et al., 1996; Evans, 1996; Santos-Sacchi et al., 1997) como en las células ciliadas de los no mamíferos (Yuhas y Fuchs, 1999; Castellano-Muñoz et al., 2010), la ACh evoca una corriente de K^+ que determina la hiperpolarización de las células. En este contexto, la alta permeabilidad a Ca^{2+} del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ resulta determinante en la actividad inhibitoria sobre las CCEs de los mamíferos, ya que se ha demostrado que en la región basal de las mismas, el nAChR se encuentra funcionalmente acoplado a canales de K^+ de tipo SK2 (Oliver et al., 2000), que presentan una baja conductancia y cuya actividad depende de la presencia de Ca^{2+} intracelular (Fakler y Adelman, 2008). Este descubrimiento era la pieza restante para comprender el mecanismo inhibitorio mediado por la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs.

En la **Figura 6** se detalla el mecanismo de acción de la sinapsis MOC-CCE, que permite la inhibición de la amplificación mediada por las CCEs. Estas células reciben entre uno y tres contactos eferentes MOC cada una (Wilson et al., 1991; Vetter et al., 1999; Murthy et al., 2009b), aunque el número varía en función a la posición en la cóclea, siendo máximo en la porción medial de la misma y más bajo en los extremos basal y apical (Maison et al., 2003a). Ante la llegada de un potencial de acción

Figura 6 | La sinapsis eferente colinérgica e inhibitoria entre las fibras MOC y las CCEs.

La llegada de un potencial de acción al terminal presináptico MOC produce su despolarización y la consecuente entrada de Ca^{2+} , lo que provoca la liberación de ACh. Al impactar sobre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$, la ACh gatilla el ingreso de Ca^{2+} hacia el interior de la CCE, lo que en consecuencia activa canales de K^+ del tipo SK2, dependientes de Ca^{2+} . Además se ha sugerido que este mecanismo recibe la contribución de Ca^{2+} proveniente de la cisterna sinaptoplásmica, gracias a un proceso de liberación de Ca^{2+} inducido por el Ca^{2+} que ingresa a través del nAChR. Esta actividad sináptica hiperpolariza la CCE, contrarrestando la despolarización producida a partir de la corriente que ingresa por los canales mecanotransductores en la región apical de la CCE. El efecto neto es la modulación de la actividad electromóvil de las CCEs, que depende del potencial de membrana (V_m) de la célula. Además, se observa la invasión aferente a las CCEs por parte de las NGEs de tipo II, cuya función es aún tema de debate.



al terminal presináptico en las fibras MOC se liberará ACh, gatillando la apertura de nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y permitiendo el ingreso de Ca^{2+} a la región basal de las CCEs. Una vez en el interior de la célula, el Ca^{2+} gatillará la apertura de canales SK2 determinando la salida de K^+ a favor de su gradiente electroquímico (Elgoyhen y Katz, 2012; Fuchs, 2014; Katz y Elgoyhen, 2014). Además, se ha propuesto que este mecanismo sináptico cuenta con la contribución de cisternas sinaptoplásmicas cercanas a la membrana basolateral de las CCEs (**Figura 6**), que aportarían más Ca^{2+} para la activación de los SK2 a partir de mecanismos de liberación de Ca^{2+} inducidos por Ca^{2+} , y que además podrían determinar la restricción espacial de este catión (Lioudyno et al., 2004; Fuchs, 2014; Fuchs et al., 2014; Moglie et al., 2018). La consecuencia funcional de la actividad de la sinapsis MOC-CCE será entonces la hiperpolarización y consecuente elongación de las CCEs, resultando en una reducción en la amplificación y por ende de la señalización en la vía auditiva aferente (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987). Resulta importante destacar que esta inervación eferente, que cumple un rol en la atenuación de la amplificación mediada por las CCEs, sigue un patrón tonotópico (Brown, 2014), al igual que la señalización aferente. Esto es particularmente relevante si se tiene en cuenta que, en el contexto del reflejo olivococlear, la actividad eferente a través de las fibras MOC es gatillada por la vía aferente, de manera que este mecanismo de retroalimentación negativa está direccionado a aquellas regiones que requieran ser moduladas. Cabe señalar, además, que se ha demostrado por un lado que la presencia de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ es necesaria para que las fibras MOC puedan modular la actividad amplificadora de las CCEs (Vetter et al., 1999, 2007) y proveer protección contra el trauma acústico (Maison et al., 2002), y por otro que sin los canales SK2 no se registra actividad colinérgica alguna (Kong et al., 2008), determinando el importante rol que juega el acople funcional entre estos dos componentes de señalización en la membrana de las CCEs.

Desarrollo postnatal en el órgano de Corti

Para este trabajo de Tesis se emplearon ratones como modelo de estudio de los mamíferos. Estos roedores pertenecen al grupo de los mamíferos altriciales, lo que implica que, luego de su nacimiento, requieren asistencia materna constante durante un tiempo variable, antes de desenvolverse de manera independiente. Los roedores altriciales suelen ser sordos al nacer y el momento del comienzo de la audición varía según la especie. En el caso de los ratones, éste tiene lugar

alrededor de los días postnatales (P) 12 y 14 (Ehret, 1976). En consecuencia, el sistema auditivo periférico de estos animales termina de desarrollarse luego del nacimiento, y se considera que su madurez se alcanza alrededor de P20. Por este motivo se dice que el sistema auditivo está sujeto a un desarrollo postnatal, lo que implica cambios morfológicos y fisiológicos que determinan la funcionalidad del sistema auditivo (Bulankina y Moser, 2012). En esta sección en particular nos referiremos a antecedentes obtenidos a partir de experimentos con ratas y ratones indistintamente, ya que presentan patrones de desarrollo postnatal semejantes. Por empezar, al nacer el canal auditivo (ver **Figura 1**) se encuentra cerrado en estos animales, y su apertura empieza alrededor de P8 de manera que las ondas de sonido comienzan a ser transmitidas hacia el oído interno a partir de ese momento (Mikaelian y Ruben, 1965). Además, las concentraciones iónicas definitivas en la perilinfa y endolinfa, que determinan el potencial endococlear necesario para la transducción del sonido, se establecen entre P12-14 (Schmidt y Fernandez, 1963). También la adquisición de funcionalidad en la mecanotransducción de CCEs sigue un patrón espacio-temporal, comenzando alrededor de P0 en la región basal de la cóclea para culminar alrededor de P9 en la región apical (Waguespack et al., 2007; Lelli et al., 2009). Por último, la expresión de prestina en la membrana lateral de las CCEs también se ve modificada en función de la edad postnatal, alcanzando una expresión comparable a la de animales adultos entre P12-14 (Oliver y Fakler, 1999; Abe et al., 2007; Hang et al., 2016). Estos cuatro procesos resultan esenciales para establecer el comienzo de la audición, y se ven acompañados por una serie de modificaciones morfológicas y funcionales en la innervación del epitelio auditivo, que se detallan en la **Figura 7** y se explican a continuación.

En lo que respecta a la innervación aferente, hacia el final del periodo de gestación, tanto las CCI como las CCEs en la cóclea son contactadas simultáneamente por NGEs de tipo I y II (Perkins y Morest, 1975; Echter, 1992). Estas sinapsis se ven sometidas a un proceso de poda atribuido a mecanismos de refinamiento de neuritas, retracción de NGEs ramificadas inmaduras y posterior apoptosis, gracias al cual el número de contactos se reduce en aproximadamente el 50 % (Delacroix y Malgrange, 2015). De esta manera, se alcanzará la configuración de la innervación aferente descrita en adultos, en la que, como se explicó anteriormente, las NGEs de tipo I contactarán únicamente a las CCI, y las de tipo II a las CCEs (**Figura 7**, panel inferior). Por su parte, la innervación eferente sobre el epitelio sensorial auditivo

es detectable pasada la mitad del desarrollo embrionario (Fritzschi, 1996), en tanto que las fibras eferentes MOC maduran tempranamente y proyectan transitoriamente a la región de las CCI, antes de alcanzar su destino final, sobre la membrana basal de las CCEs (Cole y Robertson, 1992; Simmons et al., 1996, 1998). Esta sinapsis transitoria entre las fibras MOC y las CCI es, a grandes rasgos, igual que la sinapsis MOC-CCE ya que también es colinérgica e inhibitoria gracias a la presencia de nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y canales SK2 (Glowatzki y Fuchs, 2000; Gomez-Casati et al., 2005). Si bien se han observado respuestas a ACh en las CCI de animales P0, la funcionalidad completa de la misma se alcanza alrededor de P3-4 gracias al acople entre los nAChRs y los SK2, alcanzándose la máxima funcionalidad alrededor de P9, y comenzando a desaparecer para el comienzo de la audición (Lieberman et al., 1990; Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Del mismo modo, la invasión MOC se hace evidente sobre las CCEs desde P2 (Simmons, 2002), aunque su funcionalidad fue observada recién entre P6 y P8 (He y Dallos, 1999; Roux et al., 2011).

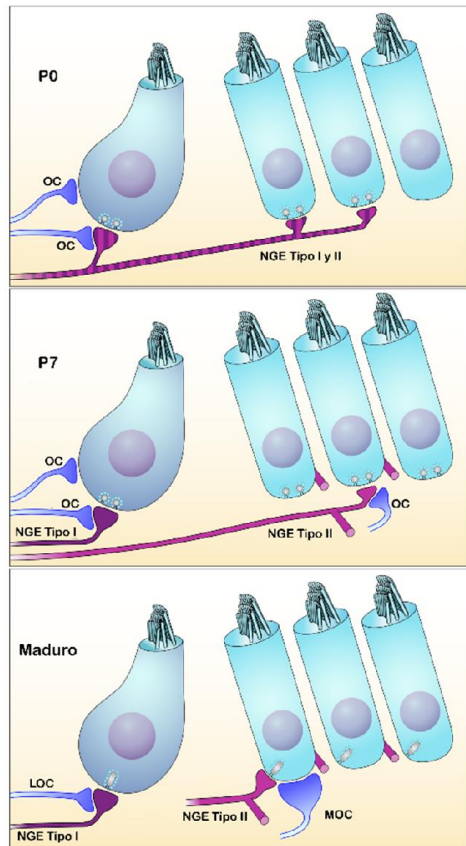


Figura 7 | Desarrollo postnatal de la innervación coclear.

Panel superior: al momento del nacimiento, el polo basal de las CCI presenta tres tipos de contactos sinápticos: 1) aferentes inmaduros axosómicos; 2) eferentes transitorios axosómicos; 3) eferentes axodendríticos. En este estadio, CCI y CCE pueden ser invadidas por la misma NGE. Las CCE no presentan invasión eferente en este estadio del desarrollo, mientras que las eferentes (OC) sobre las CCI podrían provenir tanto del LSO como del VNTB. **Panel Medio:** al finalizar la primera semana de vida, ya se produjo una diferenciación en las NGEs, de manera tal que las CCI se encuentran invadidas por NGEs de tipo I, y las CCEs por NGEs de tipo II. Se observan fibras eferentes en la región de las CCEs, aunque aún no hay contactos funcionales (estos se encuentran recién en P8). **Panel inferior:** en la cóclea madura, las CCI solo presentan sinapsis aferentes con las NGEs de tipo I, mientras que las fibras LOC hacen contactos axodendríticos sobre estas aferencias. En cambio, los terminales eferentes MOC hacen sinapsis directa sobre la base de las CCEs, que además presenta contactos aferentes con NGEs de tipo II. Figura modificada a partir de Bulankina y Moser, 2012.

Una característica común al desarrollo de todos los circuitos neuronales es la presencia de actividad eléctrica espontánea, que permite el afianzamiento de ciertas conexiones sinápticas por sobre otras, perdiéndose estas últimas a través de un fenómeno de podado sináptico, que modela la estructura de los circuitos (Spitzer, 2006). El sistema auditivo no es una excepción, ya que también presenta actividad sináptica espontánea coordinada, que contribuye al refinamiento del circuito tanto a nivel de la cóclea como de los núcleos en el CNS, resultando clave para la determinación de los mapas tonotópicos en la vía auditiva ascendente (Tritsch et al., 2007, 2010; Wang y Bergles, 2015; Wang et al., 2015; Babola et al., 2018; Eckrich et al., 2018; Harrus et al., 2018). Esta actividad espontánea en la vía aferente se originaría a partir de olas de ATP provenientes de las células de soporte alrededor de las CCI (Tritsch et al., 2007; Tritsch y Bergles, 2010), que inducirían el disparo de potenciales de acción mediados por Ca^{2+} en las mismas, con la consecuente liberación de glutamato y activación de la vía auditiva ascendente. Sin embargo, esta hipótesis fue puesta en duda por trabajos más recientes, argumentando que la señalización mediada por ATP no interviene en los patrones de disparo de potenciales de acción espontáneos (Sendin et al., 2014). Más aún, se ha propuesto que, durante la segunda semana de desarrollo postnatal en particular, la actividad espontánea en las CCIs puede explicarse si se tiene en cuenta el potencial de reposo de las CCIs y la contribución de la corriente producida por el complejo mecanotransductor en reposo (Johnson et al., 2012). Resulta interesante destacar que, si bien en el campo está aceptado que esta actividad espontánea desaparece para el comienzo de la audición, presuntamente junto a toda actividad espontánea que involucre Ca^{2+} , recientemente se han reportado olas de Ca^{2+} espontáneas en cócleas de animales adultos (Sirko et al., 2019). No obstante, está claro que para el comienzo de la audición la señalización mediada por potenciales de acción en las CCIs se ve remplazada por potenciales graduados que determinan los ciclos de despolarización e hiperpolarización antes mencionados. Esto es así gracias a cambios en las conductancias en la membrana de las CCIs, cuyo perfil de expresión de canales iónicos se ve modificado durante el desarrollo postnatal, alterando en última instancia también el potencial de membrana de las mismas, que también varía con el desarrollo (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 1999, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; Beutner y Moser, 2001). En paralelo, las conductancias en las CCEs también sufren modificaciones considerables durante las dos semanas previas al comienzo de la audición, e incluso se ha demostrado que en los primeros días del desarrollo postnatal, estas células son capaces de disparar

potenciales de acción, aunque su función es aún desconocida (Marcotti y Kros, 1999; Marcotti et al., 1999).

La actividad de la sinapsis eferente transitoria MOC-CCI es esencial para regular el disparo espontáneo de potenciales de acción en las CCIs durante el desarrollo postnatal (Johnson et al., 2011b; Sendin et al., 2014), y en consecuencia para determinar la organización tonotópica y la correcta funcionalidad de la vía auditiva ascendente (Clause et al., 2014, 2017). Además, existen evidencias de que esta actividad eferente es necesaria para la correcta maduración de la sinapsis en cinta de las CCIs (Johnson et al., 2013). A pesar del corto período de tiempo en el que esta sinapsis es funcional, se han descrito cambios funcionales que determinan las propiedades de transmisión sináptica en la misma, en función de la edad dentro del período de desarrollo postnatal (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019), como se explicará en mayor detalle en introducción del Capítulo I (sección **I. Introducción**). Por último, cabe mencionar que existen evidencias morfológicas y funcionales que sugieren que las fibras MOC vuelven a inervar a las CCIs en animales de edad avanzada, sugiriendo un posible rol en un contexto de pérdida de audición producto del envejecimiento del epitelio auditivo (Lauer et al., 2012; Zachary y Fuchs, 2015).

Transmisión sináptica

Fundamentos de la transmisión sináptica

En las sinapsis químicas, una variación en el potencial de membrana en la neurona presináptica (ya sea en forma de potencial de acción o potencial graduado), determina la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDVs) y la consecuente entrada de dicho catión a la célula. Una vez dentro del espacio celular, el Ca^{2+} provoca la rápida fusión de vesículas sinápticas, cargadas con neurotransmisores, a la membrana plasmática. Estas vesículas se localizan cerca de los CCDVs y, junto a una variedad de proteínas estructurales, conforman los sitios activos de la sinapsis. La fusión de vesículas sinápticas determina la liberación de los neurotransmisores al espacio extracelular entre las neuronas, o brecha sináptica. Allí, los neurotransmisores son detectados por receptores específicos embebidos en la membrana de la célula postsináptica, donde gatillan diversas respuestas, pudiendo ser éstas excitatorias o inhibitorias (Purves, 2004).

Los estudios fundacionales sobre transmisión sináptica fueron realizados en preparaciones de placa neuromuscular de rana. En estos trabajos se observó, a través de registros intracelulares en las fibras musculares, la existencia de eventos postsinápticos discretos correspondientes a la liberación de ACh, el neurotransmisor que interviene en la sinapsis entre las motoneuronas y las fibras musculares (Fatt y Katz, 1950, 1952). Estos trabajos fueron complementados por observaciones en la placa neuromuscular, tanto de la rana como de los mamíferos (Del Castillo y Katz, 1954a; Liley, 1956), indicando que las amplitudes de estas respuestas postsinápticas siguen una distribución binomial, en la que los valores de amplitud de las mismas son múltiplos enteros de un mismo valor que corresponde a la amplitud producida por la liberación de una única vesícula, o “cuanto”. A partir de este tipo de observaciones experimentales se elaboraron los primeros modelos “cuánticos” que explican el funcionamiento de las sinapsis químicas, cuya validez general se mantiene hasta la actualidad. En este contexto, los parámetros fundamentales que definen a una sinapsis son i) la amplitud de la respuesta producida por una única vesícula (“amplitud cuántica”), ii) el número de sitios activos independientes (N), y iii) la probabilidad de liberación individual de cada una de estos sitios (P), que se supone constante. A partir de estos parámetros se define el número de vesículas que se libera, en promedio, ante la llegada de un potencial de acción a un terminal presináptico. Este valor se denomina “contenido cuántico” (m), puede expresarse como $m = P \cdot N$ y da un indicio de la fuerza de una sinapsis (Bennett y Kearns, 2000). En condiciones en las que P es baja, la liberación de vesículas puede modelarse con una distribución de Poisson (ver **Materiales y Métodos**). La ventaja de este modelo es que permite estimar m sin necesidad de conocer los valores de P y N , parámetros típicamente inaccesibles en la mayoría de los sistemas experimentales. Sin embargo, existen ocasiones en los que no se cumple alguno de los supuestos necesarios para utilizar esta aproximación estadística (valores de P elevados, sitios activos no independientes, o con valores de P no constantes para los distintos sitios) y son necesarios modelos más complejos para describir el funcionamiento sináptico (Silver, 2003).

Una característica saliente de las sinapsis químicas es que las vesículas sinápticas que se encuentran en los sitios activos del terminal y sus proximidades, pueden ser reclutadas alternativamente en función de los requerimientos específicos de una sinapsis, y de esa manera contribuir diferencialmente a la señalización entre dos neuronas (Rizzoli y Betz, 2005; Chamberland y

Tóth, 2016). La existencia de distintas poblaciones de vesículas involucradas en la transmisión sináptica evocada por actividad eléctrica se ha propuesto tiempo atrás, primero en sinapsis colinérgicas de mamíferos (Liley y North, 1953; Birks y MacIntosh, 1961; Elmquist y Quastel, 1965) para luego extenderse a muchas otras sinapsis, tanto del sistema nervioso central como periférico, en una gran variedad de especies (Rizzoli y Betz, 2005). En este sentido, en base a las características fisiológicas de las distintas poblaciones de vesículas involucradas en la liberación evocada eléctricamente, se ha propuesto la existencia de tres poblaciones de vesículas sinápticas, involucradas en distintas formas de señalización: el conjunto de vesículas listo para ser liberado (RRP, por sus siglas en inglés, *readily releasable pool*), el conjunto de vesículas reciclables y el conjunto de vesículas de reserva, representando aproximadamente el ~1-2%, ~10-20% y ~80-90% del total de vesículas en un terminal, respectivamente (Rizzoli y Betz, 2005). Estos conjuntos de vesículas son morfológicamente indistinguibles, pero están espacialmente segregados (Schikorski y Stevens, 1997, 1999) y se ha sugerido que también podrían diferenciarse por la composición proteica de sus membranas (Denker et al., 2011; Lavoie et al., 2011), algo que podría determinar el destino de las vesículas durante el proceso de reciclado (Südhof, 2004; Cheung et al., 2010). Además, de estos grupos de vesículas, también se ha descrito otro conjunto de vesículas que no se movilizan en respuesta a la actividad eléctrica de los terminales, sino que participan de la liberación del neurotransmisor de manera espontánea (Sara et al., 2005; Fredj y Burrone, 2009).

En particular, el RRP está compuesto por vesículas que se encuentran ancladas a la membrana de los terminales, cerca de los CCDVs en los sitios activos, y de su tamaño puede depender la fuerza de una sinapsis (Chamberland y Tóth, 2016). Esto quiere decir que el valor de contenido cuántico, además de depender de los parámetros como P y N como se detalló recientemente, estará también relacionado al número de vesículas que puedan ser liberadas ante la llegada de un potencial de acción, es decir, al tamaño del RRP. De hecho, se ha observado que al verse modificado su tamaño, pueden alterarse las propiedades de la transmisión sináptica (Thanawala y Regehr, 2013; Kearney et al., 2019), razón por la cual se han desarrollado métodos que permiten estimarlo fehacientemente (Kaeser y Regehr, 2017).

Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CCDVs)

Como se explicó anteriormente, el Ca²⁺ cumple un rol fundamental en la liberación del neurotransmisor (Schneggenburger y Rosenmund, 2015). La llegada de un potencial de acción produce la apertura de CCDVs en el terminal presináptico, permitiendo la entrada de Ca²⁺ a favor de su gradiente electroquímico hacia el interior del mismo. Esto determina un incremento transitorio y localizado en la concentración de Ca²⁺ intracelular que es detectado por proteínas específicas, que en última instancia promueven la fusión de vesículas cargadas con el neurotransmisor a la membrana plasmática. Este proceso es sumamente rápido y está localmente restringido a micro o nanodominios en los que coexisten poblaciones de CCDVs agrupados en una alta densidad, junto a vesículas sinápticas listas para ser liberadas (Adler et al., 1991; Llinás et al., 1992; Stanley, 1993; Augustine, 2001; Chen et al., 2015; Nakamura et al., 2015; Miki et al., 2017). Además, para asegurar una transmisión sináptica confiable, el proceso de exocitosis de los neurotransmisores debe ser sumamente eficaz. Esto resulta posible gracias a la existencia de un mecanismo cooperativo del Ca²⁺ en la neurotransmisión, por el cual la liberación del neurotransmisor no sigue una dependencia lineal con la concentración de Ca²⁺ extracelular. Este mecanismo fue descrito por primera vez en la placa neuromuscular de la rana (Dodge y Rahamimoff, 1967), y luego fue validado en distintos modelos, incluyendo a los mamíferos (Jan y Jan, 1976; Smith et al., 1985; Heidelberger et al., 1994; Mintz et al., 1995). Las evidencias indican que el efecto cooperativo del Ca²⁺ sobre la neurotransmisión estaría dado por alguno de los componentes proteicos de la maquinaria de fusión, y en particular la atención se ha centrado sobre las distintas isoformas de sinaptotagmina, proteína capaz de detectar la presencia de este ion en la mayoría de las sinapsis (Augustine, 2001; Schneggenburger y Rosenmund, 2015).

Los CCDVs son complejos multiproteicos presentes en la membrana que, como su nombre lo indica, permiten la entrada de Ca²⁺ en respuesta a cambios en el voltaje de la membrana. Estos canales pueden estar compuestos por hasta cinco subunidades distintas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ y δ . A través de la purificación y el subsiguiente análisis de estas proteínas se llegó a la conclusión de que la subunidad $\alpha 1$ es la que forma el poro del canal y define la mayoría de las propiedades farmacológicas, mientras que el resto serían subunidades auxiliares que cumplen un rol complementario en la determinación de las propiedades farmacológicas y biofísicas del canal (Catterall, 2011). Como se observa en la **Figura 8**, la

subunidad $\alpha 1$ está formada por cuatro dominios (I-IV) con seis pasos transmembrana cada uno (S1-S6). Dentro de esta estructura, el paso S4 funciona como sensor de voltaje, generando cambios conformacionales en respuesta a cambios en el potencial de membrana, mientras que los pasos S5 y S6 revisten el poro del canal.

La diversidad de los CCDVs está determinada por la identidad molecular de la subunidad $\alpha 1$, pudiendo diferenciarse por su funcionalidad, localización, y por la existencia de antagonistas específicos para cada uno de ellos (**Tabla I**) (Catterall, 2011). En este sentido, se distinguen a grandes rasgos cinco tipos de CCDVs: de tipo L, P/Q, N, R y T. Además, se puede agrupar a los CCDVs en función del voltaje necesario para activarlos: los cuatro primeros requieren despolarizaciones grandes para lograr su activación ($V_m \sim 30$ mV), mientras que los de tipo T se activan a potenciales menos despolarizados ($V_m \sim -55$ mV a -20 mV) (Findeisen y Minor, 2010). Los CCDVs de tipo P/Q, N y R están normalmente asociados a la neurotransmisión en sinapsis rápidas del SNC (Catterall, 2011). Los de tipo L, por el contrario, no suelen estar involucrados en la liberación en sinapsis rápidas (Catterall, 2011), aunque

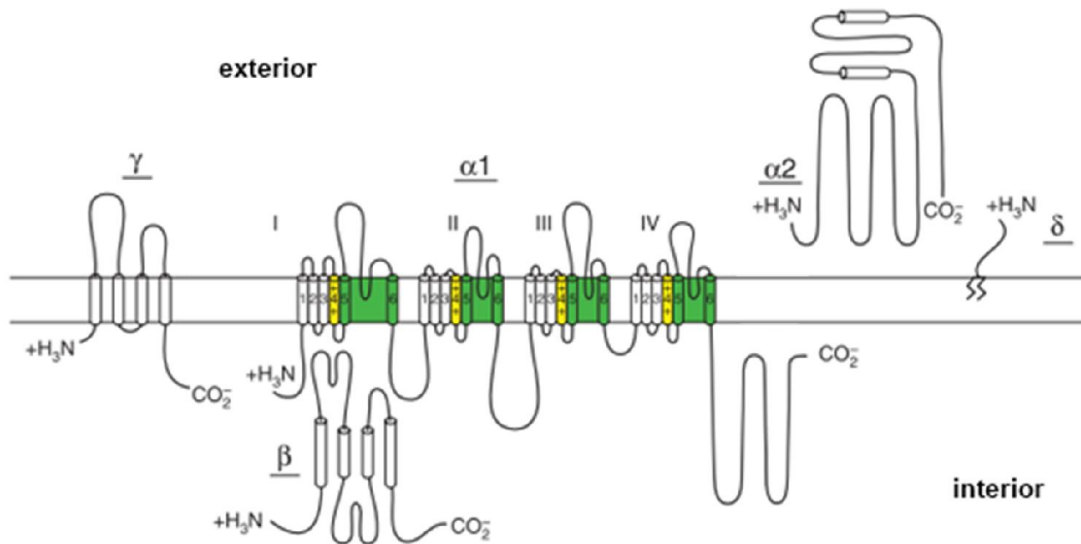


Figura 8 | Estructura de los CCDVs.

La subunidad $\alpha 1$, que forma el poro del canal, se divide en cuatro dominios (I-IV), con seis pasos transmembrana cada uno (S1-S6). En todos los dominios, el sensor de voltaje se encuentra en el paso transmembrana S4, y la cara interna del poro está revestida por S5 y S6. La subunidad β siempre se encuentra del lado intracelular. Las subunidades $\alpha 2$ y δ forman un dímero que se asocia a $\alpha 1$ en la cara extracelular. La subunidad γ es también una proteína transmembrana, pero no siempre se encuentra presente. Figura modificada a partir de Catterall, 2011.

pueden participar de este proceso en condiciones particulares (Katz et al., 1996; Sugiura y Ko, 1997; Rosato Siri y Uchitel, 1999; Urbano et al., 2001; Flink y Atchison, 2003; Perissinotti et al., 2008). En cambio, estos canales típicamente median la liberación de hormonas (Catterall, 2011) y de neurotransmisores en sinapsis tónicas, como las sinapsis en cinta presentes en las CCI y los fotorreceptores (Pangrsic et al., 2018). Los CCDVs de tipo T, por su parte, han sido menos estudiados, en parte porque el descubrimiento de un antagonista específico para ellos fue reciente (Xiang et al., 2011). No obstante se sabe que no requieren subunidades auxiliares para su activación, siendo α_1 la única indispensable (Findeisen y Minor, 2010).

Tabla I | Identidad, antagonistas y principales funciones de los diferentes CCDVs.

Tipo de I_{Ca}	Subunidad α_1	Antagonista específico	Funciones fisiológicas
L	Ca _v 1.1	Dihidropiridinas	-Acople excitación-contracción en el músculo esquelético -Regulación de la transcripción
	Ca _v 1.2	Dihidropiridinas	-Acople excitación-contracción en el músculo cardíaco y liso -Secreción endócrina -Transitorios de Ca ²⁺ en somas neuronales y dendritas -Regulación de la transcripción y de actividad enzimática
	Ca _v 1.3	Dihidropiridinas	-Secreción endócrina -Marcapasos cardíaco -Transitorios de Ca ²⁺ en somas neuronales y dendritas -Neurotransmisión en la sinapsis en cinta de la cóclea
	Ca _v 1.4	Dihidropiridinas	-Neurotransmisión en la sinapsis en cinta de la retina
P/Q	Ca _v 2.1	ω -agatoxina IVA y IVB	- Neurotransmisión -Transitorios de Ca ²⁺ en dendritas
N	Ca _v 2.2	ω -conotoxina GVIA	- Neurotransmisión -Transitorios de Ca ²⁺ en dendritas
R	Ca _v 2.3	SNX-482	- Neurotransmisión -Transitorios de Ca ²⁺ en dendritas
T	Ca _v 3.1-3	ML-218	-Marcapasos

Excitabilidad neuronal y canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺

La excitabilidad de las neuronas depende de su potencial de membrana, parámetro determinado por la concentración de las especies iónicas a ambos lados de la membrana plasmática y por la permeabilidad selectiva de la misma. En este sentido, el K⁺ es la especie iónica más determinante sobre el potencial de membrana (Hodgkin y Horowicz, 1959), por lo que los canales de K⁺ tienen un

papel central en su regulación y por ende en la excitabilidad de las membranas neuronales. Existe una gran diversidad de canales de K^+ , siendo los más ubicuos aquellos que se encuentran activos en el reposo y los que se activan por voltaje (Hibino et al., 2010; Johnston et al., 2010). Además de éstos, existen canales de K^+ cuya actividad depende de la presencia de Ca^{2+} intracelular, y que se subdividen en dos tipos: canales de tipo BK y de tipo SK, que pueden distinguirse principalmente por su conductancia individual y su sensibilidad al Ca^{2+} , que determina su distancia a las fuentes de dicho catión (Fakler y Adelman, 2008).

Estructuralmente, los canales BK están conformados por tetrámeros de subunidades α , de siete pasos transmembrana cada una, que constituyen el poro del canal y comparten el sensor de voltaje con los canales de K^+ dependientes de voltaje. Además, presentan un dominio intracelular sensible al Ca^{2+} , lo que determina su activación por un efecto cooperativo entre el Ca^{2+} y la variación del potencial de membrana (Griguoli et al., 2016). Se caracterizan, además, por poseer una alta conductancia individual, y se expresan en la mayoría de las regiones del SNC, cumpliendo una multiplicidad de funciones (Fakler y Adelman, 2008). En particular, se ha demostrado que pueden expresarse en terminales presinápticos (Griguoli et al., 2016), donde regulan la excitabilidad neuronal al activarse durante la fase de repolarización del potencial de acción, contribuyendo especialmente en la fase de post-hiperpolarización rápida, clave para una eficiente repolarización del terminal (Adams et al., 1982; Storm, 1987). Por este motivo, su actividad resulta relevante para sostener una actividad sináptica de alta frecuencia (Hu et al., 2001; Klyachko et al., 2001; Gu et al., 2007). Los canales BK requieren de una fuente que los provea de Ca^{2+} , y en este sentido se ha demostrado que los mismos pueden encontrarse formando complejos macromoleculares con CCDVs de tipo L, P/Q y N (Berkefeld et al., 2006), mientras que la distancia entre éstos y los BK sería consistente con la existencia de nanodominios de Ca^{2+} (Müller et al., 2007). Se sabe, además, que la respuesta de estos complejos depende, en última instancia, de qué CCDVs particulares formen parte de los mismos (Berkefeld y Fakler, 2008). Existen sobradas evidencias de la presencia de estos complejos a nivel presináptico y de sus funciones en el SNC (Marrion y Tavalin, 1998; Grunnet y Kaufmann, 2004; Raffaelli et al., 2004; Womack et al., 2004; Deng et al., 2013; Vivas et al., 2017), así como en la periferia, tanto en la placa neuromuscular (Robitaille y Charlton, 1992; Robitaille et al., 1993) como en el sistema auditivo de anfibios (Roberts et al., 1990) y mamíferos

(Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019). Si bien los complejos entre canales BK y CCDVs en los terminales presinápticos han sido extensamente caracterizados, dichos canales pueden participar también de otros mecanismos. En primer lugar, cabe destacar que también existen evidencias de la localización postsináptica de los canales BK (Sailer et al., 2006), algo que resulta de particular relevancia en el sistema auditivo de los mamíferos, donde se ha demostrado que, al igual que los canales de tipo SK2, pueden estar funcionalmente acoplados al nAChR $\alpha 9\alpha 10$, aunque esto estaría restringido únicamente a las regiones basales de la cóclea (Wersinger et al., 2010; Rohmann et al., 2015). En segundo lugar, también existen evidencias de que los canales BK pueden encontrarse en la membrana plasmática sin formar complejos con otras proteínas, y si bien su función específica no ha sido establecida, se cree que podrían funcionar como un mecanismo de emergencia ante entradas masivas de Ca^{2+} que generen señales deslocalizadas y puedan inducir mecanismos apoptóticos (Hu et al., 2001). Más aún, se ha demostrado la existencia de canales BK que no forman complejos en las CCI de los mamíferos (Pyott et al., 2004).

Los canales de tipo SK, en cambio, se caracterizan por una menor conductancia individual que los BK, mientras que a diferencia de estos últimos sólo dependen del Ca^{2+} . Su estructura está dada por tetrámeros de subunidades α que conforman el poro, cada una de ellas asociada a calmodulina, una proteína capaz de detectar el Ca^{2+} y gatillar un cambio conformacional, que determina la apertura del canal (Fakler y Adelman, 2008). A diferencia de los canales BK, se conocen diversas fuentes de Ca^{2+} capaces de proveer de este catión a los canales de tipo SK. En particular, se sabe que pueden estar funcionalmente acoplados a CCDVs de tipo L y R (Marrion y Tavalin, 1998; Bloodgood y Sabatini, 2007), así como a receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Ngo-Anh et al., 2005) en el SNC, y también, como ya se ha explicado anteriormente, al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en el sistema auditivo de mamíferos y de aves (Yuhás y Fuchs, 1999; Oliver et al., 2000).

Plasticidad sináptica de corto término

Las sinapsis químicas poseen la capacidad de modificar su comportamiento en función de su actividad pasada, determinando que la transmisión sináptica sea un proceso dinámico que permite una regulación fina de los circuitos subyacentes a múltiples mecanismos (Jackman y Regehr, 2017).

Dependiendo de sus características intrínsecas y de la naturaleza de la actividad a la que esté sujeta, una sinapsis puede aumentar o disminuir su fuerza. Estos cambios en la fuerza de las sinapsis dependientes de la actividad se definen genéricamente como plasticidad sináptica y se distinguen entre procesos de largo término, cuando su efecto decae en el orden de minutos u horas, o de corto término, cuando su efecto decae en fracciones de segundo. Además, los procesos de plasticidad de corto término pueden diferenciarse según su efecto sobre la fuerza sináptica, de manera que si producen una disminución en la misma, se los denomina depresión sináptica, mientras que si producen un aumento, se los denomina facilitación sináptica (Zucker y Regehr, 2002). Estos procesos de plasticidad definen el comportamiento final de una sinapsis, que dependerá del balance entre ellos. Por ejemplo, aquellas sinapsis que presenten un alto grado de depresión serán muy poco eficientes en transmitir actividad de alta frecuencia, por lo que actuará como un filtro pasa bajos. Análogamente, una sinapsis con alto grado de facilitación funcionará como un filtro pasa altos. De este modo, mediante la expresión de uno u otro tipo de plasticidad de corto término, una sinapsis puede filtrar la información que es detectada por la célula postsináptica, contribuyendo así al procesamiento de la información (Fortune y Rose, 2001).

La facilitación y depresión normalmente se evidencian mediante el uso de protocolos de pulsos pareados o de trenes de estímulos de corta duración, en los que la respuesta sináptica crece conforme se suceden los estímulos, mientras que el efecto disminuye a medida que los estímulos se separan entre sí (Del Castillo y Katz, 1954b; Mallart y Martin, 1967; Debanne et al., 1996; Murthy et al., 1997; Goutman et al., 2005; Ballesterero et al., 2011). Existen numerosas evidencias indicando que estos procesos de plasticidad de corto término están asociados a cambios en la liberación del neurotransmisor en los terminales sinápticos, o lo que es lo mismo, a cambios en la probabilidad (P) de liberación en un sitio activo, sin cambios en el valor del tamaño cuántico, es decir, en la cantidad de neurotransmisor en una vesícula. Esto permite pensar que el hecho de que una sinapsis tienda a deprimir o facilitar depende en última instancia de factores presinápticos que puedan afectar la probabilidad de liberación en un sitio activo. De hecho, está claro que aquellas sinapsis con altos valores iniciales de P (o contenido cuántico elevado) son más susceptibles a deprimir, ya que un único evento presináptico puede depletar el RRP, mientras que aquellas con valores iniciales de P más bajos (o bajo contenido cuántico) tienden a facilitar

(Murthy et al., 1997), lo que sugiere además que el tamaño del RRP puede ser un factor relevante (Jackman y Regehr, 2017). No obstante, también se ha reportado que el reclutamiento de un mayor número de sitios activos puede contribuir a estos procesos, así como algunos fenómenos postsinápticos (Zucker y Regehr, 2002).

En el marco de esta Tesis, los procesos de facilitación sináptica serán de particular relevancia, por lo que se hará hincapié en ellos. Uno de los principales mecanismos que podrían explicar la facilitación sináptica es la llamada hipótesis del Ca^{2+} residual, para la cual existe un amplio cuerpo de evidencia (Katz y Miledi, 1968; Stanley, 1986; Bain y Quastel, 1992; Yamada y Zucker, 1992; Delaney y Tank, 1994; Regehr et al., 1994; Tank et al., 1995; Chen y Regehr, 1999). Según esta teoría, ilustrada en la **Figura 9A**, la aplicación de dos estímulos consecutivos determina que la despolarización y apertura de CCDVs provocada por el primero, genere un remanente de Ca^{2+} que, ante la llegada de un segundo estímulo que produzca una nueva entrada de Ca^{2+} , la concentración de este catión en el sitio activo sea más alta de lo normal. De esta manera, se liberarán más vesículas en el segundo estímulo que en el primero, siempre y cuando el RRP no hubiera sido depletado inicialmente. Además, para que esto suceda, el segundo estímulo debe ser lo suficientemente cercano como para que el Ca^{2+} no difunda hacia otras regiones, de manera tal que este fenómeno será dependiente de la frecuencia de estimulación.

Además de este mecanismo, se han propuesto otras alternativas, algunas de las cuales también involucran el Ca^{2+} presináptico como factor determinante, pero a través de mecanismos complementarios con el recientemente expuesto (Jackman y Regehr, 2017). Por un lado, se ha propuesto que la existencia de un sensor de Ca^{2+} específico para la facilitación (**Figura 9B**), que podría aumentar la eficacia del mismo actuando sobre la maquinaria de liberación (Sippy et al., 2003). En este sentido, se ha propuesto recientemente que una de las isoformas de sinaptotagmina, Syt7, sería necesaria para que haya facilitación (Jackman et al., 2016). También se ha observado la existencia de facilitación a partir del ensanchamiento de los potenciales de acción presinápticos en un contexto de estimulación repetitiva (**Figura 9C**). Esto estaría relacionado con la inactivación de corrientes de K^+ , de manera tal que la fase de repolarización de los potenciales de acción se vea afectada, siendo más lenta

y permitiendo una mayor entrada de Ca^{2+} por cada evento (Jackson et al., 1991). Además, se ha postulado que las corrientes de Ca^{2+} a través de los CCDVs podrían estar sometidas a algún tipo de

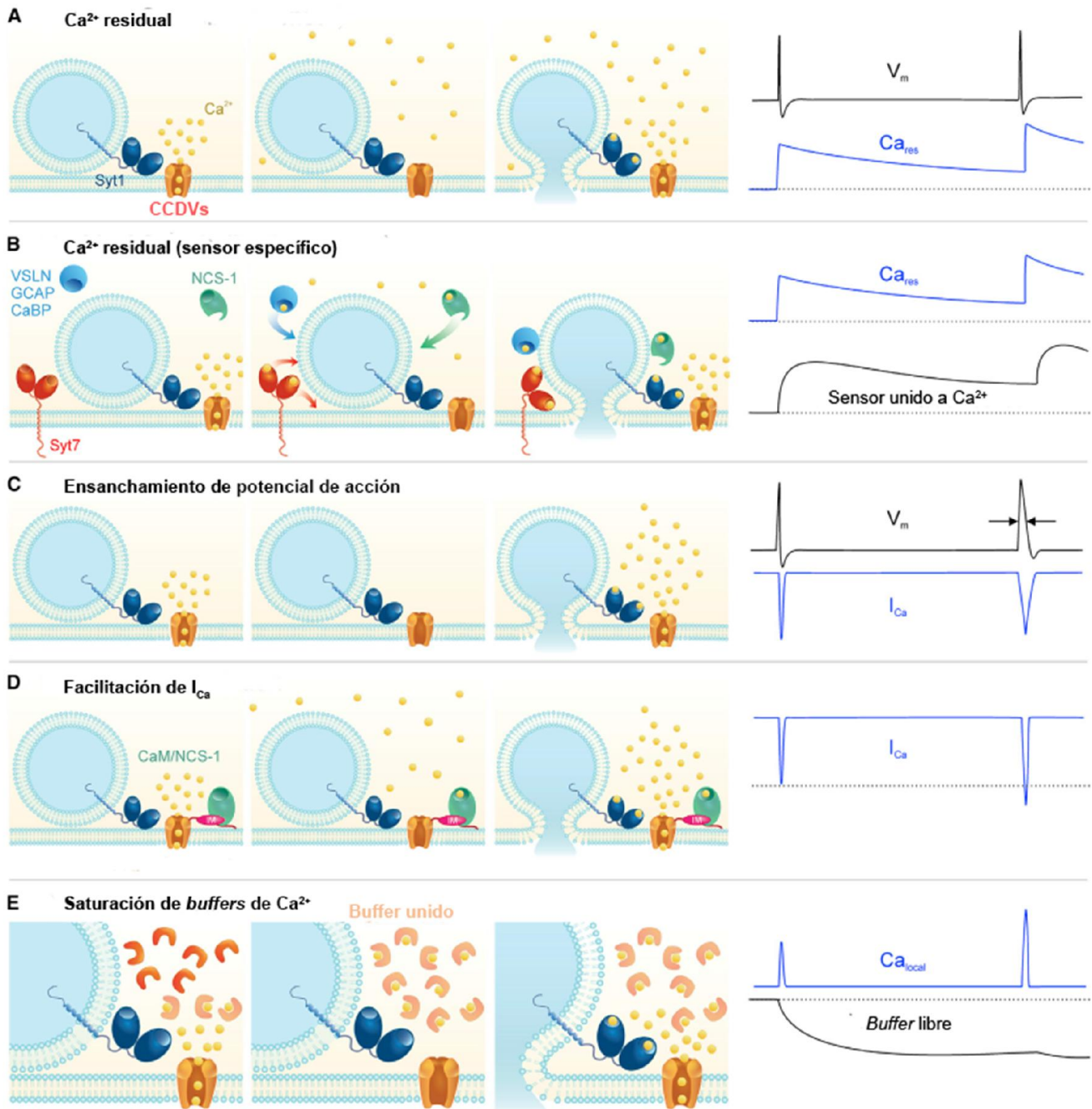


Figura 9 | Posibles mecanismos de facilitación de corto término.

A, Hipótesis del Ca^{2+} residual. Los CCDVs se abren ante la llegada de un primer potencial de acción activando una corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}), que genera el incremento de su concentración en el sitio activo (Ca_{local}). El Ca^{2+} remanente (Ca_{res}) se suma al Ca^{2+} que entra ante un segundo potencial de acción. **B**, Además, se ha propuesto que el Ca_{res} podría unirse a un sensor que mediaría la facilitación (posiblemente Sy7), distinto al sensor de Ca^{2+} canónico. Esto aumentaría P mediante la regulación de las distintas proteínas que componen la maquinaria de liberación. **Continúa en la página siguiente...**

...viene de la página anterior. **C**, Ensanchamiento de potenciales de acción. Si la frecuencia de ocurrencia de los eventos es muy alta, podría producirse una inactivación de canales de K^+ , prologando la duración de los potenciales de acción subsiguientes, y en consecuencia la I_{Ca} producto de la despolarización. **D**, Facilitación de la I_{Ca} . El Ca^{2+} del primer potencial de acción podría unirse a proteínas sensoras de Ca^{2+} que interactuarían con los CCDVs, modificando la I_{Ca} en los estímulos subsiguientes. **E**, Saturación de buffers de Ca^{2+} . Durante el primer potencial de acción, entraría suficiente Ca^{2+} para ocupar todas las moléculas de buffer, de manera que al llegar un segundo potencial de acción no queda buffer remanente que capture parte del Ca^{2+} que ingresa, de manera que el Ca_{local} actuará en su totalidad sobre la maquinaria de liberación. Figura modificada a partir de Jackman & Regehr 2017.

facilitación intrínseca, dependiente a su vez de la entrada de Ca^{2+} (Charlton et al., 1982; Atluri y Regehr, 1996) y contribuyendo también a la facilitación sináptica (**Figura 9D**). Por último, también se considera que existen mecanismos de saturación de buffers intracelulares de Ca^{2+} (**Figura 9E**), de manera que la entrada de Ca^{2+} producida por un segundo potencial de acción dejaría una mayor proporción de calcio libre, capaz de interactuar con los sensores de calcio que disparan la liberación (Blatow et al., 2003; Felmy et al., 2003; Müller et al., 2007).

En lo que respecta a los antecedentes relevantes para esta Tesis, cabe destacar que se ha demostrado la existencia de fenómenos de facilitación presináptica en las sinapsis eferentes que actúan sobre las células ciliadas de diversas especies, tanto en mamíferos (Goutman et al., 2005; Ballesteros et al., 2011; Kearney et al., 2019) como en vertebrados no mamíferos (Art et al., 1984; Castellano-Muñoz et al., 2010).

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis fue estudiar las propiedades funcionales y moleculares de la sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas externas (CCEs), con énfasis en las características de la transmisión sináptica subyacente a la modulación de la ganancia del sistema auditivo. En este contexto, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Estudiar los cambios biofísicos, moleculares y funcionales que tienen lugar durante el desarrollo postnatal en la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs del ratón, particularmente entre el estadio correspondiente al comienzo de la audición (P11-13) y un estadio en el cual el sistema auditivo ya ha madurado (P20-22).

Objetivo 2. Caracterizar la dinámica de la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs de ratones transgénicos que portan una mutación puntual en el receptor nicotínico colinérgico $\alpha 9\alpha 10$. Esta mutación le confiere a dicho receptor una ganancia de función que se traduce en una inhibición eferente exacerbada y una mayor protección del sistema auditivo frente al trauma acústico causado por estímulos sonoros de alta intensidad.

MATERIALES y MÉTODOS

Disección del órgano de Corti

El día de nacimiento de los ratones fue considerado como día postnatal (P) 0. Para el Capítulo I de este trabajo se emplearon ratones Balb/C en dos estadios del desarrollo postnatal, correspondientes a P11-13 y P20-22. Para el Capítulo II se utilizaron ratones transgénicos de P11-13, desarrollados previamente en nuestro laboratorio y mantenidos en un fondo genético FVB (Taranda et al., 2009). En dichos animales se sustituyó una treonina por una leucina en la posición 9' del paso transmembrana 2 de la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. Por esta razón son denominados *knock-in* para la mutación L9'T o simplemente *L9'T*. Aquellos animales que no portan la mutación se han denominado a lo largo de este trabajo como *wild-type*, o *wt*. En todos los casos se utilizaron animales de ambos sexos, indistintamente. Todos los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo a 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 agudas del órgano de Corti se realizaron bajo lupa (Leica MZ75, Alemania). En primer lugar se separó la cóclea del hueso temporal y se la colocó en una caja de Petri con solución extracelular de la siguiente composición (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; 295-300 mOsm. El hueso que recubre el tejido sensorial fue removido delicadamente con una pinza de disección, y luego se escindió la vuelta apical con ayuda de una tijera oftalmológica. Finalmente, con ayuda de un fórceps de punta fina, se removió la estría vascularis, el modiolo y la membrana tectorial. Una vez finalizada la disección, la porción de tejido correspondiente a la región apical de la cóclea se colocó sobre un cubreobjetos circular con un pin metálico adosado, que permitió inmovilizarla. El cubreobjetos con la preparación se montó posteriormente en una cámara para registros electrofisiológicos bajo un microscopio (Leica DMLFS, Leica, Alemania, o bien Olympus BX51WI, Olympus Corporation, Japón). El seguimiento visual de las preparaciones se realizó con contraste diferencial de interferencia (DIC, por sus siglas en inglés) utilizando un objetivo de inmersión en agua con un aumento de 40X, y una cámara con aumento de contraste (Hamamatsu C275410, Hamamatsu Photonics, Japón, o bien DMK 23UP1300, The Imaging Source, Estados Unidos).

Registros electrofisiológicos

Una vez bajo el objetivo 40X, el tejido fue constantemente bañado con solución extracelular fresca a través de una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3, Bioesanco, Argentina). Las CCEs fueron identificadas por su ordenamiento típico en el órgano de Corti, formando tres filas concéntricas (**Figura 10A**), y se procedió a registrar únicamente las CCEs de la primera fila, ya que son las menos dañadas durante el proceso de disección. Para ello se utilizaron electrodos de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments, Estados Unidos) con un diámetro externo de 1.2 mm, estirados con calor hasta obtener resistencias de 5.5-7.5 MΩ, mediante el uso de un estirador de pipetas vertical (PC-10, Narishige, Japón). Dichos electrodos fueron cargados con una solución de registro intracelular de la siguiente composición (en mM): KCl 140, MgCl₂ 3.5, CaCl₂ 0.1, EGTA 5mM, HEPES 5, Na₂ATP 2.5; pH 7.2; 283–290 mOsm. Para algunos experimentos del Capítulo II, se reemplazó el EGTA por BAPTA en la misma concentración, con el fin de evitar la activación por Ca²⁺ de los canales SK2 de las CCEs.

Los registros en las CCEs se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* utilizando alternativamente un amplificador Axopatch 200B o Multiclamp 700B (Molecular Devices, Estados Unidos). Las señales fueron filtradas a 2-10 kHz y digitalizadas a 10-50 kHz mediante una placa conversora analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, Estados Unidos) o NI BNC-2120 (National Instruments). Utilizando los programas pClamp 9.2 (Molecular Devices, Estados Unidos) o WinWCP v5.2.7 (desarrollado por John Dempster, University of Strathclyde, Escocia), se adquirieron señales de corriente (en modo de fijación de voltaje) o de voltaje (en modo de fijación de corriente) a través de protocolos que se detallarán en las secciones siguientes. Estos datos fueron luego analizados mediante rutinas implementadas en IgorPro 6.37 (Wavemetrics, Estados Unidos) o a través del programa Clampfit 9.2 (Molecular Devices, Estados Unidos). Se utilizó un umbral de tres a cinco veces el nivel de ruido RMS como criterio para considerar respuestas exitosas.

Para asegurar la viabilidad de la preparación, los registros electrofisiológicos se realizaron inmediatamente luego de la disección y los mismos se prolongaron hasta un máximo de dos horas en preparaciones provenientes de animales P11-13, mientras que en aquellas provenientes de ratones P20-22, los experimentos se realizaron hasta una hora post-disección. Además, habiendo accedido al

interior de las CCEs, las mismas fueron mantenidas a un potencial de sostén (V_s) de -40 mV para asegurar su viabilidad, que además fue controlada a la largo de cada experimento mediante la capacitancia (C_m), parámetro provisto por el programa utilizado para obtener los registros, y a través de un protocolo de pulsos despolarizantes que permite observar las típicas corrientes iónicas descritas previamente en las CCEs (Marcotti y Kros, 1999) (Figura 10B). En todos los casos, los experimentos fueron conducidos a temperatura ambiente (22-25° C).

Estimulación eléctrica de los axones eferentes MOC

Con el fin de producir la liberación de ACh desde los terminales eferentes MOC, se utilizó un electrodo monopolar ubicado 20-60 μM por debajo de la CCI alineada con la CCE en estudio (Figura 10A). Los estímulos eléctricos fueron aplicados a través de un electrodo de vidrio igual a los utilizados para obtener registros electrofisiológicos, pero con una resistencia de 0.4-1 $\text{M}\Omega$. El electrodo de estimulación fue llenado con solución extracelular y conectado a una fuente de voltaje constante eléctricamente aislada (estimulador Grass S48, acoplado a una unidad aisladora SIU5), activada a partir de la cual se administraron estímulos de 200-300 μA con una duración de 0.2-1 ms, gatillados desde el sistema de adquisición. La posición del electrodo de estimulación fue ajustada hasta obtener corrientes postsinápticas (eIPSCs por sus siglas en inglés, *evoked inhibitory postsynaptic currents*) de manera consistente, a una frecuencia de estimulación de 1 Hz. En las condiciones de trabajo empleadas, el E_{rev} del K^+ (E_K) es más negativo que el potencial de membrana ($V_s = -40$ mV, $E_K \sim -82$ mV), y dado que su concentración es mayor en el interior de la célula que en el exterior, la corriente de K^+ es saliente, por lo que las eIPSCs son como las que se ilustran en la Figura 10C. Como puede observarse, hay una componente rápida entrante, correspondiente a la entrada de Na^+ y Ca^{2+} por los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$, seguida inmediatamente por una corriente saliente más lenta, que corresponde al flujo de K^+ hacia el exterior de las CCEs a través de los canales SK2 (Oliver et al., 2000). Cabe destacar, además, que la corriente a través del nAChR no siempre se hace evidente en estas condiciones, en parte porque es muy rápida y en ocasiones el artefacto de estimulación puede solaparse con ella, y también porque el V_s de trabajo se encuentra relativamente cerca del potencial de reversión del nAChR ($E_{\text{nAChR}} \sim -15$ mV) (Gomez-Casati et al., 2005).

Estimación del contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE

La estimación del contenido cuántico se realizó a partir de la aplicación de protocolos en los que se estimularon las fibras MOC a una frecuencia de 1 Hz, con cien repeticiones. El valor del contenido cuántico fue estimado a partir del “método de fallas”, que asume que la liberación de vesículas sinápticas en respuesta a estímulos eléctricos sigue una distribución de Poisson, una aproximación de una distribución binomial (Del Castillo y Katz, 1954a). Para ello, se utilizaron las siguientes expresiones:

$$P_x = \frac{m^x e^{-m}}{x!} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$P_0 = e^{-m} = \frac{N_0}{N} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$m = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Si se asume que la liberación del neurotransmisor sigue una distribución de Poisson, la probabilidad (P) de que se libere un número x de vesículas ante la llegada de un potencial de acción está dada por la Ecuación 1, donde m es el número de vesículas promedio que se libera, es decir, el contenido cuántico. En el caso particular de que ante la llegada del estímulo, el número de vesículas liberadas sea cero (es decir, que se produzca una falla), la Ecuación 1 se reduce a la Ecuación 2. La probabilidad de ocurrencia de fallas, P_0 , puede estimarse como la relación entre el número de veces que se producen fallas, N_0 , y el número de repeticiones del estímulo, N (Ecuación 2). Reordenando los dos últimos términos de la Ecuación 2 se obtiene la expresión utilizada para la estimación del contenido cuántico, m , según el “método de fallas” (Ecuación 3). Cabe destacar que este método es particularmente válido para sinapsis en las que la probabilidad de liberación de una vesícula es baja, lo que se ha demostrado previamente para la sinapsis MOC-CCE (Ballesteros et al., 2011).

En la **Figura 10D** se muestra el contenido cuántico de cuatro CCEs en función de la intensidad de estimulación aplicada. En esta representación se observan dos características relevantes de la sinapsis MOC-CCE que vale la pena mencionar antes de describir los resultados de esta Tesis. En primer lugar, el contenido cuántico de las CCEs es muy variable entre ellas, lo cual es consistente con lo previamente reportado (Ballesteros et al., 2011). En segundo lugar, se observa que algunas CCEs

presentan un valor de contenido cuántico que varía con la intensidad de estimulación. Esto es consistente con información previa indicando que las CCEs reciben entre uno y tres contactos de

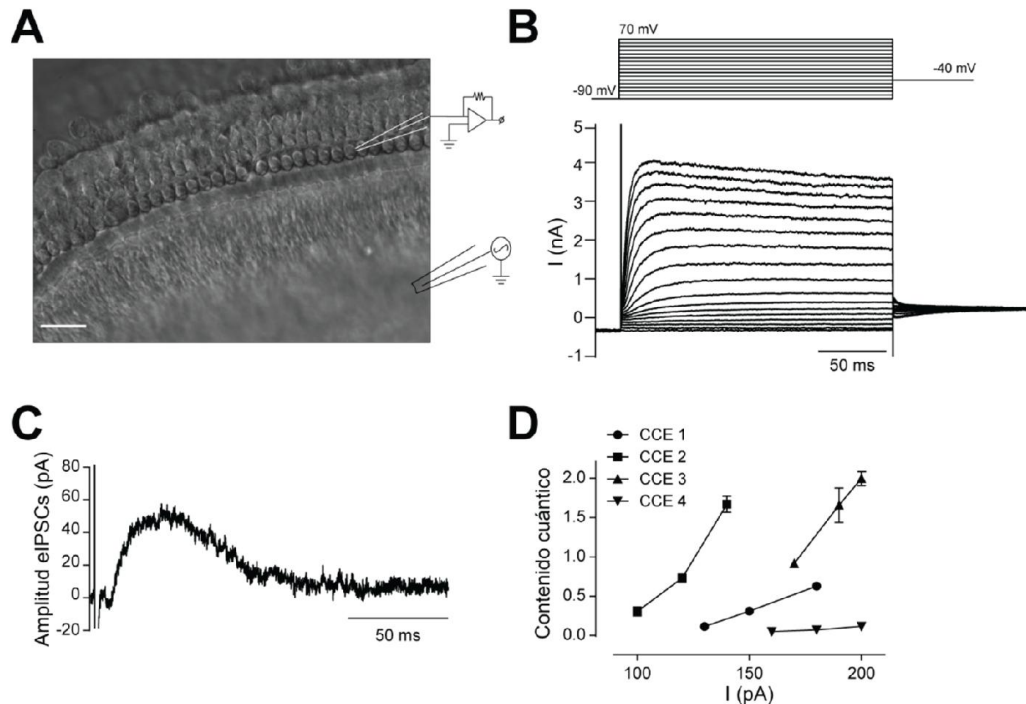


Figura 10 | Metodología de trabajo para estudiar la sinapsis MOC-CCE de ratones.

A, Imagen de la preparación bajo un objetivo de inmersión en agua con un aumento de 40X. Además, se esquematiza el arreglo de electrodos utilizados para el registro electrofisiológico de las CCEs en respuesta a la estimulación eléctrica de las fibras MOC. Barra de escala, 20 μ m. **B**, Perfil de corriente (I) de una CCE representativa (panel inferior) en respuesta a una serie de pulsos despolarizantes (panel superior): desde $V_m = -90$ mV hasta $V_m = 70$ mV. **C**, Corriente postsináptica evocada (eIPSC) típica en una CCE ante la estimulación eléctrica de las fibras MOC. $V_s = -40$ mV. **D**, Dependencia del contenido cuántico con la intensidad del estímulo en las fibras MOC. En esta figura se muestran cuatro CCEs representativas.

terminales eferentes MOC (Wilson et al., 1991; Vetter et al., 1999; Murthy et al., 2009b). Esto permite especular que, cuando se encuentra esta dependencia entre contenido cuántico y la intensidad del estímulo, se debe al reclutamiento de nuevos terminales sinápticos sobre la misma CCE, que se incrementa con la intensidad de los estímulos eléctricos. A lo largo de esta Tesis, todos los experimentos se realizaron en condiciones de mínima estimulación, es decir, estimulando a la intensidad mínima necesaria para obtener respuestas postsinápticas consistentes.

Para estimar el efecto de una determinada droga o toxina sobre el contenido cuántico de una sinapsis MOC-CCE, en primer lugar se estimó el contenido cuántico control, a partir de la aplicación de dos o tres protocolos de estimulación a 1 Hz. Habiendo asegurado la estabilidad de la sinapsis, se incubó

el tejido durante el tiempo necesario para alcanzar un recambio total de la solución en la cámara de registro, alrededor de 3 min. A partir de este momento, se aplicó el protocolo de estimulación a 1 Hz cada 2-5 min, manteniendo la mínima intensidad de estímulo eléctrico utilizada al comienzo del experimento, hasta que el efecto del compuesto alcanzara una meseta. El tiempo necesario para alcanzar dicho valor varía dependiendo del compuesto analizado. En particular, dihidropiridinas (DHPs), Iberiotoxina (IbTx), CGP, Ni^{2+} y SNX-482 alcanzan su máximo efecto luego de 5 min de incubación, mientras que ω -Agatoxina IVA (ω -Aga) lo hace luego de 10 min y ω -Conotoxina GVIA (ω -Cono), luego de 15 min. Para cada uno de estos compuestos, el contenido cuántico promedio de cada tratamiento fue estimado a partir del promedio de los últimos tres a cinco registros. En aquellos experimentos en los que se evaluó el contenido cuántico luego de incubar la preparación con EGTA-AM y diferentes toxinas, se esperó el tiempo necesario para que el quelante de Ca^{2+} se cargara eficientemente en los terminales MOC antes de manipular las CCEs (ver **Figura 20A**).

Estimación de las propiedades eléctricas y los parámetros cinéticos de las CCEs

La resistencia (R_m) y capacitancia (C_m) de la membrana de las CCEs fueron estimadas a partir del promedio de cinco pulsos despolarizantes de 5 mV, por 5 ms. En todos los casos, se parte de un $V_s = -70$ mV, valor un poco más hiperpolarizado que el V_m típico de una CCE, cercano a $V_m \sim -50$ mV (Dallos, 1985). Esto garantiza con alto grado de probabilidad que no haya corrientes voltaje dependientes activadas, haciendo la medición más confiable.

Las amplitudes de eIPSCs individuales y de las sIPSCs fueron medidas como la diferencia entre el pico de la respuesta y la línea de base antes del artefacto de estimulación. Las constantes de crecimiento y decaimiento de las corrientes ($\tau_{\text{crecimiento}}$ y $\tau_{\text{decaimiento}}$, respectivamente) fueron estimadas a partir del ajuste exponencial de las respuestas, realizado entre el 20-80% del pico para $\tau_{\text{crecimiento}}$, y el 10-90% entre el pico y el retorno a la línea de base para $\tau_{\text{decaimiento}}$. Para calcular estos parámetros se utilizaron únicamente eIPSCs en los que la respuesta fuera distinguible del artefacto de estimulación y que no presentaran superposición con eventos espontáneos que pudieran afectar la dinámica analizada. El ancho medio de las sIPSCs y las eIPSCs fue calculado como el ancho de la respuesta sináptica al 50% de su amplitud máxima. Por último, la carga de las corrientes postsinápticas (entendida como cantidad de corriente por unidad de tiempo) fue estimada a partir de la integral de los trazos de

corriente. Esto se aplicó tanto para protocolos utilizados para evocar respuestas únicas, como para aquellos en los que se emplearon trenes de estimulación.

Protocolos de estimulación de doble pulso y trenes de estimulación

Para experimentos de pulsos pareados, se estimularon las fibras eferentes MOC con protocolos de dos pulsos eléctricos, separados por intervalos inter-estímulo de 12.5, 25, 50 y 100 ms, lo que corresponde a frecuencias de estimulación de 80, 40, 20 y 10 Hz, respectivamente. Los pares de pulsos se repitieron entre cincuenta y cien veces por protocolo, dependiendo del objetivo del experimento y la necesidad de minimizar el daño a la CCE registrada. Los protocolos con trenes de estimulación de diez pulsos a frecuencias entre 10 Hz y 80 Hz fueron repetidos entre diez y treinta veces, mientras que aquellos en los que se hicieron trenes de cincuenta pulsos o de 10 segundos de duración, ya sea en configuración de fijación de voltaje o de corriente, cada protocolo consistió de una única repetición. En todos los casos, tanto para experimentos de doble pulso como para trenes de estímulos, cada protocolo con el número indicado de repeticiones, fue aplicado al menos tres veces sobre la misma CCE registrada. En experimentos de trenes de estimulación en los que, además, se realizó farmacología, los valores de control y tratamiento corresponden a distintas células. Esto se hizo con el fin de maximizar el número de experimentos exitosos, ya que, a diferencia de los protocolos de estimulación a 1 Hz, estos protocolos infligen más daño a la preparación y a las CCEs.

En aquellos experimentos de pulsos pareados y trenes de diez pulsos en los que el objetivo era estimar parámetros de plasticidad de corto término, se computó la respuesta sináptica promedio (S) como el promedio de amplitud de eIPSCs luego de cada pulso, para todas las repeticiones del protocolo, incluyendo aquellos trazos en los que no se observó respuesta postsináptica (fallas de liberación del neurotransmisor). En cambio, la amplitud de eIPSCs (A) fue obtenida al promediar, a lo largo de las repeticiones del protocolo, únicamente el valor de corriente posterior a aquellos pulsos que resultaron en respuestas exitosas. A diferencia de la medición de corriente en eventos únicos, al utilizar protocolos de pulsos pareados o trenes de estimulación con frecuencias mayores a 20 Hz, los estímulos suelen ocurrir antes del pico de cada respuesta. Por tal motivo el criterio de medición de corriente fue buscar el máximo de corriente luego de cada artefacto de estimulación, y medir la diferencia de corriente entre

dicho punto y el último punto antes del artefacto correspondiente al mismo estímulo. Por último, la probabilidad de liberación de la sinapsis MOC-CCE (P) fue también calculada para cada pulso, como la relación entre el número de eIPSCs exitosos luego de cada pulso y el número de repeticiones del protocolo. A continuación, se calcularon los índices de facilitación (IF) para S, P y A, como se detalla en el Capítulo I de la sección Resultados.

Estimación de los parámetros del conjunto de vesículas listas para ser liberadas (RRP)

El tamaño del RRP y la tasa de reposición de vesículas del mismo fueron estimados según lo establecido por Schneggenburger et al., 1999, utilizando trenes de alta frecuencia para agotar las vesículas del RRP hasta alcanzar un estado estacionario en la liberación. Este método asume que la reposición de vesículas es constante a lo largo del tren de estímulos, pero no requiere que la probabilidad de liberación individual de las vesículas sea constante a lo largo del mismo, ni asume que todas las vesículas tengan la misma probabilidad inicial (Schneggenburger et al., 1999; Neher, 2015). Se utilizaron protocolos con trenes de cincuenta pulsos a una frecuencia de 100 Hz, que se repitieron diez veces en intervalos de 15 s. Se graficó la amplitud acumulada promedio correspondiente a cada célula, en función del número de estímulos, y se hizo un ajuste lineal en la región estacionaria. La amplitud acumulada de las eIPSCs para el *iésimo* pulso fue calculada de la siguiente manera:

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

$\bar{A}(x)$ es la amplitud media acumulada de la eIPSC, en respuesta al pulso x . Para garantizar que la estimación del estado estacionario en el gráfico de amplitud acumulada fuera correcto, la regresión lineal se realizó sobre los últimos veinte pulsos. En esta región, todos los gráficos de células individuales tienen un comportamiento lineal. El valor de amplitud correspondiente a la intersección de la recta que arroja el ajuste con el eje y indica el tamaño, en amplitud, del RRP. Si se divide este número por la amplitud promedio de un cuanto (es decir, la amplitud promedio de las sIPSCs), se obtiene el número de vesículas que forman parte del RRP al comienzo del tren de estímulos. Además, dividiendo la pendiente del ajuste lineal por la amplitud promedio de un cuanto y luego multiplicando ese valor por la frecuencia de estimulación, se obtiene la tasa de reposición de vesículas, expresada como números de vesículas/s.

Drogas, toxinas y reactivos

Los reactivos utilizados fueron comprados a Sigma-Aldrich (Estados Unidos). El CGP 36215 (CGP) fue obtenido de Tocris Bioscience (Reino Unido), en tanto que la Iberiotoxina (IbTx) fue obtenida de Tocris Bioscience (Reino Unido) o Sigma-Aldrich. El EGTA-AM se obtuvo de Invitrogen (Estados Unidos). Las dihidropiridinas (DHPs) utilizadas en este trabajo, Nifedipina (Nife) y (\pm)BayK-8644 (BayK), así como las toxinas ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx), SNX 482 (SNX) y ω -Agatoxina IVA (ω -Aga), fueron compradas a Alomone Labs (Israel). Para su uso en experimentos, todas las drogas y toxinas utilizadas fueron descongeladas y diluidas en la solución extracelular utilizada en los experimentos. Las soluciones madre de DHPs y EGTA-AM fueron preparadas en dimetilsulfóxido (concentración final durante el experimento, $\leq 0.1\%$). Las soluciones madre de toxinas peptídicas, en cambio, fueron preparadas en agua bidestilada, y co-aplicadas a la preparación a través del sistema de perfusión junto con albúmina de suero bovino (concentración final durante el experimento, $\leq 0.01\%$).

Estadística

Antes de llevar a cabo análisis estadístico alguno se determinó si los datos seguían o no una distribución normal. Para ello se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, a partir de lo cual se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas, según correspondiese. Para analizar grupos de datos correspondientes a dos condiciones (control y tratamiento), se utilizaron pruebas de t de dos colas, pareadas o no pareadas, en caso de que los datos siguieran una distribución normal. Si los datos no ajustaron a una distribución normal, en ese caso el análisis se hizo a través de pruebas de rangos de Wilcoxon, Mann-Whitney o Kolmogorov-Smirnov. En aquellos casos en los que se analizaron más de dos condiciones (control, tratamiento 1 y tratamiento 2), utilizamos el ANOVA de un factor o el ANOVA de medidas repetidas para datos con distribución normal, ambos seguidos de comparaciones múltiples utilizando el método de Tukey. Aquellos datos que no ajustaron a una distribución normal fueron, en cambio, analizados mediante las pruebas de Kruskal-Wallis o Friedman, seguidas de comparaciones múltiples a través del método de Dunn o de Conover, respectivamente. Para todas estas pruebas, el valor de p informado corresponde a las comparaciones múltiples en aquellos casos en los que se

encontraron diferencias significativas, mientras que de lo contrario se informa el valor de p de la prueba únicamente.

Sólo en dos ocasiones fue necesario recurrir a pruebas estadísticas diferentes de las mencionadas, a saber, la prueba de Chi-cuadrado y el ANOVA de dos factores con medidas repetidas. La primera se utilizó para averiguar si hubo diferencias significativas en el porcentaje de inervación de las CCEs entre dos edades distintas, a partir de una tabla de contingencia (Capítulo I). La segunda se empleó particularmente para entender el efecto de un determinado protocolo de estimulación a lo largo del tiempo, entre dos genotipos de ratón (Capítulo II).

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando rutinas implementadas en R v3.4.1 (R Development Core Team, 2008), a través del programa RStudio v1.0.153 (RStudio Inc, Estados Unidos), con excepción de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Chi-cuadrado y ANOVA de dos factores con medidas repetidas, llevadas a cabo en GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Estados Unidos). Las pruebas estadísticas fueron consideradas significativas cuando se obtuvo $p < 0.05$. Todos los datos se expresan como media \pm SEM, y en todos los casos “n” indica el número de células evaluadas. Se utilizaron hasta tres células por animal, excepto en experimentos de farmacología en las que se utilizó únicamente una por ratón. En todos los experimentos, los resultados presentados corresponden siempre a, por lo menos, tres animales distintos.

RESULTADOS

Capítulo I - Propiedades funcionales de la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las células ciliadas externas durante el desarrollo postnatal

I. Introducción

En los roedores altriciales, la sinapsis entre las fibras eferentes del sistema MOC y las células ciliadas se encuentra sometida a cambios durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal, previo al comienzo de la audición. Dichos cambios se evidencian, en primer lugar, en la evolución temporal del patrón de inervación sobre las células ciliadas (Simmons, 2002; Bulankina y Moser, 2012). Desde el nacimiento (P0), las CCI son contactadas por fibras MOC, las cuales ejercen su rol inhibitorio sobre estas células hasta el comienzo de la audición, alrededor de P12-14, cuando las fibras eferentes se retraen de las CCI (Liberman et al., 1990; Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). En cambio, la sinapsis entre las fibras MOC y las CCE comienza a establecerse recién alrededor de P6-8, manteniéndose durante toda la vida adulta de estos roedores (Simmons, 2002). El inicio de esta inervación a las CCE coincide con un aumento en la expresión de canales de K^+ SK2 en la región basolateral de la membrana de estas células (Dulon et al., 1998; Roux et al., 2011).

Más allá de los cambios en la inervación del órgano de Corti, tanto las CCI como las CCE presentan cambios morfológicos y funcionales a lo largo del período de desarrollo postnatal. En particular, las CCE ven modificado su funcionamiento durante las dos primeras semanas de vida, cuando pueden disparar potenciales de acción, propiedad que se pierde en animales adultos (Marcotti y Kros, 1999). Esto estaría vinculado a cambios en las conductancias iónicas durante el desarrollo, especialmente de K^+ (Marcotti y Kros, 1999; Marcotti et al., 1999). Resulta particularmente relevante el remplazo de una corriente de K^+ dependiente de voltaje que presenta inactivación y se encuentra en las CCE desde P0, por otra, también de K^+ , aparentemente mediada por canales que portan la subunidad KCNQ4 (Marcotti y Kros, 1999). Esta corriente, cuya tasa de inactivación es considerablemente más lenta, se evidencia desde P8 y podría contribuir al mantenimiento del potencial de la membrana en reposo, y a la recirculación del K^+ que ingresa por el complejo mecanotransductor (Marcotti y Kros, 1999). En paralelo con los cambios en la conductancia, se han reportado cambios en la forma de las CCE y un incremento de su tamaño (Marcotti y Kros, 1999; Oliver y Fakler, 1999). También la funcionalidad de la mecanotransducción en las CCE se ve modificada durante el desarrollo postnatal. La adquisición de este mecanismo sigue un patrón de desarrollo espacio-temporal, ya que la región basal de la cóclea presenta corrientes mediadas por el mecanotransductor desde P0, mientras

que en la región apical comienzan a observarse alrededor de P2, alcanzándose para P8-9 un máximo de actividad en ambas regiones (Waguespack et al., 2007; Lelli et al., 2009). Estos cambios, además, ocurren coincidentemente con modificaciones morfológicas en los haces de estereocilias. En primer lugar, su longitud varía con el desarrollo postnatal, tanto en la base como en la región apical de la cóclea (Lelli et al., 2009). En segundo lugar, además de modificaciones en la forma del haz entre P0 y P9, se ha reportado un proceso de podado tanto a nivel de las estereocilias como de los filamentos que las conectan entre sí, que se asocia a variaciones en la expresión de las distintas isoformas de miosina, una proteína de la maquinaria motora (Waguespack et al., 2007). Por último, la expresión de prestina, la proteína motora que expresan las CCEs y que les confiere su capacidad electromóvil, también sufre variaciones con el desarrollo postnatal, alcanzando una máxima expresión y funcionalidad alrededor del comienzo de la audición, es decir P12-14 (Oliver y Fakler, 1999; Abe et al., 2007; Hang et al., 2016). Además, cabe destacar que la expresión de prestina sigue también un gradiente espacial, ya que se han reportado diferencias entre las regiones basal y apical (Oliver y Fakler, 1999; Hang et al., 2016).

En lo que respecta a las propiedades sinápticas entre las fibras MOC y las células ciliadas, nuestro laboratorio ha demostrado que la sinapsis transitoria MOC-CCI sufre importantes cambios funcionales a lo largo del desarrollo postnatal. En primer lugar, a través de una disección farmacológica exhaustiva, se ha determinado que existen cambios en los tipos de CCDVs que sostienen la liberación de ACh entre P4, estadio en que la sinapsis transitoria alcanza una funcionalidad total (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011), y P9-11, estadio previo a la retracción definitiva de las fibras MOC de estas células (Liberman et al., 1990; Simmons, 2002). Al comienzo del desarrollo postnatal, en el terminal presináptico MOC que contacta a las CCIs hay expresión funcional de los CCDVs de tipo P/Q y R, mientras que para P9-11 los CCDVs de tipo P/Q siguen presentes y los de tipo R son reemplazados por CCDVs de tipo N (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019). Estos cambios en la identidad molecular de los CCDVs que sostienen la liberación de ACh se ven acompañados por diferencias significativas en el tamaño del RRP en el terminal presináptico, lo que a la vez se vincula fuertemente con las propiedades de la neurotransmisión en la sinapsis MOC-CCI. De hecho, se ha reportado un aumento gradual del contenido cuántico entre P4 y P9-11, y cambios en los patrones de plasticidad de corto término (Kearney et al., 2019). Además, estos trabajos han determinado que en los terminales

presinápticos MOC se expresan canales de K^+ de tipo BK, dependientes de voltaje y de Ca^{2+} (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019). Estos canales se encuentran funcionalmente acoplados a los CCDVs de tipo L y permiten regular negativamente la liberación de ACh (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Más aún, se obtuvieron evidencias de que el grado de acople entre los canales L y BK cambiaría entre los primeros estadios del desarrollo postnatal y P9-11 (Kearney et al., 2019).

En conjunto, las evidencias de los cambios morfológicos y funcionales en el patrón de inervación del órgano de Corti y en las propiedades intrínsecas de las CCEs, así como en las propiedades moleculares y funcionales de la sinapsis transitoria MOC-CCI, nos llevaron a plantear la hipótesis de que el terminal presináptico de las fibras MOC que contactan a las CCEs estaría sujeto a modificaciones significativas durante el desarrollo postnatal. Por este motivo, esta parte de la Tesis se concentró en investigar los cambios moleculares y funcionales que podrían tener lugar en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal. Para ello, se caracterizaron las propiedades biofísicas y funcionales de la transmisión sináptica entre las fibras MOC y las CCEs durante dos estadios del desarrollo postnatal: P11-13, alrededor del comienzo de la audición, y P20-22, momento en que el sistema auditivo ya se considera funcionalmente maduro (Ehret, 1976). En cada uno de los estadios en estudio se analizaron, además, los tipos de canales iónicos que sostienen y/o modulan la liberación de ACh. En este sentido, se tomó como punto de partida el conocimiento previo generado en el laboratorio: por un lado, los estudios que muestran cambios funcionales en la sinapsis MOC-CCI durante el desarrollo postnatal (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019) y por otro, aquellos trabajos que demostraron que la sinapsis MOC-CCE de ratones P11-13 presenta patrones de facilitación de corto término (Ballesteros et al., 2011) y modulación a través de receptores de $GABA_B$ (Wedemeyer et al., 2013).

I. Resultados

Caracterización de la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal.

En primer lugar, se hizo una caracterización de las CCEs y las corrientes sinápticas MOC-CCE durante los dos estadios de desarrollo estudiados: al comienzo de la audición, P11-13, y cuando el sistema auditivo ya ha madurado, P20-22 (Ehret, 1976). En condiciones fisiológicas las CCEs de conejillos de India presentan un potencial de membrana (V_m) de alrededor de -50 mV (Dallos, 1985). En nuestras condiciones de trabajo, el potencial de membrana de los ratones fue cercano a los -60 mV para ambos estadios (**Tabla II**; no hubo diferencias significativas entre los mismos, $p = 0.63$). La liberación de ACh desde de las fibras MOC determina la entrada de Ca^{2+} a las CCEs a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y la consecuente activación de los canales SK2, de modo que la respuesta está mayoritariamente mediada por K^+ (ErosteGUI et al., 1994a; Blanchet et al., 1996; Evans, 1996; Oliver et al., 2000), cuyo E_{rev} ($E_K \sim -82$ mV) es más negativo que el V_m de las CCEs. Por ello, la respuesta sináptica producto de la actividad eferente es inhibitoria, ya que implica la salida de K^+ a través de los SK2, lo que hiperpolariza a las CCEs. De manera similar, en las condiciones de trabajo empleadas ($V_s = -40$ mV y $E_K \sim -82$ mV), al estimular las fibras MOC se obtuvieron corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (eIPSCs, por sus siglas en inglés, *evoked inhibitory postsynaptic currents*) que se muestran en la **Figura 11A**, donde predomina la fase saliente mediada por K^+ (ver **Materiales y Métodos**).

Para estudiar las propiedades de la sinapsis MOC-CCE se emplearon protocolos de estimulación eléctrica de las fibras MOC, a una frecuencia de 1 Hz. En primer lugar, se encontró que el número de CCEs funcionalmente invadidas por las fibras eferentes aumenta durante el desarrollo postnatal. A P11-13, se encontraron respuestas postsinápticas en 131 células, de 211 analizadas, mientras que a P20-22,

Tabla II | Propiedades de la membrana de las CCEs del ratón durante el desarrollo postnatal.

C_m y R_m fueron estimados a partir de protocolos implementados a $V_s = -70$ mV. Prueba de t no pareada o prueba de rangos de Mann-Whitney; *** $p < 0.001$.

Estadio del desarrollo:	P11-13 (n = 54)	P20-22 (n = 31)
V_m (mV)	-63.43 ± 1.02	-62.98 ± 0.88
C_m (pF)	11.54 ± 0.22	15.87 ± 0.43***
R_m (M Ω)	123.56 ± 3.18	40.50 ± 2.43***

respondieron 62 de 80 células (**Figura 11B**; prueba de Chi-cuadrada, $X^2 = 6.171$, $df = 1$, $z = 2.484$, $p = 0.007$). Además, se registró un aumento significativo en el contenido cuántico (m) de la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal (**Figura 11C**; P11-13: $m = 0.24 \pm 0.02$, P20-22: $m = 0.37 \pm 0.03$, $p = 0.0004$). Los valores de contenido cuántico registrados se mantuvieron estables durante por lo menos 45 min a P11-13, y por al menos 30 min a P20-22 (**Figura 11D**; $p = 0.62$ y $p = 0.28$ para P11-13 y P20-22, respectivamente). Este análisis resulta de particular importancia considerando que algunos de los experimentos que se desarrollarán a continuación, implican evaluar el contenido cuántico en una sinapsis MOC-CCE antes y después de incubar la preparación del órgano de Corti con diferentes drogas o toxinas a fin de evaluar su efecto sobre este parámetro. Por esta razón, es necesario que la

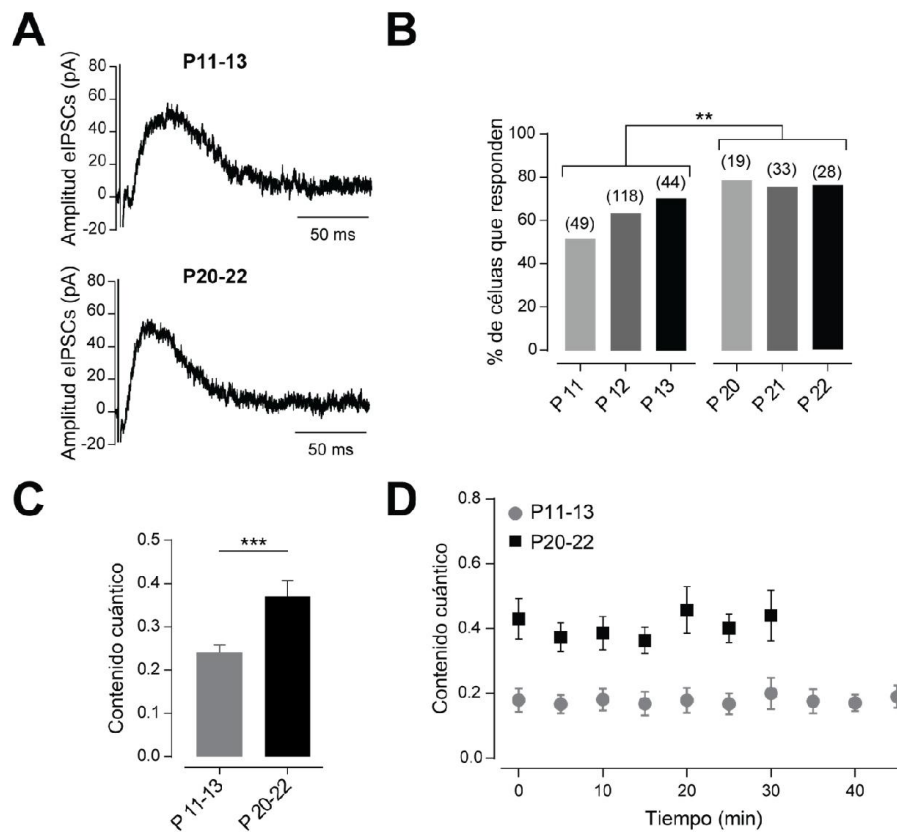


Figura 11 | Características de la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal de ratón.

A, Trazos representativos de eIPSCs en respuesta a la estimulación de las fibras MOC, a una frecuencia de 1 Hz, correspondientes a ambos estadios estudiados. $V_s = -40$ mV. **B**, Porcentaje de CCEs que responden a la estimulación eléctrica, en función de la edad postnatal. Los números sobre las barras indican el total de células analizadas. Prueba de Chi-cuadrado entre P11-13 y P20-22; $**p < 0.01$. **C**, Contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE en función de la edad postnatal (P11-13: $n = 110$; P20-22: $n = 62$). Prueba de rangos de Mann-Whitney; $***p < 0.001$. **D**, Evolución temporal del contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE en ambos estadios del desarrollo estudiados (P11-13: $n = 6$; P20-22: $n = 5$). ANOVA de medidas repetidas para cada estadio; no se encontraron diferencias significativas.

transmisión sináptica no sufra variaciones producto de la manipulación experimental durante el tiempo de registro necesario en cada CCE.

Además de los cambios en la eficacia de la liberación de ACh, durante el desarrollo se registraron cambios significativos tanto en la capacitancia (C_m) como en la resistencia (R_m) de la membrana de las CCEs (**Tabla II**; $p = 0.00002$ y $p = 0.0002$, respectivamente), en consistencia con aquellos estudios que indican cambios en las conductancias y el tamaño de estas células en función de la edad postnatal (Marcotti y Kros, 1999; Marcotti et al., 1999; Oliver y Fakler, 1999). Los cambios hasta aquí observados no alteraron las respuestas de las CCEs frente a la liberación espontánea de ACh desde las fibras MOC. La amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs, por sus siglas en inglés, *spontaneous inhibitory postsynaptic currents*) no fue significativamente distinta entre ambos estadios del desarrollo estudiados (**Tabla III**; $p = 0.61$; prueba de t no pareada), lo que indica que el tamaño del cuanto se mantiene constante. Tampoco se encontraron cambios significativos en la dinámica temporal de las sIPSCs, analizada mediante tres parámetros distintos: el tiempo característico de crecimiento y decaimiento ($\tau_{\text{crecimiento}}$ y $\tau_{\text{decaimiento}}$, respectivamente), y el ancho medio de la respuesta. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de dichos parámetros entre ambos estadios del

Tabla III | Características de las corrientes sinápticas en las CCEs del ratón, durante el desarrollo postnatal.

$V_s = -40$ mV. Prueba de t no pareada o prueba de rangos de Mann-Whitney; no se encontraron diferencias significativas entre los dos estadios para ninguno de los parámetros analizados.

Estadio del desarrollo:		P11-13	P20-22
sIPSCs (P11-13, n = 6) (P20-22, n = 5)	Amplitud (pA)	33.98 ± 3.07	31.97 ± 3.52
	$\tau_{\text{crecimiento}}$ (ms) (20-80%)	18.78 ± 1.85	16.13 ± 2.44
	$\tau_{\text{decaimiento}}$ (ms) (10-90%)	47.70 ± 9.30	32.31 ± 4.03
	Ancho medio (ms)	32.93 ± 5.58	30.08 ± 3.78
	Q (pC)	2.49 ± 0.42	2.10 ± 0.23
eIPSCs (P11-13, n = 32) (P20-22, n = 17)	Amplitud (pA)	30.20 ± 1.53	34.93 ± 2.08
	$\tau_{\text{crecimiento}}$ (ms) (20-80%)	11.37 ± 0.88	12.14 ± 0.87
	$\tau_{\text{decaimiento}}$ (ms) (10-90%)	44.47 ± 2.31	42.38 ± 2.14
	Ancho medio (ms)	44.39 ± 1.78	41.68 ± 1.63
	Q (pC)	1.83 ± 0.11	1.92 ± 0.13

desarrollo (**Tabla III**; $p = 0.18$, $p = 0.21$ y $p = 0.697$, respectivamente). La transferencia de carga (Q) producida por cada evento sináptico espontáneo, medida como el área correspondiente a los mismos, tampoco arrojó diferencias significativas entre ambos estadios (**Tabla III**; $p = 0.45$). A continuación se evaluaron también los parámetros correspondientes a las eIPSCs en ambos estadios y, nuevamente, no se encontraron cambios significativos en los $\tau_{\text{crecimiento}}$ y $\tau_{\text{decaimiento}}$, (**Tabla III**; $p = 0.54$ y $p = 0.67$), como tampoco en el ancho medio ni en Q (**Tabla III**; $p = 0.35$ y $p = 0.69$, respectivamente). Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren que los cambios en la fuerza sináptica durante el desarrollo postnatal podrían explicarse por cambios en la probabilidad de liberación de las vesículas en el terminal presináptico y no por una mayor cantidad de neurotransmisor en cada vesícula sináptica, ni por modificaciones en las propiedades de la postsinapsis.

Teniendo en cuenta las evidencias que vinculan el tamaño del conjunto de vesículas listas para ser liberadas (RRP, por sus siglas en inglés, *readily releasable pool*) con la eficiencia de la transmisión sináptica (Jackman y Regehr, 2017), se investigó este parámetro en la sinapsis MOC-CCE. Para ello se calculó la amplitud acumulada de las eIPSCs en respuesta a trenes de estimulación de cincuenta pulsos a una frecuencia de 100 Hz. Al graficar para cada célula la amplitud acumulada en función del número de pulsos en el tren (**Figura 12A**), se observó que a partir de cierto número de estímulos la respuesta se comporta en forma lineal, lo que implica que el RRP fue vaciado y que las respuestas observadas se deben únicamente al reciclado vesicular (ver **Materiales y Métodos**; Schneggenburger et al., 1999; Neher, 2015). En estas condiciones, si se hace una regresión lineal, el valor de amplitud que se obtiene de la intersección de la recta con el eje de ordenadas corresponde a una estimación del valor de la amplitud del RRP. Al dividir este valor por la amplitud promedio de un cuanto (**Tabla III**), se obtiene el número de vesículas que componen el RRP. Siguiendo este razonamiento, se evaluó el tamaño del RRP en la sinapsis MOC-CCE de ratones a P11-13 y se obtuvo un valor de alrededor de dos vesículas (**Figura 12**; RRP: 1.96 ± 0.43 vesículas). A partir del mismo protocolo se evaluó la tasa de reposición de vesículas, estimada a partir de la pendiente de la recta obtenida en la regresión lineal (ver **Materiales y Métodos**; tasa de reposición: 7.83 ± 0.76 vesículas/s). Los resultados obtenidos indican que, en este estadio del desarrollo postnatal, el RRP de la sinapsis MOC-CCE es pequeño en comparación con lo observado en algunas sinapsis del SNC y la periferia (Schneggenburger et al., 1999; Saviane y Silver, 2006; Ruiz et al.,

2011), pero comparable con lo descrito para otras sinapsis (Hanse y Gustafsson, 2001; Trigo et al., 2012), incluida la sinapsis transitoria MOC-CCI (Kearney et al., 2019). Si bien hubiese sido ideal estudiar estos parámetros en la sinapsis MOC-CCE de ratones a P20-22 de manera de compararlos con lo observado al comienzo de la audición, no fue posible obtener mediciones confiables debido a la inestabilidad de la preparación frente a estímulos de alta frecuencia a esta edad.

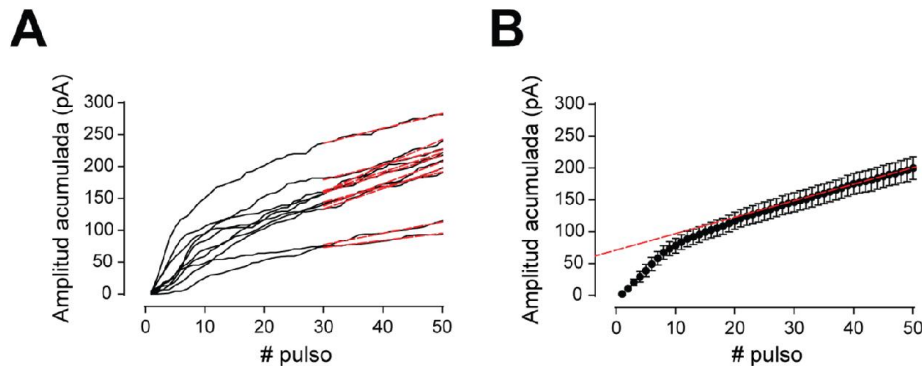


Figura 12 | Estimación del tamaño del RRP en la sinapsis MOC-CCE alrededor del comienzo de la audición.

A, Gráfico de amplitud acumulada en función del número de pulsos para cada sinapsis MOC-CCE individual. Para cada CCE, se observa en rojo el ajuste lineal de los últimos veinte pulsos. **B**, Gráfico de amplitud acumulada promedio en función del número de pulsos en el tren de estímulos para todas las CCEs estudiadas ($n = 10$). En rojo se observa la recta resultante promedio de los ajustes lineales individuales en **A**. El valor de amplitud correspondiente a la intersección de la recta con el eje y corresponde a la amplitud del RRP. El valor obtenido fue de $66.68 \text{ pA} \pm 14.61 \text{ pA}$. Al dividir este valor por la amplitud de un cuanto (**Tabla III**; $33.98 \text{ pA} \pm 3.07 \text{ pA}$), se obtiene el número de vesículas que forman parte del RRP.

Considerando las evidencias que indican que aquellas sinapsis con una baja probabilidad de liberación tienden a facilitar frente a la estimulación eléctrica de alta frecuencia (Debanne et al., 1996; Murthy et al., 1997; Jackman y Regehr, 2017) y teniendo en cuenta que se encontraron cambios en la fuerza sináptica en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal, resulta pertinente preguntarse si esto impacta sobre la plasticidad de corto término en dicha sinapsis. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron protocolos de estimulación de pulsos pareados aplicados a distintas frecuencias (**Figura 13A**), y se midieron las eIPSCs promedio resultantes. Se definió el índice de facilitación de la respuesta promedio (IF_s) como la fracción S_2/S_1 , donde S es la respuesta postsináptica promedio de la CCE al primero o al segundo pulso. Si obtenemos un $IF_s > 1$, es decir que frente al segundo pulso hay, en promedio, una mayor corriente postsináptica en comparación al primer pulso, se dice que hay facilitación. En cambio si $IF_s < 1$, se habla de depresión (Del Castillo y Katz, 1954b; Mallart y Martin,

1967; Goutman et al., 2005; Ballesteros et al., 2011; Kearney et al., 2019). Tal como había sido previamente reportado por nuestro laboratorio (Ballesteros et al., 2011), en P11-13 la sinapsis MOC-CCE facilita cuando las fibras MOC son estimuladas eléctricamente a frecuencias de 40 y 80 Hz, mientras que a frecuencias más bajas, el IF_S no difiere significativamente de 1 (**Figura 13B, Tabla IV**; IF_S : 10 Hz, $p = 0.99$; 20 Hz, $p = 0.99$; 40 Hz, $p = 0.0313$; 80 Hz, $p = 0.0065$). En cambio en animales del estadio correspondiente a P20-22, para todo el rango de frecuencias analizado el IF_S obtenido fue siempre similar a 1 (**Figura 13B, Tabla IV**; IF_S : 10 Hz, $p = 0.31$; 20 Hz, $p = 0.06$; 40 Hz, $p = 0.31$; 80 Hz, $p = 0.73$).

En la mayoría de las sinapsis estudiadas, las evidencias apuntan a fenómenos presinápticos como causantes de la facilitación. Algunos de los mecanismos más comúnmente aceptados son la acumulación de Ca^{2+} residual en el terminal presináptico y la saturación de los *buffers* intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación repetitiva de la presinapsis, que causan un aumento en el número de vesículas sinápticas liberadas ante la llegada de sucesivos potenciales de acción (Jackman y Regehr,

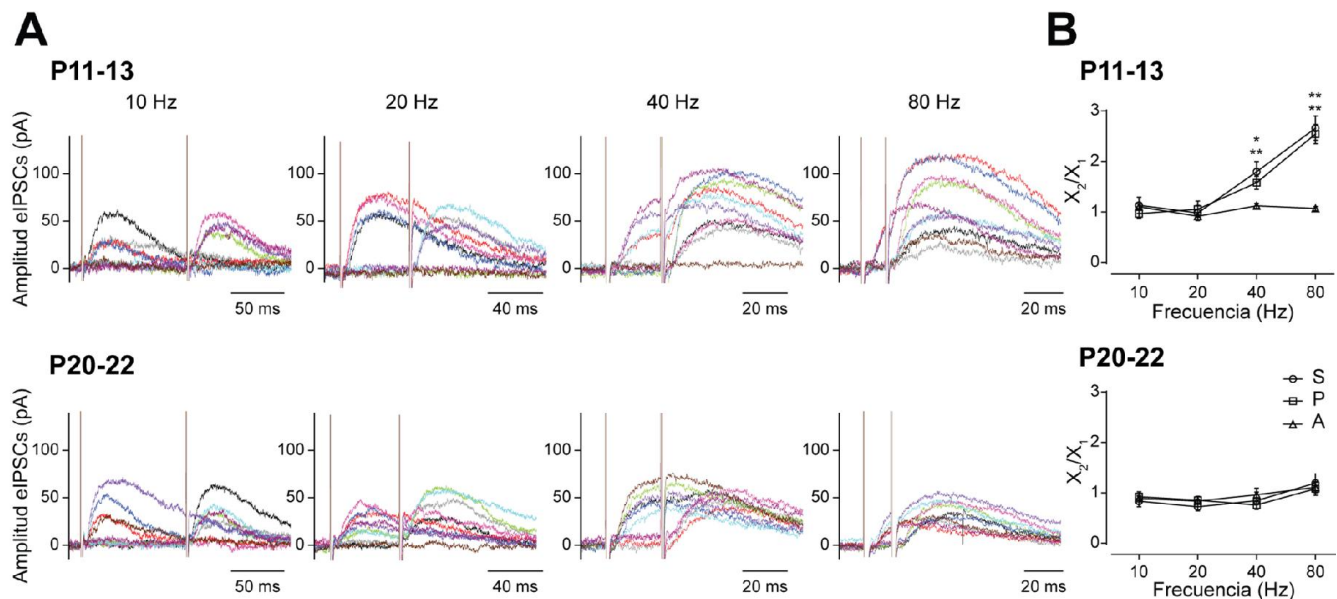


Figura 13 | Plasticidad de corto término de la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal.

A, Trazos representativos de corriente en respuesta a protocolos de estimulación de pulsos pareados. Se muestran 10 trazos individuales para cada frecuencia de estimulación, a cada edad analizada. Los trazos están representados por distintos colores para facilitar su seguimiento luego de cada pulso. $V_s = -40$ mV. **B**, Estimación del IF_x , definido como la fracción X_2/X_1 , para la respuesta postsináptica promedio (S; IF_S), la probabilidad de éxito en la liberación del neurotransmisor (P; IF_P) y la amplitud de eventos postsinápticos exitosos (A; IF_A), a las cuatro frecuencias de estimulación empleadas. Como puede observarse, en P11-13 se encontró que IF_S e IF_P varían conjuntamente en función de la frecuencia, y que son significativamente mayores a 1 para 40 y 80 Hz (P11-13: $n = 6-7$; P20-22: $n = 5-6$). Prueba de t pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2017). Sin embargo, teniendo en cuenta que la sinapsis MOC-CCE está mediada por el acople funcional entre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y el canal SK2 (Oliver et al., 2000), y que se han postulado mecanismos de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} en la cisterna sinaptoplásmica que podrían contribuir a la respuesta postsináptica inhibitoria (Lioudyno et al., 2004; Fuchs, 2014; Fuchs et al., 2014), cabe la posibilidad de que en esta sinapsis los fenómenos presinápticos sean insuficientes para explicar la facilitación observada en P11-13. Teniendo en cuenta que el IF_S definido anteriormente surge de promediar todas las amplitudes obtenidas luego de cada pulso, hayan sido respuestas exitosas o no, se reanalizaron los IF pero tomando en cuenta dos nuevos parámetros: (1) la amplitud promedio de las eIPSCs, es decir, el promedio de las amplitudes obtenidas en respuesta a aquellos pulsos eléctricos que lograron evocar una respuesta postsináptica de manera exitosa ($IF_A = A_2/A_1$), y (2) la probabilidad de éxito en la liberación de vesículas sinápticas ($IF_P = P_2/P_1$). Esta estrategia permite identificar el origen de la facilitación de corto término. Si el $IF_S > 1$ observado para 40 y 80 Hz en P11-13 se debiera únicamente a un efecto presináptico, esperaríamos observar que el IF_P se comportara de la misma manera para dichas frecuencias a esa edad y que el IF_A no fuera significativamente distinto de 1. Si, en cambio, hubiera algún componente postsináptico involucrado en el patrón de respuesta descrito, esperaríamos que $IF_A > 1$, independientemente del valor que obtengamos para IF_P , ya que podría haber una combinación de fenómenos pre y postsinápticos. El valor de IF_A no fue significativamente distinto de 1 para ninguna de las frecuencias analizadas tanto en animales de P11-13 (**Figura 13B, Tabla IV**; IF_A : 10 Hz, $p = 0.64$; 20 Hz, $p = 0.92$; 40 Hz, $p = 0.58$; 80 Hz, $p = 0.20$) como de P20-22 (**Figura 13B, Tabla IV**; IF_A : 10 Hz, $p = 0.06$; 20 Hz, $p = 0.13$; 40 Hz, $p = 0.45$; 80 Hz, $p = 0.31$). En cambio, la variación de IF_P en función de la frecuencia de estimulación fue similar a la observada en IF_S para ambas edades, hallándose valores de $IF_P > 1$ para 40 Hz y 80 Hz en P11-13 únicamente (**Figura 13B, Tabla IV**; IF_P : 10 Hz, $p = 0.81$; 20 Hz, $p = 0.93$; 40 Hz, $p = 0.0156$; 80 Hz, $p = 0.0085$), mientras que en P20-22 no fue significativamente distinto de 1 para ninguna de las frecuencias analizadas (**Figura 13B, Tabla IV**; IF_P : 10 Hz, $p = 0.56$; 20 Hz, $p = 0.22$; 40 Hz, $p = 0.18$; 80 Hz, $p = 0.83$). En conjunto, estos resultados permiten concluir, por un lado, que los cambios en la eficacia de liberación de ACh observados en el desarrollo postnatal determinan cambios en la plasticidad de corto término de la sinapsis MOC-CCE, y por otro, que a P11-13, la facilitación observada para la sinapsis MOC-CCE a 40 y 80 Hz puede explicarse por factores presinápticos.

Tabla IV | Cálculo del $IF_x = X_2/X_1$ para S, P y A en la sinapsis MOC-CCE, durante el desarrollo postnatal. $V_S = -40$ mV. Prueba de t pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Estadio de desarrollo:	P11-13 (n = 6-7)			P20-22 (n = 5-6)		
	$IF_S = S_2/S_1$	$IF_P = P_2/P_1$	$IF_A = A_2/A_1$	$IF_S = S_2/S_1$	$IF_P = P_2/P_1$	$IF_A = A_2/A_1$
10 Hz	1.13 ± 0.16	0.97 ± 0.09	1.11 ± 0.06	0.83 ± 0.11	0.92 ± 0.10	0.89 ± 0.04
20 Hz	0.98 ± 0.15	1.06 ± 0.16	0.92 ± 0.02	0.72 ± 0.08	0.85 ± 0.08	0.84 ± 0.04
40 Hz	1.80 ± 0.20*	1.58 ± 0.13*	1.12 ± 0.05	0.84 ± 0.17	0.76 ± 0.08	0.96 ± 0.13
80 Hz	2.66 ± 0.24**	2.54 ± 0.19**	1.07 ± 0.04	1.20 ± 0.18	1.08 ± 0.13	1.11 ± 0.11

Canales de Ca^{2+} que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal

En los mamíferos, la transmisión sináptica rápida se encuentra normalmente mediada por CCDVs de tipo P/Q, N y R (Catterall, 2011), y se ha demostrado que la composición específica de los canales involucrados en este proceso puede variar durante el desarrollo postnatal, tanto en el SNC (Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000; Momiyama, 2003; Fedchyshyn y Wang, 2005) como en la placa neuromuscular (Rosato Siri y Uchitel, 1999). Más aún, trabajos recientes de nuestro laboratorio demostraron que la composición de CCDVs en la sinapsis transitoria MOC-CCI también está regulada durante el desarrollo postnatal: mientras que a P4-7 la liberación de ACh se encuentra sostenida por CCDVs de tipo P/Q y R, a P9-11, el último estadio previo a la retracción de las fibras MOC de las CCIs, la liberación se encuentra mediada por canales de tipo P/Q y N únicamente (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió investigar si los CCDVs involucrados en la liberación de ACh variaba en la sinapsis MOC-CCE, entre P11-13 y P20-22. Para explorar esta posibilidad, se evaluó el contenido cuántico (m) en respuesta a la incubación de la preparación del órgano de Corti con antagonistas específicos de los CCDVs de tipo P/Q, N y R. Para bloquear los canales de tipo P/Q y N, se utilizó ω -Agatoxina IVA (ω -Aga, 200 nM) y ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx, 500 nM), respectivamente (Mintz y Bean, 1993; Olivera et al., 1994). En cambio, para bloquear la actividad de los CCDVs de tipo R, se utilizaron alternativamente SNX-482 (SNX, 500 nM) y Ni^{2+} (100 μ M) (Zamponi et al., 1996; Newcomb

et al., 1998; Bourinet et al., 2001). En P11-13, se encontró un efecto significativo de ω -Aga, SNX y Ni^{2+} sobre la transmisión sináptica (**Figura 14A; i** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.383 \pm 0.057$, $m_{\text{Aga}} = 0.102 \pm 0.021$, $p = 0.002$; **iii** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.158 \pm 0.018$, $m_{\text{Ni}} = 0.007 \pm 0.014$, $p = 0.00003$; **iv** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.371 \pm 0.084$, $m_{\text{SNX}} = 0.162 \pm 0.048$, $p = 0.007$), pero no de ω -CgTx (**Figura 14A; ii** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.227 \pm 0.073$, $m_{\text{CgTx}} = 0.254 \pm 0.089$, $p = 0.58$). Cabe destacar que el efecto de SNX sobre los CCDVs de tipo R es más específico que el del Ni^{2+} , que también puede afectar la actividad de los CCDVs de tipo T (Fox et al., 1987). Sin embargo, las evidencias indican que, si bien estos CCDVs se encuentran asociados a la regulación de la excitabilidad neuronal, no participarían en la transmisión sináptica rápida (Catterall, 2011; Iftinca, 2011), además de que no existen evidencias histológicas que sugieran la presencia de los mismos en las fibras MOC (Waka et al., 2003). Teniendo en cuenta que SNX y Ni^{2+} tuvieron un efecto similar sobre el bloqueo de la transmisión sináptica (**Figura 14B**; ~55 % en cada caso, sin diferencias significativas; prueba de t no pareada, $p = 0.1239$), cabe suponer que el bloqueo mediado por el Ni^{2+} sería exclusivamente producto de su acción sobre los canales de tipo R. Un razonamiento similar a este fue previamente empleado en un trabajo en el que se estudió la transmisión sináptica entre fibras paralelas y células de Purkinje, en el cerebelo (Myoga y Regehr, 2011).

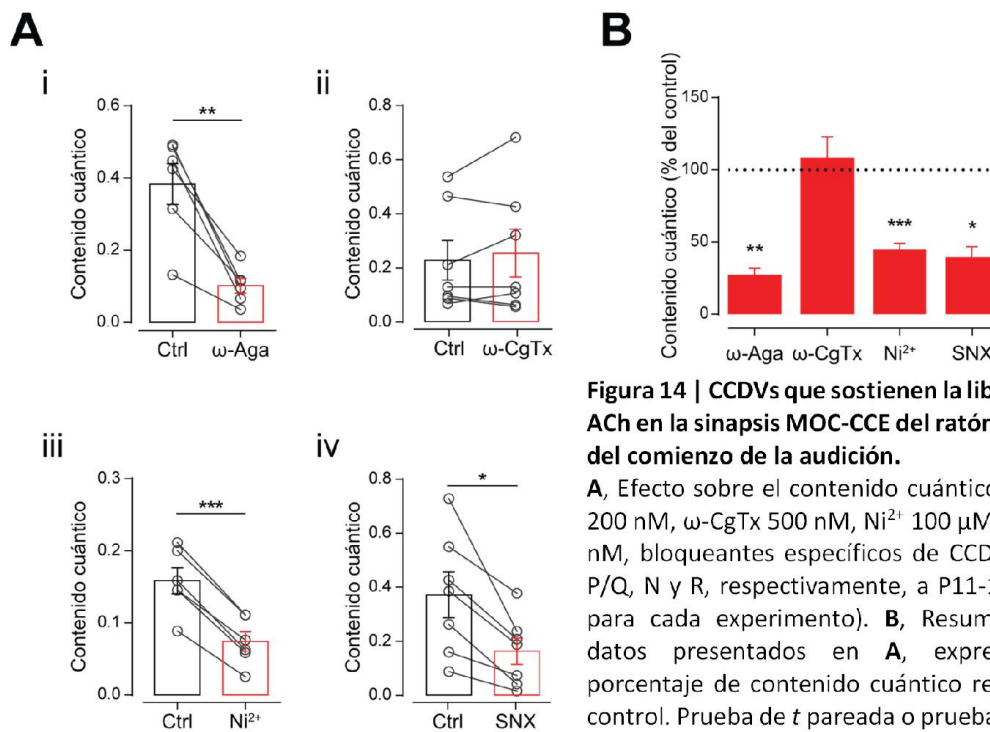


Figura 14 | CCDVs que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE del ratón alrededor del comienzo de la audición.

A, Efecto sobre el contenido cuántico de ω -Aga 200 nM, ω -CgTx 500 nM, Ni^{2+} 100 μM y SNX 500 nM, bloqueantes específicos de CCDVs de tipo P/Q, N y R, respectivamente, a P11-13 ($n = 6-7$ para cada experimento). **B**, Resumen de los datos presentados en **A**, expresados en porcentaje de contenido cuántico respecto del control. Prueba de t pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los resultados presentados en la **Figura 14** sugieren que alrededor del comienzo de la audición, a P11-13, los CCDVs de tipo P/Q y R sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE. Con el fin de corroborar que efectivamente en este período postnatal estos dos tipos de CCDVs son suficientes para sostener dicho proceso, se llevó a cabo un experimento de aplicación secuencial de ω -Aga y SNX, antagonistas específicos de los CCDVs de tipo P/Q y R, respectivamente. En la **Figura 15A** se ilustra el efecto de ω -Aga y SNX sobre la transmisión sináptica a P11-13 sobre las distintas CCEs analizadas ($m_{\text{Ctrl}} = 0.338 \pm 0.100$, $m_{\text{Aga}} = 0.095 \pm 0.019$, $m_{\text{Aga+SNX}} = 0.036 \pm 0.008$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{Aga}}$, $p = 0.00002$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{Aga+SNX}}$, $p = 0.00006$; $m_{\text{Aga}} \text{ vs } m_{\text{Aga+SNX}}$, $p = 0.00002$). Además, en la **Figura 15B** puede apreciarse la evolución temporal del efecto de la combinación de estos antagonistas.

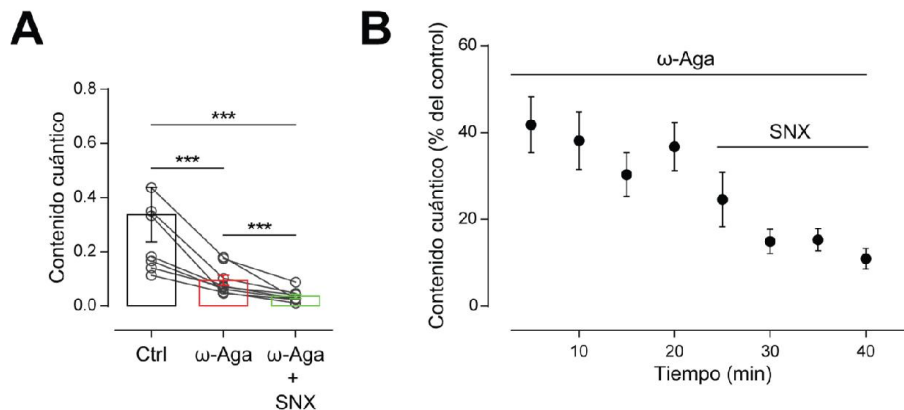


Figura 15 | El rol de los CCDVs de tipo P/Q y R en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE alrededor del comienzo de la audición.

A y B, Efecto total sobre el contenido cuántico (**A**) y evolución temporal del mismo parámetro (**B**) frente a la aplicación secuencial de ω -Aga 200 nM y SNX 500 nM, bloqueantes específicos de los CCDVs de tipo P/Q y R, respectivamente, en la sinapsis MOC-CCE de ratones, a P11-13 ($n = 8$). Los valores en **A** corresponden a los últimos dos puntos del tratamiento en **B**. En **B**, los valores de contenido cuántico están relativizados al control (100 %). Notar el remanente de respuesta sináptica de alrededor del 10 % al final del experimento. Prueba de Friedman seguido de la prueba de Conover; $***p < 0.001$.

Con el objetivo de evaluar posibles cambios en la composición de CCDVs durante el desarrollo postnatal de la sinapsis MOC-CCE, se analizó la presencia de los CCDVs de tipo P/Q, R y N en un estadio más maduro. Teniendo en cuenta la especificidad diferencial entre el Ni^{2+} y la SNX sobre los CCDVs y los resultados obtenidos a P11-13 (**Figura 14**), en este caso se utilizó únicamente Ni^{2+} para evaluar la presencia de CCDVs de tipo R en este estadio. A diferencia de lo observado alrededor del comienzo de la audición (P11-13), a P20-22 se encontraron efectos significativos para los compuestos que bloquean

los tres tipos de CCDVs hasta aquí evaluados (**Figura 16A**; $m_{Ctrl} = 0.501 \pm 0.177$, $m_{Aga} = 0.197 \pm 0.103$, $p = 0.03125$; $m_{Ctrl} = 0.534 \pm 0.199$, $m_{Ni} = 0.191 \pm 0.062$, $p = 0.03125$; $m_{Ctrl} = 0.199 \pm 0.017$, $m_{CgTx} = 0.096 \pm 0.021$, $p = 0.00032$), sugiriendo que además de los CCDVs de tipo P/Q y R, los canales de tipo N también sostienen la liberación de ACh desde las fibras MOC en este estadio.

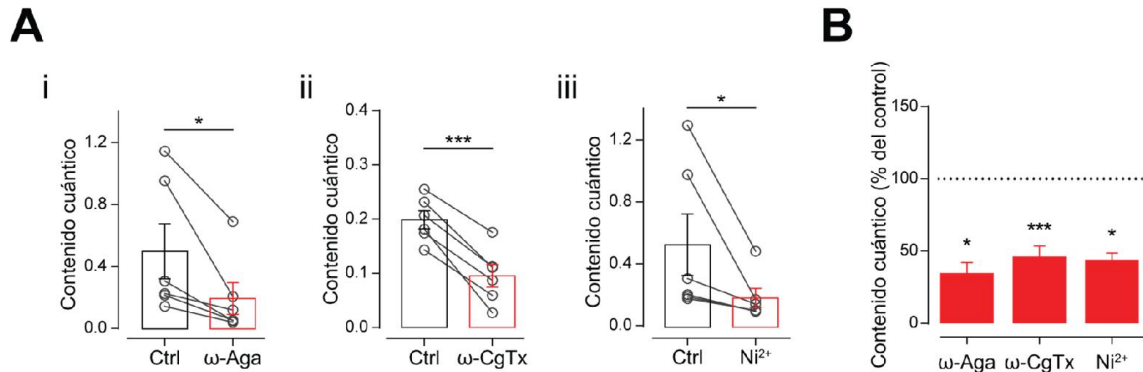


Figura 16. CCDVs que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE del ratón a P20-22.

A, Efecto sobre el contenido cuántico de ω -Aga 200 nM, ω -CgTx 500 nM y Ni^{2+} 100 μ M, antagonistas de CCDVs de tipo P/Q, N y R, respectivamente P20-22 ($n = 6$ para cada experimento). **B**, Resumen de los datos presentados en **A**, expresados en porcentaje de contenido cuántico respecto del control. Prueba de t pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Resulta interesante destacar el hecho de que, en ambos estadios del desarrollo, la sumatoria de los efectos de la aplicación de los distintos bloqueantes de CCDVs por separado, excede el 100 % de bloqueo (**Figura 14B** y **Figura 16B**; P11-13: ω -Aga + SNX/ Ni^{2+} ~ 130 %; P20-22: ω -Aga + ω -CgTx + Ni^{2+} ~ 170 %). Esto puede explicarse teniendo en cuenta la relación no lineal entre el Ca^{2+} extracelular y la transmisión sináptica, descrita hace tiempo en múltiples sinapsis (Dodge y Rahamimoff, 1967; Jan y Jan, 1976; Smith et al., 1985; Heidelberger et al., 1994; Mintz et al., 1995; Borst y Sakmann, 1996; Takahashi et al., 1996), incluyendo la sinapsis transitoria MOC-CCI de ratones (Zorrilla de San Martín et al., 2010). La combinación de este mecanismo con el hecho de que los distintos tipos de CCDVs pueden afectar diferencialmente el proceso de liberación de neurotransmisores (Wu et al., 1999), determina que las variaciones en la actividad de los CCDVs que median la entrada del Ca^{2+} al terminal presináptico, impacten severamente y de manera no lineal en este proceso. A pesar de esta observación, resultó sorprendente que a P11-13, la aplicación secuencial de los antagonistas de los CCDVs de tipo P/Q y R no sólo no superó un efecto del 100 %, sino que además se observó una pequeña fracción remanente de actividad sináptica (**Figura 15**; $m\%$ respecto del control: $m\%_{Aga} = 36.77 \pm 5.53 \%$, $m\%_{Aga+SNX} = 10.95 \pm 2.35 \%$). Este resultado sumado a la ausencia de los CCDVs de tipo N alrededor del comienzo de la

audición, nos sugirió que, si bien en este estadio del desarrollo los CCDVs de tipo P/Q y R serían los principales involucrados en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE, los CCDVs de tipo L también podrían participar en dicho proceso. Si bien hubiese sido interesante realizar un experimento similar a P20-22, esto no fue posible debido a la limitación temporal para trabajar con la preparación del órgano de Corti a esta edad postnatal (ver **Materiales y Métodos**), lo que impide poder esperar el tiempo necesario para alcanzar la estabilidad del efecto máximo para cada uno de los tres antagonistas de los CCDVs que participan en este proceso.

El rol de los CCDVs de tipo L en la sinapsis MOC-CCE

Los CCDVs de tipo L no suelen participar del proceso de neurotransmisión en sinapsis rápidas (Catterall, 2011), aunque se ha demostrado que en ciertas condiciones pueden contribuir con el mismo (Katz et al., 1996; Sugiura y Ko, 1997; Rosato Siri y Uchitel, 1999; Urbano et al., 2001; Flink y Atchison, 2003; Perissinotti et al., 2008). Nuestro laboratorio ha demostrado que, en la sinapsis transitoria MOC-CCI de ratones durante la primera semana de desarrollo postnatal (P4-7) estos canales pueden contribuir parcialmente a la liberación de ACh (Kearney et al., 2019). Por esta razón, teniendo en cuenta el remanente de corriente observado luego de bloquear los CCDVs de tipo P/Q y R a P11-13 y que los canales de tipo N no participan de la liberación en dicho estadio, se decidió evaluar un posible rol de los CCDVs de tipo L en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE.

La actividad de los CCDVs de tipo L es sensible a compuestos orgánicos denominados dihidropiridinas (DHPs), que pueden modularlos positiva o negativamente (Doering y Zamponi, 2003). Para investigar la posible participación de los CCDVs en el terminal sináptico de las fibras MOC, tanto a P11-13 como a P20-22, se evaluó el efecto del agonista (\pm)BayK-8644 (BayK, 10 μ m) y el antagonista Nifedipina (Nife, 3 μ m) sobre la eficacia de liberación de ACh. A P11-13 se encontró que tanto el antagonista, Nife, como el agonista, BayK, aumentaron significativamente la liberación de ACh (**Figura 17A**; **i** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.189 \pm 0.060$, $m_{\text{Nife}} = 0.303 \pm 0.070$; $p = 0.0004$; **ii** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.321 \pm 0.103$, $m_{\text{BayK}} = 0.666 \pm 0.254$, $p = 0.0004$). En cambio, a P20-22, se observaron efectos opuestos para estos compuestos, ya que Nife provocó un aumento significativo en la liberación de ACh, mientras que BayK una disminución significativa de dicho parámetro (**Figura 17B**; **i** - $m_{\text{Ctrl}} = 0.275 \pm 0.081$, $m_{\text{Nife}} = 0.497 \pm 0.108$, $p = 0.0129$;

ii - $m_{Ctrl} = 0.479 \pm 0.159$, $m_{BayK} = 0.216 \pm 0.070$, $p = 0.0313$). Estos resultados sugieren que, durante el desarrollo postnatal, los CCDVs de tipo L podrían estar involucrados en la liberación de ACh desde los terminales MOC que contactan a las CCEs. No obstante las evidencias indican que no se encontrarían en los sitios activos, ya que si participaran directamente del proceso de fusión vesicular mediado por la entrada de Ca^{2+} , hubiéramos esperado que el antagonista (Nife) de estos canales disminuyera la liberación del neurotransmisor, algo que no ocurrió en ninguno de los dos estadios analizados. En línea con este razonamiento, si los canales L se encontraran en los sitios activos también hubiéramos esperado que el agonista (BayK) aumentase significativamente la liberación, lo que no ocurrió en el estadio de desarrollo más avanzado (**Figura 17B-ii**). A P11-13, en cambio, el BayK sí aumentó la liberación de ACh, aunque este resultado es especialmente llamativo teniendo en cuenta que, en el mismo estadio, el antagonista de los CCDVs de tipo L también aumentó la liberación de ACh (**Figura 17B-i**). Los resultados obtenidos son idénticos a los reportados en trabajos previos de nuestro laboratorio en la sinapsis transitoria MOC-CCI, en la que, en estadios tempranos del desarrollo postnatal (P4-7) tanto BayK como Nife aumentan el contenido cuántico de la liberación evocada (Kearney et al., 2019), mientras que en un estadio más maduro (P9-11), Nife aumenta la liberación y BayK la disminuye (Zorrilla de San Martín et al., 2010). En estos trabajos se demostró que dichos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta un acople funcional Bay entre los CCDVs de tipo L y canales de K^+ de tipo BK, cuya actividad depende del potencial de membrana y del Ca^{2+} intracelular (Fakler y Adelman, 2008).

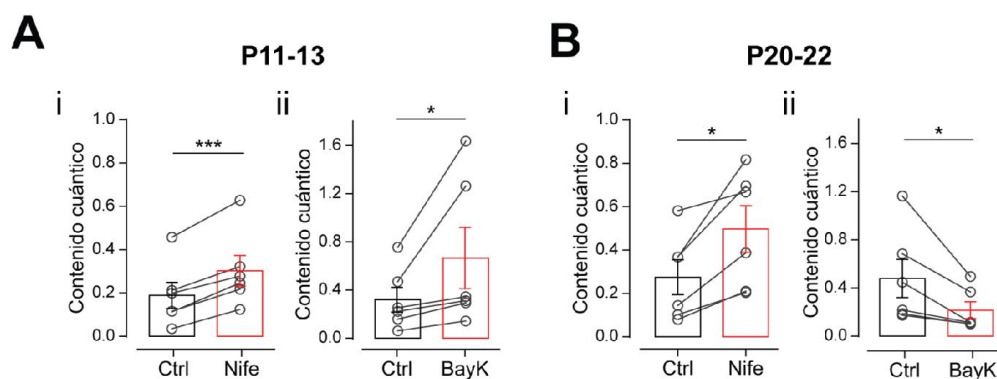


Figura 17 | CCDVs de tipo L involucrados en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE, durante el desarrollo postnatal. A y B, Efecto sobre el contenido cuántico de las DHPs Nife (3 μ M) y BayK (10 μ M) a P11-13 (A; n = 6 para cada experimento) y a P20-22 (B; n = 6 para cada experimento). Prueba de *t* pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * p < 0.05, * p < 0.001.**

Acople funcional entre CCDVs de tipo L y canales BK durante el desarrollo postnatal

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro laboratorio indicando un acople funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK en la sinapsis transitoria MOC-CCI (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019), se indagó, en primer lugar, acerca de la presencia de los canales BK en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal. Para ello, evaluamos el efecto de la Iberiotoxina (IbTx, 200 nM), bloqueante específico de los canales BK (Galvez et al., 1990), sobre la eficacia de la liberación de ACh. En ambos estadios se encontró un aumento significativo de la liberación del neurotransmisor en presencia de IbTx (**Figura 18A y B**; P11-13: $m_{Ctrl} = 0.129 \pm 0.010$, $m_{IbTx} = 0.219 \pm 0.021$, $p = 0.0043$; P20-22: $m_{Ctrl} = 0.224 \pm 0.022$, $m_{IbTx} = 0.376 \pm 0.046$, $p = 0.0012$). Estos resultados indican que los canales BK se expresan en ambos estadios del desarrollo en la sinapsis MOC-CCE, tal como fuera observado durante el desarrollo postnatal en la sinapsis transitoria MOC-CCI (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019). En múltiples sinapsis se ha demostrado que los canales BK pueden participar de la repolarización de los potenciales de acción presinápticos, determinando la duración de los mismos (Adams et al., 1982; Storm, 1987). Al suprimir la acción de estos canales mediante el uso de IbTx, el potencial de acción sería de mayor duración (Hu et al., 2001; Gu et al., 2007) y determinaría una mayor entrada de Ca^{2+} (Klyachko et al., 2001), acompañada por un aumento en la liberación del neurotransmisor, tanto para P11-13 como para P20-22 (**Figura 18**). Más aún, los resultados obtenidos con Nife, antagonista de los CCDVs de tipo L, en ambos estadios del desarrollo (**Figura 17A-i y B-i**) sugieren un acople funcional entre los canales L y BK, ya que al bloquear el flujo de Ca^{2+} a través de los primeros se impediría la activación de los BK, y por ende su modulación negativa sobre la liberación. En línea con este argumento, el efecto inhibitorio del BayK sobre la liberación de ACh observado a P20-22 también se condice con un acople funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK, ya que, en presencia de este agonista, los canales BK recibirían un mayor influjo de Ca^{2+} y

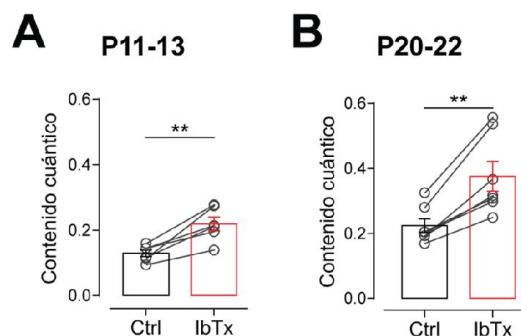


Figura 18 | Canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de tipo BK y su rol en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal.

A y B, Efecto sobre el contenido cuántico de IbTx 200 nM, bloqueante específico de los canales BK, a P11-13 (**A**; $n = 8$) y a P20-22 (**B**; $n = 6$). Prueba de t pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; ** $p < 0.01$.

acelerarían la repolarización de los potenciales de acción, determinando una menor entrada de Ca^{2+} frente a cada evento de despolarización y una menor liberación de ACh (**Figura 17B-ii**). No obstante, aún resta explicar el resultado obtenido a P11-13, en el que, contrariamente a la idea del acople funcional entre los canales L y BK, el BayK produce un aumento de la liberación de ACh. Una posible explicación es que a P20-22 el influjo de Ca^{2+} a través de los CCDVs de tipo L sólo determina la apertura de los canales BK, mientras que a P11-13, además de activar a los canales BK, también contribuye a la liberación de ACh, conjuntamente con los CCDVs de tipo P/Q y R.

Para comprender los resultados contradictorios respecto del efecto del BayK alrededor del comienzo de la audición y en un estadio más maduro, se decidió investigar el acople funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de oclusión, en los que se se utilizaron las DHPs para modular la actividad de los canales L, luego de bloquear los canales BK con IbTx (200 nM). En estas condiciones se evaluó el contenido cuántico (m) de la sinapsis MOC-CCE y se encontró que, luego del aumento significativo en la liberación de ACh mediado por la aplicación de IbTx, la presencia de Nife (3 μM) no tuvo efecto alguno en ninguno de los dos estadios evaluados (**Figura 19A-i y B-i**; P11-13: $m_{\text{Ctrl}} = 0.233 \pm 0.062$, $m_{\text{IbTx}} = 0.729 \pm 0.230$, $m_{\text{IbTx+Nife}} = 0.803 \pm 0.257$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx}}$, $p = 0.003$, $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+Nife}}$, $p = 0.0013$, $m_{\text{IbTx}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+Nife}}$, $p = 0.56$; P20-22: $m_{\text{Ctrl}} = 0.412 \pm 0.079$, $m_{\text{IbTx}} = 0.696 \pm 0.089$, $m_{\text{IbTx+Nife}} = 0.674 \pm 0.099$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx}}$, $p = 0.0003$, $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+Nife}}$, $p = 0.004$, $m_{\text{IbTx}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+Nife}}$, $p = 0.08$). Este resultado es consistente con el acople funcional propuesto entre los canales L

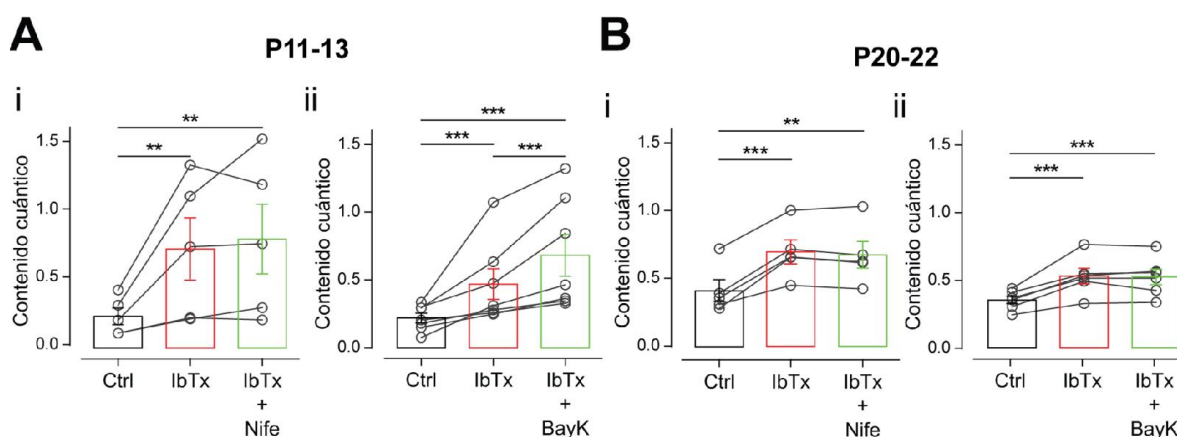


Figura 19 | Acople funcional entre canales BK y CCDVs de tipo L en la sinapsis MOC-CCE, durante el desarrollo postnatal. A y B, Efecto sobre el contenido cuántico de la aplicación de IbTx 200 nM, bloqueante específico de los canales BK, seguida del antagonista (i; Nife 3 μM) o del agonista (ii; BayK 10 μM), de los CCDVs de tipo L, a P11-13 (A; $n = 5-7$ para cada experimento) y a P20-22 (B; $n = 5-6$ para cada experimento). ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Tukey o prueba de Friedman seguido de la prueba de Conover; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

y BK, ya que una vez bloqueados estos últimos, el antagonista de los CCDVs de tipo L, cuya función sería proveer a los BK de Ca^{2+} , no produjo ningún efecto sobre la liberación de ACh. Al realizar este experimento con el agonista de los canales L (BayK, 10 μM) luego de la aplicación de IbTx 200 nM, los resultados variaron en función del período de desarrollo evaluado. A P11-13, la aplicación de BayK luego de haber bloqueado los canales BK produjo un aumento en la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE (**Figura 19A-ii**; $m_{\text{Ctrl}} = 0.221 \pm 0.035$, $m_{\text{IbTx}} = 0.468 \pm 0.114$, $m_{\text{IbTx+BayK}} = 0.682 \pm 0.154$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx}}$, $p = 0.00023$, $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+BayK}}$, $p = 0.0006$, $m_{\text{IbTx}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+BayK}}$, $p = 0.00023$). Por el contrario, a P20-22, el agonista de los CCDVs de tipo L no tuvo efecto alguno luego del bloqueo de los canales BK (**Figura 19B-ii**; $m_{\text{Ctrl}} = 0.351 \pm 0.029$, $m_{\text{IbTx}} = 0.527 \pm 0.057$, $m_{\text{IbTx+BayK}} = 0.521 \pm 0.057$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx}}$, $p = 0.00033$, $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+BayK}}$, $p = 0.00014$, $m_{\text{IbTx}} \text{ vs } m_{\text{IbTx+BayK}}$, $p = 0.54$). El hecho de que en el estadio del desarrollo más maduro la IbTx ocluya el efecto del BayK sugiere que, a P20-22, el Ca^{2+} que ingresa a través de los CCDVs de tipo L está únicamente involucrado en la activación de los canales BK, de manera consistente con lo que se describió en el estadio de mayor madurez de la sinapsis transitoria MOC-CCI (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Por otro lado, los resultados obtenidos a P11-13 sugieren que alrededor del comienzo de la audición los componentes presinápticos involucrados en la liberación de ACh en los terminales MOC que contactan a las CCEs no estarían tan estrictamente compartimentalizados, hipótesis apoyada por hallazgos previos de nuestro laboratorio en la sinapsis MOC-CCI (Kearney et al., 2019). Por este motivo puede pensarse que frente a ciertas condiciones como la presencia de BayK, que produce un aumento en el tiempo de apertura de los CCDVs de tipo L (Hess et al., 1984), el Ca^{2+} a través de los mismos puede llegar a los sitios activos y gatillar el mecanismo de fusión vesicular, contribuyendo a la liberación de ACh en los terminales MOC que contactan a las CCEs alrededor del comienzo de la audición.

Compartimentalización de los componentes presinápticos que participan de la liberación de ACh

Los resultados diferenciales obtenidos con BayK para cada estadio del desarrollo (**Figura 17A-ii y B-ii**; **Figura 19 A-ii y B-ii**) sugieren un acople diferencial entre los CCDVs de tipo L y los canales BK. Este fenómeno podría estar acompañado por cambios en la compartimentalización del resto de los componentes de la maquinaria presináptica. Así, alrededor del comienzo de la audición los CCDVs de tipo L podrían encontrarse lo suficientemente próximos a los sitios de liberación vesicular como para

que, en presencia de un compuesto que aumenta su tiempo de apertura (Hess et al., 1984) ejerzan un efecto sobre la liberación de ACh. Un abordaje experimental extensamente empleado para estudiar la dinámica del Ca^{2+} intracelular y su impacto sobre la liberación vesicular es el uso de quelantes de dicho catión. Esta estrategia permite interrumpir el flujo de Ca^{2+} entre los CCDVs y las proteínas que participan de la liberación de los neurotransmisores en los terminales presinápticos (Neher, 1998). Este tipo de experimento fue mayoritariamente realizado en sinapsis en las que es posible controlar el medio intracelular presináptico, como el Calyx de Held en el SNC o las células cromafines, de manera que los quelantes de Ca^{2+} pueden ser administrados a los terminales a través del electrodo de registro. En aquellas preparaciones en las que el terminal presináptico es inaccesible, es posible utilizar quelantes de Ca^{2+} que permean a través de las membranas celulares gracias a la unión covalente con un compuesto no polar. Una vez en el interior de las células, el quelante se vuelve activo gracias a la acción de fosfodiesterasas intracelulares que escinden la porción no polar. De este modo, si bien la concentración de los quelantes permeables en el terminal presináptico es desconocida, estos compuestos permiten controlar la dinámica del Ca^{2+} intracelular luego de la apertura de los CCDVs mediante un método no invasivo (Tsien, 1981).

Con el fin de estudiar el acople funcional entre los CCDVs de tipo L y los canales BK, y debido a la imposibilidad de controlar el medio intracelular del terminal de las fibras MOC, se utilizó EGTA-AM para modificar la dinámica del Ca^{2+} presináptico. Este compuesto es un quelante de Ca^{2+} lento que permea la membrana celular y que puede afectar la facilitación sináptica de corto término al reducir el Ca^{2+} residual en la presinapsis, sin alterar la probabilidad inicial de liberación vesicular (Atluri y Regehr, 1996; Müller et al., 2010). En primera instancia, fue necesario determinar el tiempo necesario para que el EGTA-AM se cargara exitosamente en los terminales presinápticos MOC. Para ello, mediante protocolos de pulsos pareados a una frecuencia de 100 Hz, se monitoreó el índice de facilitación (IF) asociado a la probabilidad de liberación ($\text{IF}_P = P_2/P_1$) de la sinapsis MOC-CCE en presencia de EGTA-AM (100 μM), a lo largo del tiempo. Como puede apreciarse en el curso temporal ilustrado en la **Figura 20A**, el IF_P de la sinapsis MOC-CCE se redujo luego de 12.5 min en presencia de EGTA-AM, mientras que la probabilidad inicial de liberación (P_1) no sufrió modificaciones significativas (**Figura 20A**; Ctrl, flechas negras: $P_{1\text{-Ctrl}} = 0.131 \pm 0.031$, y EGTA-AM, flechas grises: $P_{1\text{-EGTA-AM}} = 0.111 \pm 0.024$, $p = 0.25$; prueba de

t pareada). La reducción en la facilitación (**Figura 20B**; $IF_{P-Ctrl} = 2.055 \pm 0.238$, y $IF_{P-EGTA-AM} = 0.794 \pm 0.113$, $p = 0.004$) sin cambios en el contenido cuántico inicial (**Figura 20C**; $m_{Ctrl} = 0.144 \pm 0.038$, $m_{EGTA-AM} =$

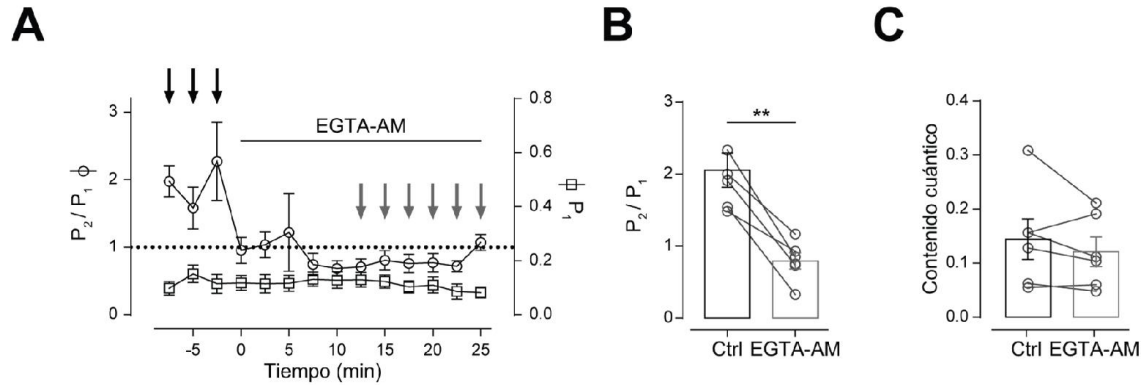


Figura 20 | Efecto del EGTA-AM sobre la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE.

A, Curso temporal del efecto de EGTA-AM (100 μ M) sobre la plasticidad de corto término, medida mediante protocolos de pulsos pareados ($IF_P = P_2/P_1$), y sobre la probabilidad inicial de liberación (P_1), en la sinapsis MOC-CCE ($n = 6$). **B** y **C**, Cuantificación del efecto de EGTA-AM sobre el IF_P y el contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE, respectivamente. Los datos de cada CCE corresponden al promedio de los valores obtenidos en los tiempos indicados con flechas negras (Ctrl) y grises (EGTA-AM) en **A**. Prueba de *t* pareada; ** $p < 0.01$.

0.121 ± 0.027 , $p = 0.26$) sugiere que el quelante de Ca^{2+} se carga de manera eficiente en los terminales MOC, y en tiempos compatibles con los requeridos experimentalmente. Es importante destacar que, si bien durante el experimento este compuesto también ingresa a las CCEs, su concentración es despreciable frente a la concentración de EGTA en la solución intracelular con las que se realizan los registros en estas células (5 mM).

A continuación, con el fin de analizar posibles cambios en la compartimentalización de los componentes presinápticos durante el desarrollo postnatal, se estudió el efecto de IbTx y BayK, luego de preincubar la preparación con EGTA-AM (100 μ M). A P11-13, la presencia de dicho compuesto previno tanto el efecto de IbTx (200 nM) como el de BayK (10 μ M) sobre la liberación de ACh (**Figura 21A**; $m_{Ctrl} = 0.110 \pm 0.017$, $m_{IbTx} = 0.107 \pm 0.094$, $m_{IbTx+BayK} = 0.107 \pm 0.013$, $p = 0.75$). En cambio a P20-22, la presencia de EGTA-AM no modificó los efectos previamente observados sobre la transmisión sináptica a partir de la aplicación secuencial de IbTx y BayK (**Figura 21B**; $m_{Ctrl} = 0.370 \pm 0.024$, $m_{IbTx} = 0.490 \pm 0.029$, $m_{IbTx+BayK} = 0.474 \pm 0.026$; m_{Ctrl} vs m_{IbTx} , $p = 0.0037$, m_{Ctrl} vs $m_{IbTx+BayK}$, $p = 0.0027$, m_{IbTx} vs $m_{IbTx+BayK}$, $p = 0.48$). Al comparar estos resultados con los obtenidos en ausencia de EGTA-AM (**Figura**

19A-ii y **B-ii**), resultó evidente que a P11-13 el quelante de Ca^{2+} fue capaz de impedir la activación de los canales BK a partir del flujo de Ca^{2+} entrante por los CCDVs de tipo L, ya que el bloqueante específico de los canales BK no tuvo efecto alguno sobre la liberación de ACh. Asimismo, la presencia de EGTA-AM también impidió que el Ca^{2+} a través de los canales de tipo L influyera sobre los sitios activos, ya que tampoco se registró un aumento en la eficacia de la liberación de ACh en presencia del agonista de los CCDVs de tipo L (BayK; **Figura 21A**). Teniendo en cuenta que el EGTA es un quelante de Ca^{2+} lento, estos resultados apoyan la idea de que, a P11-13, los canales L no forman parte del sitio activo en los terminales MOC. Los resultados obtenidos a P20-22 en presencia de EGTA-AM, en cambio, fueron idénticos a los obtenidos en ausencia del quelante de Ca^{2+} (**Figura 21B**). En conjunto, estos resultados sugieren que, durante el desarrollo postnatal, la sinapsis MOC-CCE se encuentra sometida a cambios en la compartimentalización de sus componentes presinápticos. Específicamente, a P20-22 los CCDVs de tipo L estarían más cerca de los canales BK de lo que podrían estar a P11-13. Más aún, alrededor del comienzo de la audición, los CCDVs de tipo L estarían lo suficientemente cerca de los sitios activos responsables de la liberación de ACh, de manera que al aumentar farmacológicamente su tiempo de apertura, el Ca^{2+} a través de ellos impactaría en el mecanismo de liberación del neurotransmisor.

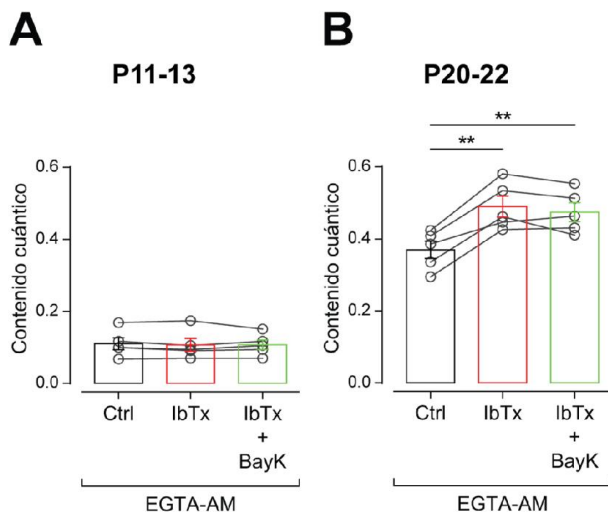


Figura 21 | Cambios en la compartimentalización presináptica durante el desarrollo postnatal en la sinapsis MOC-CCE.

A y **B**, Efectos sobre el contenido cuántico de la aplicación secuencial de IbTx (200 nM) y el agonista de los CCDVs de tipo L, BayK (10 μM), en presencia de EGTA-AM (100 μM), a P11-13 (**A**; n = 5) y a P20-22 (**B**; n = 5). ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Tukey; ** $p < 0.01$.

Modulación de la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCE por los canales BK alrededor del comienzo de la audición

Los resultados hasta aquí obtenidos indican que, además de los cambios descritos en los CCDVs responsables de la liberación de ACh en los terminales MOC, el desarrollo postnatal de la sinapsis MOC-CCE determina modificaciones en la localización de los componentes presinápticos. Este proceso se evidenció principalmente sobre el mecanismo de retroalimentación negativa del que forman parte los canales de K⁺ de tipo BK y los CCDVs de tipo L, cuya cercanía parece aumentar entre P11-13 y P20-22. A pesar de que a P11-13 los CCVD de tipo L y los canales BK estarían lo suficientemente alejados como para que la presencia de EGTA interfiriera con la activación de los canales BK, el bloqueo de estos canales con IbTx causó un aumento significativo en la liberación de ACh.. Este resultado indica que en este estadio también hay acople funcional entre los CCVD de tipo L y los canales BK. Teniendo en cuenta que se ha demostrado la importancia de los canales BK sobre el control del disparo de potenciales de acción a alta frecuencia (Gu et al., 2007) y que *in vivo* las fibras MOC pueden disparar a una frecuencia de hasta 120 Hz (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989), resulta pertinente investigar el rol de estos canales en la sinapsis MOC-CCE.

En primer lugar, se investigó el rol de los canales BK sobre la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE a partir de protocolos de estimulación con trenes de diez pulsos (**Figura 22A**). De manera similar a lo realizado en la **Figura 13**, en esta ocasión también se utilizó el IF₅ para examinar la existencia de facilitación durante el tren de estímulos. Para ello se analizó el parámetro S (amplitud de la respuesta postsináptica, incluyendo las fallas de liberación) luego de cada uno de los diez estímulos, y se definió el IF₅ como la relación entre el S correspondiente a aquel pulso para el cual se obtuvo la mayor diferencia respecto del S en el primer pulso (S_n y S₁, respectivamente; $IF_5 = S_n/S_1$). En consecuencia, a la hora de estudiar los parámetros P (probabilidad de éxito en la liberación de vesículas sinápticas) y A (el promedio de las amplitudes de aquellas eIPSCs exitosas) para estudiar el origen pre o postsináptico de la plasticidad de corto término, IF_P e IF_A también fueron definidos como la relación entre los mismos pulsos utilizados para IF₅. De manera consistente con los resultados obtenidos en experimentos de pulsos pareados (**Figura 13**) y con reportes previos de nuestro laboratorio (Ballesterero et al., 2011), a P11-13 la sinapsis MOC-CCE de ratones facilita únicamente frente a la estimulación de

alta frecuencia sobre las fibras MOC (**Tabla V, Figura 22B**; IF_{S-Ctrl} : 10 Hz, $p = 0.74$, y 80 Hz, $p = 0.025$). Tal como se describió anteriormente, los cambios observados para el IF_S a 80 Hz fueron seguidos por cambios en el IF_P , pero no en el IF_A , de acuerdo con la existencia de un mecanismo presináptico

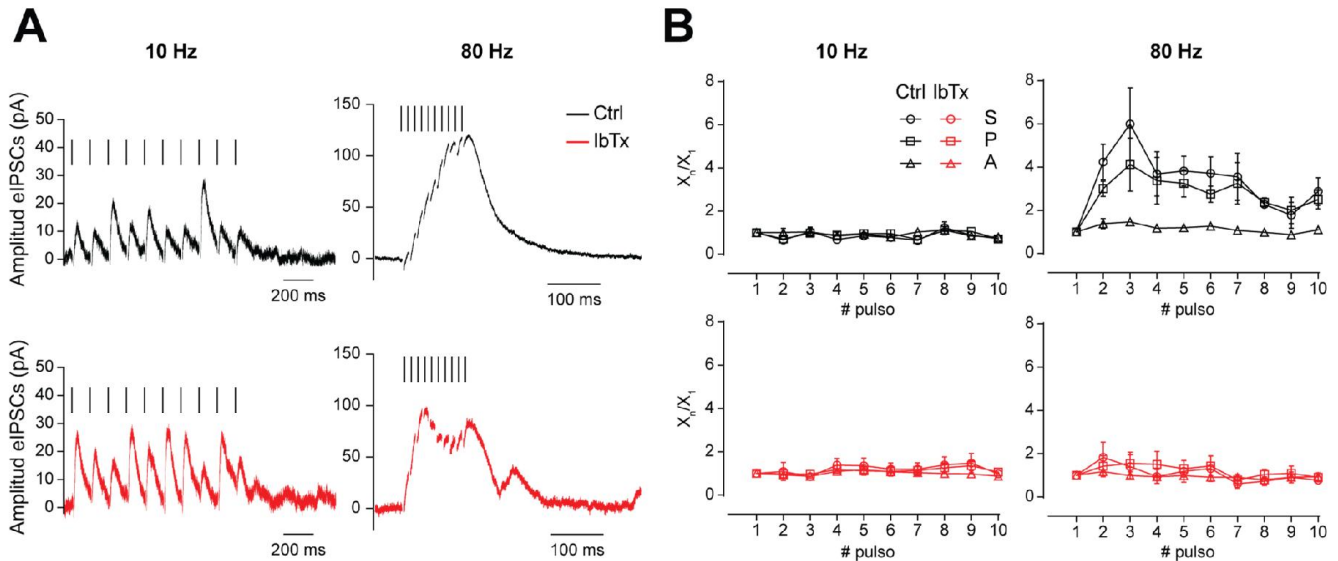


Figura 22 | Rol de los canales de K^+ de tipo BK sobre la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE, alrededor del comienzo de la audición.

A, Trazos representativos de trenes de diez pulsos a frecuencias de 10 y 80 Hz, en presencia (rojo) y ausencia (negro) de IbTx (200 nM), bloqueante específico de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de tipo BK. **B**, Estimación de los IF_S , IF_P e IF_A para la sinapsis MOC-CCE frente a trenes de estimulación de diez pulsos, a 10 y 80 Hz, en presencia (rojo; $n = 8$) y ausencia (negro; $n = 4$) de IbTx.

involucrado (**Tabla V, Figura 22B**; IF_{P-Ctrl} : 10 Hz, $p = 0.99$, y 80 Hz, $p = 0.022$; IF_{A-Ctrl} : 10 Hz, $p = 0.52$, y 80 Hz, $p = 0.28$). En cambio, en presencia de IbTx (200 nM), la facilitación previamente observada para una frecuencia de estimulación de 80 Hz fue completamente eliminada, en tanto que el comportamiento de la sinapsis a 10 Hz no presentó cambios con respecto al control (**Tabla V, Figura 22B**; IF_{S-Ctrl} : 10 Hz, $p = 0.95$, y 80 Hz, $p = 0.87$; IF_{P-Ctrl} : 10 Hz, $p = 0.71$, y 80 Hz, $p = 0.55$; IF_{A-Ctrl} : 10 Hz, $p = 0.78$, y 80 Hz, $p = 0.74$). Estos resultados son coherentes si se tiene en cuenta que el bloqueo de los canales BK produce un aumento en el contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE, que se evidenció en el mayor promedio de respuesta frente a cada pulso dentro del tren de estímulos, visible particularmente en el tren de 10 Hz (**Figura 22A**). Dicho aumento en la probabilidad inicial de liberación presináptica implica una disminución en la facilitación de corto término, consistente con lo que se observó aquí (Murthy et al., 1997; Kearney et al., 2019).

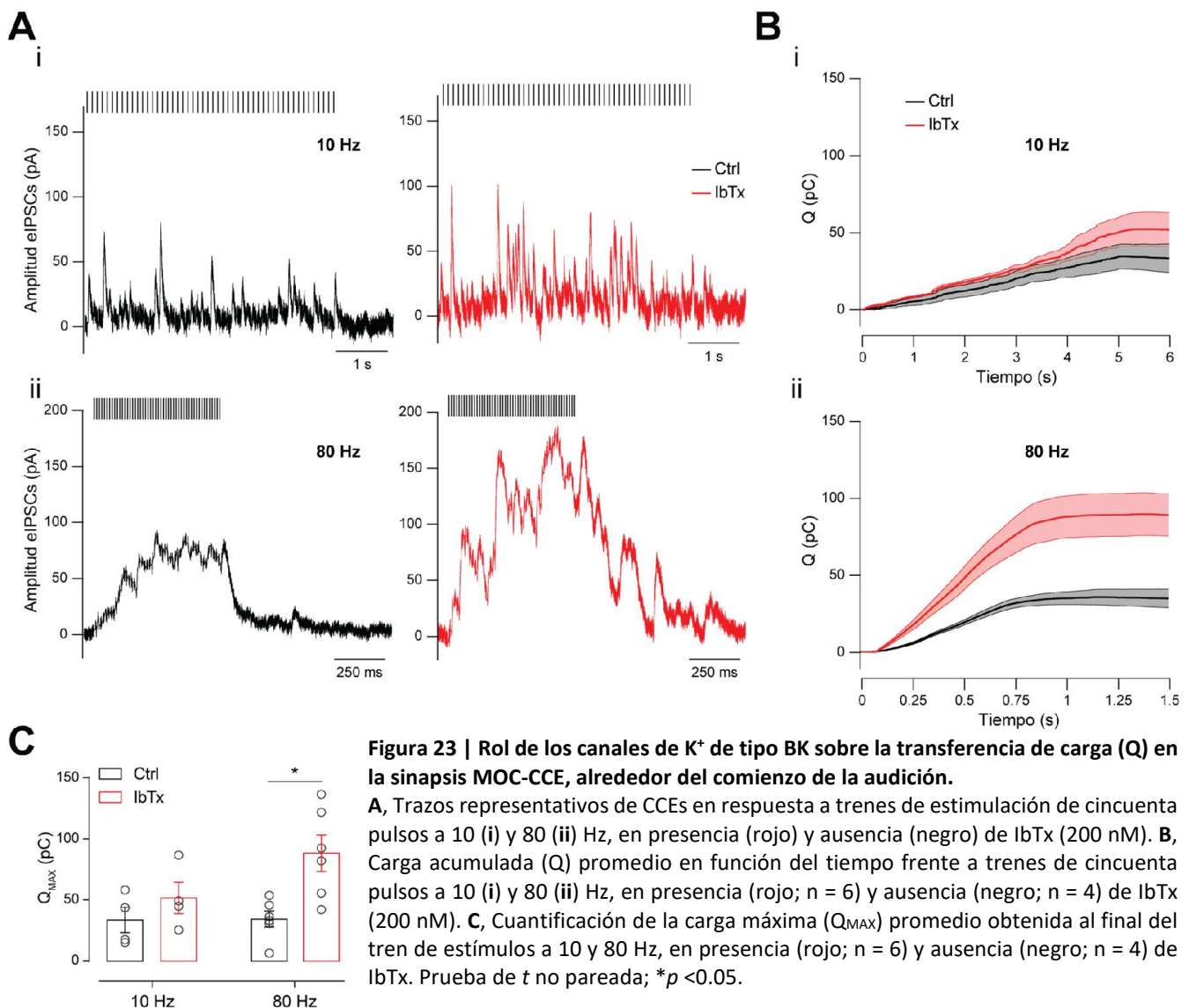
Tabla V | Cálculo de $IF_x = X_n/X_1$ para la sinapsis MOC-CCE de ratones P11-13, en presencia de IbTx 200 nM.

X_n fue elegido en función al parámetro S, de manera que S_n correspondiera al pulso dentro del tren en el que la diferencia con S_1 fuera mayor. Los parámetros P y A fueron también comparados entre el pulso “n” y el primer pulso de cada tren de estímulos. $V_s = -40$ mV. Prueba de *t* pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; **p* < 0.05.

	Ctrl (n = 4)			IbTx (n = 8)		
10 Hz	$IF_S = S_8/S_1$	$IF_P = P_8/P_1$	$IF_A = A_8/A_1$	$IF_S = S_8/S_1$	$IF_P = P_8/P_1$	$IF_A = A_8/A_1$
	1.23 ± 0.28	1.10 ± 0.19	1.12 ± 0.13	1.40 ± 0.38	1.26 ± 0.22	1.00 ± 0.14
80 Hz	$IF_S = S_3/S_1$	$IF_P = P_3/P_1$	$IF_A = A_3/A_1$	$IF_S = S_2/S_1$	$IF_P = P_2/P_1$	$IF_A = A_2/A_1$
	4.98 ± 1.82*	4.13 ± 1.22*	1.46 ± 0.15	1.84 ± 0.70	1.42 ± 0.48	1.17 ± 0.15

Si bien los protocolos de estimulación empleados a lo largo de este Capítulo son útiles para estudiar la plasticidad sináptica de corto término, pueden no ser la mejor aproximación al comportamiento fisiológico de una sinapsis. En particular, teniendo en cuenta que la frecuencia de disparo de las fibras MOC aumenta con la intensidad del estímulo sonoro *in vivo* (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987; Brown, 1989) y que esta respuesta forma parte del reflejo olivococlear que se activa frente a sonidos de duración variable, resulta lógico pensar que el disparo a alta frecuencia en la sinapsis MOC-CCE puede tener lugar durante períodos de tiempo mayores que los comprendidos por un tren de estímulos de diez pulsos. Por este motivo, con el fin de profundizar en la comprensión del rol de los canales BK alrededor del comienzo de la audición acercándonos a una condición más fisiológica, decidimos emplear protocolos de cincuenta pulsos a 10 y 80 Hz (**Figura 23A**). A primera vista, los trazos a 10 Hz en presencia de IbTx (200 nM) evidencian una mayor actividad sináptica en comparación con los trazos en ausencia del bloqueante de los canales BK, consistente con el aumento de contenido cuántico producido por este compuesto. Además, a 80 Hz puede verse que, en ausencia de IbTx la respuesta es homogénea y sostenida en el tiempo, tal como se reportó previamente (Ballesteros et al., 2011). En cambio, en presencia del bloqueante de los canales BK, la actividad sináptica se vuelve más errática, probablemente debido a la falta de control ejercida por los canales BK. Además, se observa una respuesta postsináptica de mayor amplitud que podría deberse al aumento en la eficacia de liberación de ACh en presencia de IbTx (**Figura 18A**), que reclutaría más nAChRs y contribuiría aún más a los fenómenos de sumación postsináptica que ya fueron descritos en la sinapsis MOC-CCE durante la estimulación repetitiva a alta frecuencia (Ballesteros et al., 2011). Al evaluar la transferencia de carga máxima (Q_{MAX}) al final del protocolo de estimulación, en

presencia o ausencia de IbTx, se obtuvieron diferencias significativas para este parámetro, únicamente a 80 Hz (**Figura 23B y C**; 10 Hz: $Q_{MAX-Ctrl} = 33.28 \pm 1.68$ pC, y $Q_{MAX-IbTx} = 51.84 \pm 12.84$ pC, $p = 0.31$; 80 Hz: $Q_{MAX-Ctrl} = 34.55 \pm 6.59$ pC, y $Q_{MAX-IbTx} = 88.64 \pm 14.96$ pC, $p = 0.013$). Más aún, siguiendo el mismo razonamiento utilizado para el experimento en la **Figura 23**, se evaluó el impacto del bloqueo de los canales BK en la magnitud de la hiperpolarización que se observa en las CCEs durante la estimulación a alta frecuencia (80 Hz) de las fibras MOC. Para ello empleamos un protocolo de fijación de corriente, y analizamos el efecto de IbTx (200 nM) sobre el potencial de membrana de las CCEs (**Figura 24A**). En estas condiciones, se encontraron diferencias significativas en la máxima hiperpolarización (ΔV_{MAX}) alcanzada (**Figura 24B**; $\Delta V_{MAX-Ctrl} = 4.62 \pm 0.78$ mV, $\Delta V_{MAX-IbTx} = 9.85 \pm 1.37$ mV, $p = 0.012$) y en el tiempo



necesario para que el potencial de membrana regresara al valor de base (Δt_{base}), en presencia y ausencia de IbTx (**Figura 24C**; $\Delta t_{\text{base-Ctrl}} = 0.22 \pm 0.02$ s, $\Delta t_{\text{base-IbTx}} = 0.48 \pm 0.07$ s, $p = 0.016$). En particular, esto último es consistente con los experimentos en configuración de fijación de voltaje, en los que se ve que, en presencia del bloqueante de los canales BK, hay una actividad asincrónica que perdura luego de la finalización del tren de estímulos (**Figura 23A**). En conjunto, los resultados obtenidos indican que, alrededor del comienzo de la audición, los canales BK proveen un mecanismo de control negativo de la sinapsis MOC-CCE. Más aún, nuestras observaciones sugieren que este mecanismo cobra especial relevancia frente a la estimulación eléctrica de alta frecuencia en las fibras MOC, en forma consistente con aquellas evidencias que señalan a los canales BK como piezas fundamentales en el control de la frecuencia de disparo de potenciales de acción presinápticos (Hu et al., 2001; Klyachko et al., 2001; Gu et al., 2007).

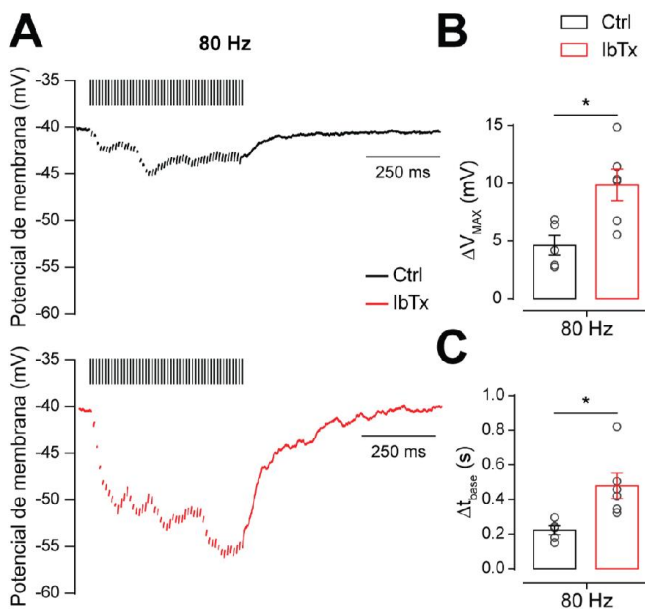


Figura 24 | Relevancia de los canales BK presinápticos sobre la hiperpolarización de las CCEs ante la estimulación repetitiva de las fibras MOC, alrededor del comienzo de la audición.

A, Trazos representativos de CCEs durante un tren de cincuenta estímulos a 80 Hz, obtenidos en la configuración de fijación de corriente en presencia (rojo) o ausencia (negro) de IbTx (200 nM). **B y C**, Cuantificación de la máxima hiperpolarización observada (ΔV_{MAX}) y el tiempo necesario para retornar a la línea de base (Δt_{base}) frente a los trenes de estímulos de cincuenta pulsos a 80 Hz, en presencia (rojo; $n = 6$) o ausencia (negro; $n = 5$) de IbTx 200 nM. Prueba de t no pareada; $*p < 0.05$.

Modulación de la transmisión sináptica por GABA en la sinapsis MOC-CCE durante el desarrollo postnatal

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el cerebro de los vertebrados, representando alrededor del 40% del procesamiento inhibitorio en la corteza y los distintos núcleos que constituyen el SNC (Bowery y Smart, 2006). Además de su establecido rol en el SNC, existen

evidencias de su presencia en el sistema nervioso periférico de los vertebrados (Jessen et al., 1979; Magnaghi et al., 2006). En particular, se observó la co-localización de la enzima GAD, involucrada en la síntesis de GABA, y el transportador vesicular de ACh en el órgano de Corti de mamíferos, en regiones correspondientes a las CCI y a las CCEs (Maison et al., 2003a). Estos resultados sugieren que, en paralelo a la inervación colinérgica eferente, existe también una inervación GABAérgica, aunque esto no ha sido aún demostrado. Más aún, las evidencias funcionales obtenidas a través de experimentos *in vivo* sugieren que la actividad de GABA no está mediada por receptores postsinápticos ionotrópicos GABA_A, sino por receptores presinápticos GABA_B (GABA_B-Rs) (Maison et al., 2006, 2008). En este sentido, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la presencia de GABA_B-Rs presinápticos regula la liberación de ACh en la sinapsis transitoria MOC-CCI antes de la retracción definitiva de las fibras eferentes y también en la sinapsis MOC-CCE alrededor del comienzo de la audición (Wedemeyer et al., 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, investigamos, en primer lugar, si la modulación por GABA sufre cambios durante el desarrollo postnatal en el órgano de Corti. Con este fin, se evaluó el efecto de CGP 36215, antagonista específico de los GABA_B-Rs, sobre la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE alrededor del comienzo de la audición, y en un estadio más avanzado. Al incubar la preparación con CGP (100 μM), en ambos estadios se obtuvo un aumento en la liberación de ACh

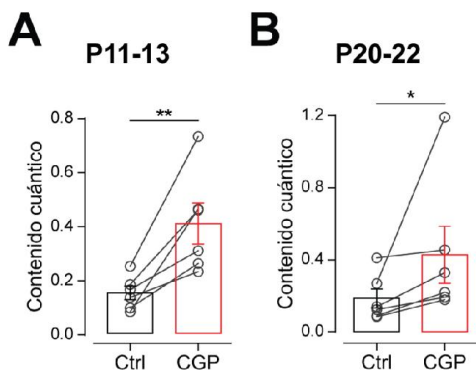


Figura 25 | Presencia de GABA_B-Rs en los terminales MOC durante el desarrollo postnatal de la sinapsis MOC-CCE.

A y B, Efecto del CGP (100 μM), bloqueante específico de los GABA_B-Rs, sobre el contenido cuántico a P11-13 (**A**; n = 6) y P20-22 (**B**; n = 6). Prueba de *t* pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

(**Figura 25A y B**; P11-13: $m_{Ctrl} = 0.150 \pm 0.025$, $m_{CGP} = 0.407 \pm 0.076$, $p = 0.03125$; P20-22: $m_{Ctrl} = 0.186 \pm 0.053$, $m_{CGP} = 0.428 \pm 0.159$, $p = 0.03125$). Los GABA_B-Rs son receptores metabotrópicos, es decir que su mecanismo de acción se encuentra acoplado a un proceso de señalización mediado por la proteína G (Gassmann y Bettler, 2012). Estudios previos del laboratorio demostraron que, en la sinapsis

transitoria MOC-CCI, dicho proceso opera sobre los CCDVs de tipo P/Q (Wedemeyer et al., 2013). Para determinar si la transmisión sináptica en la sinapsis MOC-CCE presenta una regulación similar alrededor del comienzo de la audición, se decidió evaluar el efecto de CGP (100 μ M) luego del bloqueo de los CCDVs que participan de la liberación de ACh a P11-13. La aplicación de CGP seguida de Ni^{2+} (100 μ M) revirtió la disminución en el contenido cuántico de la liberación de ACh observada en presencia del bloqueante de CCDVs de tipo R (**Figura 26A**; $m_{\text{Ctrl}} = 0.193 \pm 0.016$, $m_{\text{Ni}} = 0.105 \pm 0.010$, $m_{\text{Ni+CGP}} = 0.232 \pm 0.040$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{Ni}}$, $p = 0.002$, $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{Ni+CGP}}$, $p = 0.39$, $m_{\text{Ni}} \text{ vs } m_{\text{Ni+CGP}}$, $p = 0.00002$). En cambio, al utilizar primero ω -Aga (200 nM) para bloquear los CCDVs de tipo P/Q y disminuir el contenido cuántico de la liberación, la posterior aplicación del antagonista de los GABA_B -Rs no tuvo efectos significativos (**Figura 26B**; $m_{\text{Ctrl}} = 0.204 \pm 0.045$, $m_{\text{Aga}} = 0.036 \pm 0.016$, $m_{\text{Aga+CGP}} = 0.053 \pm 0.008$; $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{Aga}}$, $p = 0.00003$, $m_{\text{Ctrl}} \text{ vs } m_{\text{Aga+CGP}}$, $p = 0.00005$, $m_{\text{Aga}} \text{ vs } m_{\text{Aga+CGP}}$, $p = 0.92$). En conjunto, estos resultados indican que, en la sinapsis MOC-CCE, la modulación de la liberación de ACh a través de los GABA_B -Rs presentes alrededor del comienzo de la audición se mantiene a una edad en la que el sistema auditivo ya ha madurado. Más aún, los resultados indican que, a P11-13, la modulación negativa de los GABA_B -Rs sobre la transmisión sináptica es ejercida sobre los CCDVs de tipo P/Q y no sobre los de tipo R.

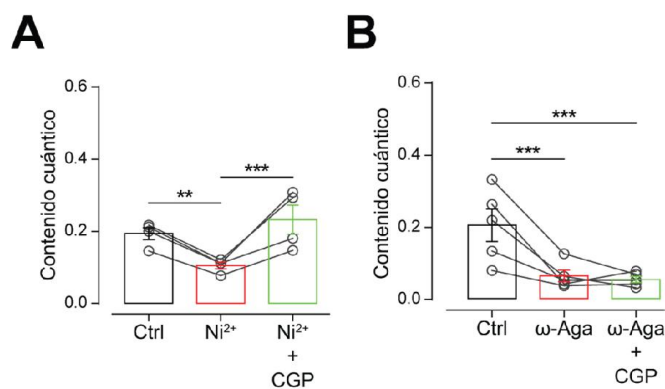


Figura 26 | Efecto de los GABA_B -Rs sobre los CCDVs que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE, alrededor del comienzo de la audición.

A y B, Efecto sobre el contenido cuántico de la aplicación secuencial de Ni^{2+} y CGP (**A**; $n = 4$) o de ω -Aga y CGP (**B**; $n = 5$). ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Tukey; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

I. Apéndice de Resultados preliminares

En la sinapsis del Calyx de Held se ha demostrado que la duración de los potenciales de acción presinápticos disminuye durante el desarrollo postnatal (Fedchyshyn y Wang, 2005). El reclutamiento de canales presinápticos de K^+ de tipo BK puede ser determinante en la forma de los potenciales de

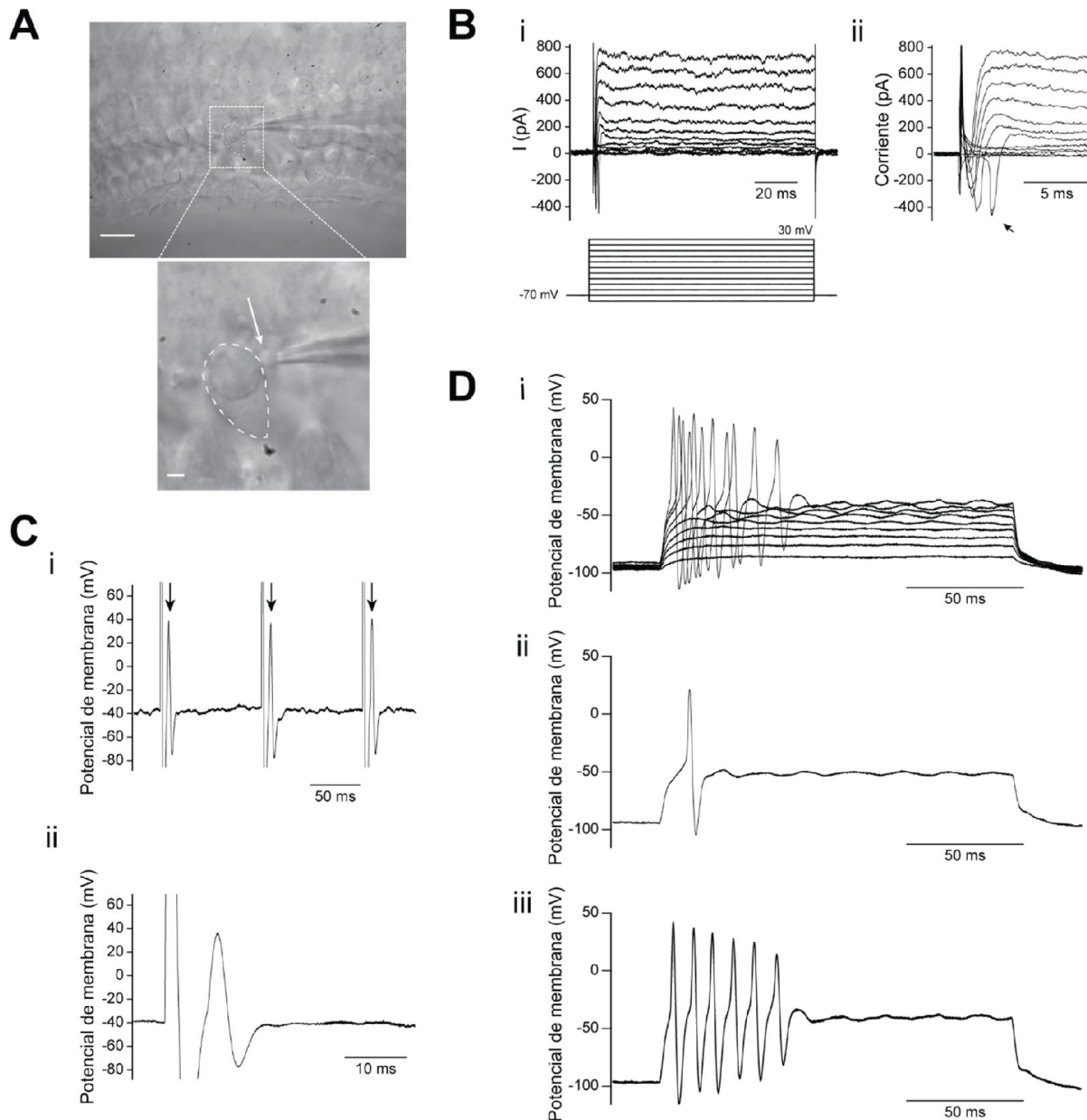


Figura 27 | Resultados preliminares de registros electrofisiológicos en el terminal presináptico MOC.

A, Imagen de la preparación del órgano de Corti bajo un objetivo de inmersión en agua con un aumento de 63X (arriba; barra de escala, 10 μ m) y su ampliación mediante un zoom óptico de 2X (abajo; barra de escala, 2 μ m). En la ampliación, la línea punteada marca el contorno de una CCE, que se encuentra en otro plano, mientras que en el plano observado pueden verse en foco el núcleo de la célula y el terminal presináptico MOC, señalado por una flecha. **Continúa en la página siguiente...**

...viene de la página anterior. **B**, Perfil de corriente de un terminal MOC representativo a P11-13 (**i**; panel superior) en respuesta a una serie de pulsos despolarizantes (**i**; panel inferior) desde $V_m = -70$ mV hasta $V_m = 30$ mV. En **ii** se muestra una ampliación de los trazos obtenidos donde pueden observarse corrientes de Na^+ , indicadas por una flecha. **C**, Potenciales de acción registrados en un terminal MOC mediante la configuración de fijación de corriente, a P11-13, logrados a partir de la estimulación eferente de las fibras MOC a una frecuencia de 10 Hz. En este caso, se inyectó corriente manualmente para mantener el potencial de membrana del terminal alrededor de -40 mV. En **i**, cada flecha señala un potencial de acción posterior a un artefacto de estimulación, mientras que en **ii** puede observarse una ampliación del trazo. **D**, Potenciales de acción obtenidos en otro terminal MOC, a P11-13, esta vez a través un protocolo de pulsos despolarizantes de 20 pA y 150 ms de duración cada uno. En este caso, se inyectó corriente manualmente para mantener el potencial de membrana del terminal en -90 mV. En **i** se muestra el resultado de la aplicación del protocolo completo, mientras que en **ii** y **iii** se muestran el primer pulso en el que se obtuvo un potencial de acción, y el último pulso del protocolo, respectivamente.

acción (Adams et al., 1982; Storm, 1987), con particular relevancia durante la actividad sináptica de alta frecuencia (Hu et al., 2001; Klyachko et al., 2001; Gu et al., 2007) como la que tiene lugar en las fibras MOC (Brown, 1989). Por estos motivos, existe la posibilidad de que nuestras evidencias acerca de los cambios en la distancia entre los CCDVs de tipo L y canales BK sea determinante sobre la forma de los potenciales de acción en los terminales presinápticos MOC. Para investigar esta posibilidad, intentamos realizar experimentos mediante registros electrofisiológicos en dichos terminales y los resultados preliminares que se presentan a continuación fueron obtenidos con la ayuda del Dr. Juan Goutman.

Desafortunadamente, estos experimentos son muy desafiantes, a tal punto que hasta el momento no hay ningún laboratorio que haya reportado resultados utilizando la técnica de *patch-clamp* en los terminales MOC. Si bien estos terminales tienen un tamaño considerable (**Figura 27A**; $\sim 1-2$ μm) y son distinguibles mediante el uso de una óptica con el aumento adecuado, no fue fácil obtener registros estables. No obstante, logramos poner a punto el registro en los terminales MOC y obtener corrientes en respuesta a pulsos despolarizantes en los que se destacan, particularmente, corrientes de Na^+ de menor amplitud que las que normalmente se registran en fibras axónicas y terminales sinápticos (**Figura 27B**). A pesar de lograr acceder a los terminales, un triunfo en sí mismo, la verdadera limitación técnica la encontramos a la hora de intentar evocar potenciales de acción en ellos, algo que solamente fue logrado en tres de veintidós terminales MOC estudiados, pertenecientes a ambos períodos del desarrollo analizados durante la Tesis. En la **Figura 27C** y **D** se muestran registros obtenidos mediante dos estrategias distintas, en configuración de fijación de corriente, sobre un terminal MOC a P11-13. En particular, en la **Figura 27C** se observan potenciales de acción obtenidos al estimular las fibras

eferentes, y en la **Figura 27D**, respuestas obtenidas mediante pulsos despolarizantes. En la Discusión de este Capítulo se analizarán los posibles motivos de estas limitaciones.

I. Discusión

En esta sección de la Tesis se estudiaron las modificaciones funcionales y moleculares que tienen lugar durante el desarrollo postnatal de la sinapsis eferente MOC-CCE del ratón, con particular énfasis en los cambios en las propiedades de la transmisión sináptica y de los componentes proteicos necesarios para la liberación de ACh. Se estudiaron dos estadios puntuales del desarrollo postnatal: P11-13, alrededor del comienzo de la audición, y P20-22, estadio en el cual la función auditiva de los ratones ha alcanzado la madurez.

Durante el desarrollo postnatal del sistema auditivo periférico, el órgano de Corti atraviesa un período de cambios muy pronunciados a nivel de los contactos aferentes y eferentes sobre las células ciliadas, que determinan la funcionalidad de este epitelio en los animales adultos (Simmons, 2002; Bulankina y Moser, 2012). La sinapsis eferente MOC-CCE, en particular, es fundamental en animales adultos, cumpliendo un rol como efector del reflejo olivococlear sobre el órgano de Corti (Guinan Jr., 2006). La inervación funcional MOC-CCE comienza alrededor de P6-8 en roedores (Dulon et al., 1998; He y Dallos, 1999; Simmons, 2002; Roux et al., 2011), y en consistencia con estas evidencias, en el presente trabajo se encontró una inervación funcional creciente sobre las CCEs entre P11-13 y P20-22. Este aumento en la funcionalidad fue acompañado por cambios en la fuerza sináptica entre ambos estadios, evidenciados por el aumento en el contenido cuántico de la liberación de ACh desde las fibras MOC. Resultados idénticos han sido reportados en la sinapsis transitoria MOC-CCI durante el desarrollo postnatal, más precisamente entre P4-7 y P9-11 (Kearney et al., 2019), estadios que marcan el comienzo en la función de esta sinapsis y el momento previo a su retracción definitiva de las CCIs, respectivamente (Liberman et al., 1990; Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

Si bien se registraron cambios en la transmisión sináptica durante el desarrollo postnatal, estos no fueron acompañados por cambios en el tamaño cuántico, lo que se evidencia en la amplitud de las SIPSCs, que se mantuvo constante entre P11-13 y P20-22. Además, la cinética de estas corrientes tampoco fue distinta entre ambos estadios, y esto es de particular importancia teniendo en cuenta que la fase de decaimiento se encuentra dominada por los canales de K^+ SK2 (Oliver et al., 2000), que se activan en las CCEs producto de la entrada de Ca^{2+} por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen y Katz, 2012). Este

resultado sugiere que, durante el desarrollo postnatal, el acople entre nAChRs y SK2 se mantiene inalterado, y refuerza la idea de cambios a nivel presináptico para explicar las diferencias funcionales observadas entre P11-13 y P20-22.

Un rasgo a destacar sobre las sIPSCs analizadas es que su frecuencia y amplitud fueron algo menores a lo observado previamente en la misma preparación (Ballesteros et al., 2011). Esto podría deberse a que en esta Tesis, a diferencia de lo realizado anteriormente en el laboratorio, se utilizó Mg^{2+} en la solución extracelular. Teniendo en cuenta que este catión divalente bloquea parcialmente el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005), es posible que se produzca un corrimiento hacia una menor amplitud en la curva de distribución de amplitudes de los eventos espontáneos. Esto podría, por un lado, disminuir la media de dicho parámetro y, por otro, hacer que los eventos más pequeños dentro de la curva pasen inadvertidos, resultando en una menor frecuencia de liberación aparente. Además de su efecto postsináptico sobre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$, existen evidencias de que el Mg^{2+} puede reducir la frecuencia de liberación espontánea en la sinapsis colinérgica de la placa neuromuscular de vertebrados (Del Castillo y Katz, 1954c; Hubbard, 1961; Blich et al., 1968), posiblemente por un efecto presináptico sobre la membrana de los terminales, algo que también podría estar ocurriendo en la sinapsis MOC-CCE en nuestras condiciones de trabajo. Conjuntamente a los efectos del Mg^{2+} sobre la liberación espontánea de ACh, también se ha observado que éste puede bloquear la liberación evocada en diferentes sinapsis periféricas (Del Castillo y Katz, 1954c; Hutter y Kostial, 1954; Kuno y Takahashi, 1986). Aunque este efecto es consistente, se ha demostrado que su magnitud puede ser muy variable (Del Castillo y Katz, 1954c) y que no altera el efecto cooperativo del Ca^{2+} presináptico (Dodge y Rahamimoff, 1967). Al igual que lo observado en las sIPSCs, las amplitudes de las eIPSCs también fueron menores en comparación con las reportados previamente por nuestro laboratorio (Ballesteros et al., 2011), lo que se explica por el efecto postsináptico sobre el nAChR (Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005). Sin embargo, a pesar de la presencia de Mg^{2+} , los valores de contenido cuántico registrados a P11-13 fueron similares en magnitud y variabilidad respecto de los observados previamente (Ballesteros et al., 2011). Cabe destacar que, más allá de los efectos que el Mg^{2+} pudiera tener sobre la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE, su presencia en la solución extracelular hace que las condiciones de trabajo se acerquen más a las fisiológicas, ya que

este ion es un componente de la perilinfa, el líquida extracelular que baña a estas células (Scheibe et al., 1999). Más aún, hemos observado que la presencia de Mg^{2+} en la solución extracelular mejora significativamente la calidad de los registros en las CCEs, siendo de gran ayuda para llevar a cabo los experimentos en esta preparación.

Los cambios en la fuerza sináptica entre P11-13 y P20-22 en la sinapsis MOC-CCE fueron acompañados por modificaciones en los patrones de plasticidad de corto término, en consistencia con la idea de que una baja fuerza sináptica se vincula con fenómenos de facilitación de corto término (Jackman y Regehr, 2017). Resultados similares fueron observados en la sinapsis transitoria MOC-CCI (Kearney et al., 2019), así como en sinapsis del SNC, específicamente en el cerebelo (Pouzat y Hestrin, 1997), el hipocampo (Schiess et al., 2010) y en el Calyx de Held (Taschenberger y von Gersdorff, 2000). Tal como se había descrito anteriormente en la sinapsis MOC-CCE a P11-13 (Ballesteros et al., 2011) y en consistencia con la visión predominante en el campo de la fisiología sináptica (Jackman y Regehr, 2017), en este trabajo mostramos que los factores subyacentes a la facilitación observada a P11-13 se circunscriben a la presinapsis. El hecho de que la facilitación presináptica desaparezca a P20-22 avala la idea de que los terminales de las fibras MOC sufren cambios significativos a nivel de los componentes que median la liberación de ACh. En la sinapsis transitoria MOC-CCI, el aumento en la fuerza sináptica y las modificaciones en la plasticidad de corto término durante el desarrollo postnatal correlacionan con un aumento en el tamaño del RRP (Kearney et al., 2019). Evidencias de este tipo han sido obtenidas también en la sinapsis del Calyx de Held (Iwasaki y Takahashi, 2001), por lo que sería lógico pensar que un proceso similar tiene lugar en la sinapsis MOC-CCE. Sin embargo, por limitaciones técnicas esto no pudo ser probado en esta sinapsis, aunque el modesto tamaño del RRP observado a P11-13 es consistente con esta idea. Más aún, cabe la posibilidad de que los cambios observados en la fuerza sináptica y, en consecuencia, sobre los patrones de plasticidad de corto término, se deban a modificaciones en las proteínas que participan del proceso de liberación del neurotransmisor en los sitios activos. Una posibilidad es que ocurran cambios en aquellas proteínas que median la fusión vesicular en la presinapsis, algo que se ha descrito en el Calyx de Held, donde las isoformas de la proteína encargada de detectar el Ca^{2+} intracelular en los alrededores de las vesículas presinápticas, la sinaptotagmina, cambian durante el desarrollo postnatal (Kochubey et al., 2016). Alternativamente,

durante el desarrollo podrían ocurrir cambios en las proteínas que controlan el funcionamiento de los CCDVs. De hecho, se sabe que los canales P/Q, presentes en la sinapsis MOC-CCE en ambos estadios del desarrollo analizados en este trabajo (**Figura 28**), pueden contribuir a mecanismos de facilitación o depresión de corto término, según qué proteínas regulatorias se asocien a éstos en el terminal presináptico (Nanou y Catterall, 2018). Por último, también se ha demostrado que el número de CCDVs que se expresan en los terminales presinápticos puede ser determinante en la fuerza sináptica y por ende en las propiedades de facilitación (Sheng et al., 2012). En suma, todos estos mecanismos podrían estar involucrados en los eventos aquí descritos para la sinapsis MOC-CCE, a lo largo del desarrollo postnatal.

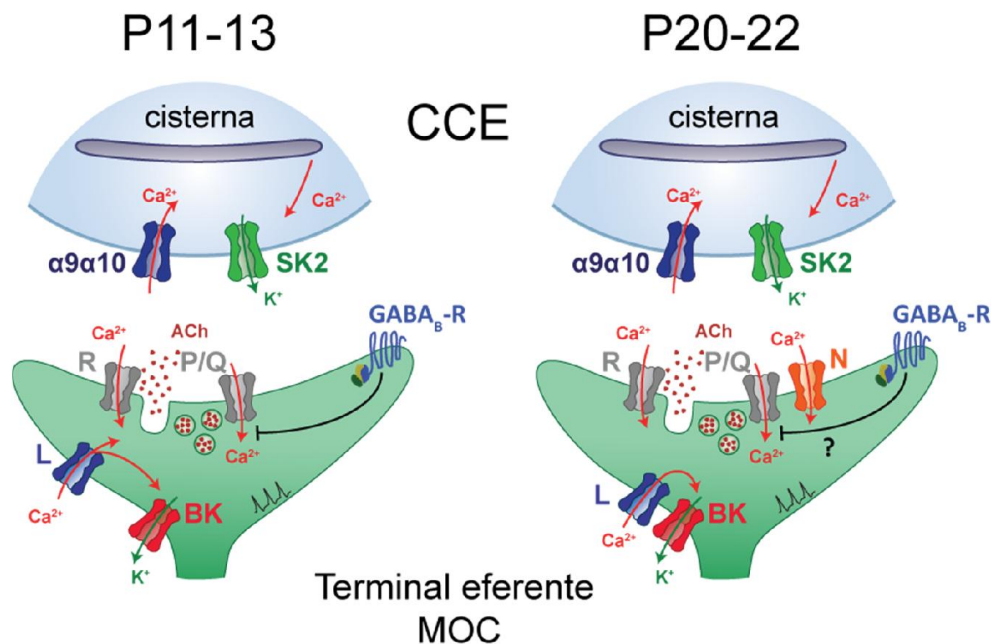


Figura 28 | Esquema de los cambios que tienen lugar en el terminal presináptico MOC durante el desarrollo postnatal.

Además del análisis de las propiedades de la transmisión sináptica, en este Capítulo también se estudiaron las propiedades biofísicas de las CCEs. Durante la primera semana de desarrollo postnatal, las CCEs tienen la capacidad de disparar potenciales de acción, habilidad que pierden de forma concomitante con el surgimiento, en P8, de una corriente de K^+ mediada por canales KCNQ4 que determina un corrimiento del potencial de membrana a valores más hiperpolarizados y que perdura hasta la madurez auditiva (Marcotti y Kros, 1999). Estas evidencias son consistentes con el hecho de

que el potencial de membrana de las CCEs se mantenga constante entre los dos períodos de desarrollo postnatal estudiados, dado que son posteriores a P8. Por otro lado, la capacitancia de membrana de las CCEs aumenta entre P11-13 y P20-22, mientras que la resistencia de membrana disminuye. Considerando que la capacitancia aumenta junto con la superficie de la membrana, esta observación es consistente con aquellas evidencias que demostraron un aumento de tamaño de las CCEs durante el desarrollo postnatal (Marcotti y Kros, 1999; Oliver y Fakler, 1999). Asumiendo que la densidad de canales iónicos no disminuye con un aumento de tamaño celular, resulta lógico que un aumento de la capacitancia conlleve una disminución en la resistencia de la membrana, debido a una mayor cantidad total de canales iónicos. Si bien para el primer estadio del desarrollo analizado aquí las CCEs ya no poseen la capacidad de disparar potenciales de acción, el hecho de que la resistencia de membrana siga disminuyendo con el paso de los días es consistente con la pérdida de esta capacidad (Wang et al., 1994).

El hecho de que los tipos de CCDVs que participan de la liberación de ACh varíen durante el desarrollo postnatal (**Figura 28**) es consistente con lo que se ha reportado en la placa neuromuscular (Rosato Siri y Uchitel, 1999) y también en algunas sinapsis del SNC (Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000; Momiyama, 2003; Fedchyshyn y Wang, 2005). Sin embargo, resulta llamativo el hecho de que, contrariamente a lo que ocurre en estas sinapsis, durante el desarrollo postnatal de las fibras MOC-CCE los CCDVs de tipo P/Q contribuyen a la liberación del neurotransmisor previamente a la participación de los de tipo N en dicho proceso, algo que también se observó en la sinapsis transitoria MOC-CCI (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019). El hecho de que la contribución de los CCDVs de tipo P/Q persista en ambos tipos de sinapsis eferentes es consistente con la idea de que los canales P/Q se encuentren más eficientemente acoplados a la liberación que el resto de los CCDVs, algo que fue reportado en otras sinapsis anteriormente (Rosato Siri y Uchitel, 1999; Wu et al., 1999). Por otra parte, se ha descrito una contribución diferencial de los CCDVs de tipo P/Q y N sobre la plasticidad de corto término (Yamamoto y Kobayashi, 2018). Estos resultados fueron observados en sinapsis GABAérgicas corticales, donde los CCDVs de tipo P/Q se encuentran mediando principalmente mecanismos de facilitación, mientras que los N participan más activamente del proceso de depresión de corto término. En la sinapsis MOC-CCE, los mecanismos de facilitación desaparecen conforme avanza

la edad postnatal, y esto es concomitante con el comienzo de la expresión de los CCDVs de tipo N, por lo que podría ocurrir que la presencia de estos canales resulte en un efecto compensatorio sobre la facilitación de corto término mediada por los CCDVs de tipo P/Q, cuya expresión persiste. Del mismo modo, los cambios en los patrones de plasticidad observados en el Calyx de Held pueden tener un origen similar, especialmente considerando que, durante el desarrollo, estos terminales presinápticos sufren un incremento en la expresión de los canales P/Q, de la mano de una disminución en los N, y que este proceso se ve acompañado por una reducción en la depresión de corto término (Iwasaki y Takahashi, 1998, 2001; Iwasaki et al., 2000; Taschenberger y von Gersdorff, 2000).

Resulta interesante el hecho de que los cambios observados a nivel de los CCDVs que sostienen la liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCE (**Figura 28**) sean muy similares a los que fueran descritos para la sinapsis transitoria MOC-CCI entre P4-7 y P9-11 (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019). Estas similitudes, junto a las observadas en la evolución de los patrones de plasticidad de corto término, avalan firmemente la idea de que la inervación transitoria MOC sobre las CCIs tiene el mismo origen que la inervación eferente definitiva sobre las CCEs (Simmons et al., 1996). A pesar del hipotético origen común de ambas inervaciones eferentes, una diferencia notable entre ambas sinapsis radica en la contribución de los CCDVs de tipo R durante los estadios de desarrollo postnatal analizados en cada caso. En la sinapsis MOC-CCI, la liberación de ACh está mediada por los CCDVs de tipo P/Q y R durante el desarrollo postnatal temprano, mientras que, si bien los P/Q permanecen hasta P9-11, los CCDVs de tipo R son remplazados por los de tipo N. En la sinapsis MOC-CCE, en cambio, los canales de tipo R estarían mediando la liberación de ACh en estadios de madurez auditiva. Estos resultados en las sinapsis MOC-CCE coinciden con evidencias previas mostrando la presencia de estos canales en el órgano de Corti, luego del comienzo de la audición, por técnicas de RT-PCR (Green et al., 1996), así como su localización en la zona basal de las CCEs, mediante inmunohistoquímica (Waka et al., 2003). Más aún, en sinapsis GABAérgicas del hipocampo se ha demostrado que los CCDVs de tipo R son importantes durante la actividad sináptica de alta frecuencia (Ricoy y Frerking, 2014). Esto podría ser de particular relevancia en la sinapsis MOC-CCE debido a la característica distintiva de las fibras MOC de disparar potenciales de acción a altas frecuencias en función del aumento en la intensidad de sonido (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987; Brown, 1989). Más aún, esta

capacidad estaría directamente vinculada con la capacidad del sistema eferente de regular la ganancia del sistema auditivo, siendo fundamental en la protección del oído frente al trauma acústico inducido por sonidos de alta intensidad (Liberman, 1991; Rajan, 2000; Maison et al., 2002). Por esta razón, la presencia de estos CCDVs en los terminales MOC podría ser determinante para el correcto funcionamiento de la sinapsis eferente y su función protectora. Por su parte, la presencia de los CCDVs de tipo P/Q en el sistema auditivo periférico también fue demostrada por técnicas de transcriptómica (Gabashvili et al., 2007). Si bien las sinapsis eferentes MOC sobre las CCIs y las CCEs comparten el perfil de desarrollo, es necesario recordar que la primera es una sinapsis transitoria que, más allá de su relevancia para el correcto desarrollo del sistema aferente, la misma desaparece justo en el momento del comienzo de la audición, en tanto que la sinapsis MOC-CCE perdura en los animales adultos, de manera que es factible que ciertos mecanismos sean diferentes en cada una de ellas.

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de los CCDVs de tipo L y los canales BK sobre la transmisión sináptica muestran que la acción combinada de estos canales modifica la fuerza sináptica en los terminales MOC, en ambos estadios del desarrollo postnatal estudiados. Sin embargo, en el estadio más temprano, los CCDVs de tipo L pueden tener un efecto dual (**Figura 28**): por un lado, al igual que en muchas otras sinapsis pueden aportar Ca^{2+} para la activación de los canales BK (Roberts et al., 1990; Robitaille y Charlton, 1992; Robitaille et al., 1993; Marrion y Tavalin, 1998; Grunnet y Kaufmann, 2004; Raffaelli et al., 2004; Womack et al., 2004; Deng et al., 2013; Vivas et al., 2017), y por otro, en particular frente a la presencia de un agonista que aumenta el tiempo de apertura de los mismos (Hess et al., 1984), pueden contribuir a la liberación de ACh. Estos resultados, sumados a los experimentos realizados con el quelante de Ca^{2+} lento en ambos estadios, permiten plantear la idea de que, durante el desarrollo postnatal de la sinapsis MOC-CCE, los componentes que forman parte de la liberación de ACh en los terminales MOC están sujetos a un incremento en la compartimentalización. Evidencias de este tipo han sido obtenidas en sinapsis centrales, donde además se ha observado que estos cambios, de manera similar a lo que ocurre en la sinapsis MOC-CCE, conllevan un aumento en la fuerza sináptica con consecuentes modificaciones en los patrones de plasticidad de corto término (Taschenberger y von Gersdorff, 2000; Taschenberger et al., 2002; Fedchyshyn y Wang, 2005; Baur et al., 2015; Nakamura et al., 2015). Más aún, resultados similares fueron descritos recientemente por

nuestro laboratorio en la sinapsis transitoria MOC-CCI (Zorrilla de San Martín et al., 2010; Kearney et al., 2019), reforzando nuevamente la idea de que las fibras MOC inervan en primer lugar las CCIs, para luego alcanzar su destino final sobre las CCEs (Simmons et al., 1996; Simmons, 2002).

Junto al incremento en la compartimentalización presináptica en el Calyx de Held durante la maduración de los terminales, también ocurre una reducción en la duración de los potenciales de acción presinápticos responsables de la liberación de glutamato (Fedchyshyn y Wang, 2005). En conjuntos, estos cambios son determinantes para regular la fuerza sináptica y sus patrones de plasticidad de corto término (Taschenberger y von Gersdorff, 2000; Iwasaki y Takahashi, 2001; Taschenberger et al., 2002; Fedchyshyn y Wang, 2005). Nuestros resultados sugieren modificaciones en el grado de compartimentalización presináptica de los terminales MOC, y en particular sobre la distancia entre los CCDVs de tipo L y los canales de K^+ BK. Teniendo en cuenta que los canales BK presinápticos pueden intervenir en la repolarización de los potenciales de acción y alterar la forma de los mismos (Adams et al., 1982; Storm, 1987), es posible suponer que los cambios en la distancia entre éstos y su fuente de Ca^{2+} durante del desarrollo postnatal puedan impactar en la duración de los potenciales de acción. Si bien debido a la dificultad experimental de registrar los terminales MOC no fue posible estudiar el efecto de los canales BK sobre la forma del potencial de acción durante el desarrollo postnatal, los pocos registros obtenidos a P11-13 resultaron similares a los de neuronas MOC de la misma edad, pero a nivel del soma en el tallo cerebral (Fujino et al., 1997). De hecho, la duración de los mismos (~10 ms) resulta un poco mayor que las duraciones típicamente descritas para potenciales de acción neuronales en animales adultos, avalando la idea de que en el desarrollo podrían acortar su duración producto del aumento de la compartimentalización de los componentes presinápticos, incluidos los canales BK. Una de las razones por las cuales estos registros resultaron muy poco reproducibles podría ser, por ejemplo, una baja densidad de canales de Na^+ , lo que por un lado sería consistente con nuestra observación de las pequeñas amplitudes de estas corrientes, y por otro dificultaría la obtención de potenciales de acción. Además, podría existir una variabilidad intrínseca en la morfología de estas fibras, ya que si bien se sabe que están mielinizadas, se desconoce la distancia entre el terminal y el último nodo de Ranvier, y de existir variabilidad en este parámetro podrían encontrarse diferencias en las propiedades electrofisiológicas. En cualquier caso, resultará determinante a futuro desentrañar las razones que

impiden la obtención de registros fidedignos sobre estos terminales, ya que sus estudio aportará resultados seguramente novedosos.

Existen múltiples evidencias que señalan la presencia presináptica de los canales BK como factor determinante para las propiedades de la transmisión sináptica, especialmente en sinapsis que trabajan a altas frecuencias (Hu et al., 2001; Klyachko et al., 2001; Gu et al., 2007). En este sentido, es importante destacar que, a pesar de la menor compartimentalización sugerida por nuestros experimentos en la sinapsis MOC-CCE a P11-13 (**Figura 28**), el rol de los canales BK a nivel presináptico en este estadio parece ser determinante para darle forma a la respuesta postsináptica en las CCEs. Si bien nuestros resultados sugieren que durante el desarrollo ocurren variaciones en la distancia entre los canales BK y sus fuentes de Ca^{2+} , no podemos descartar que las diferencias observadas también se deban a cambios sobre las subunidades regulatorias de estos canales (Latorre et al., 2017). Este tipo de modificaciones podrían alterar tanto su sensibilidad al Ca^{2+} intracelular como las propiedades de apertura de la subunidad que forma el poro del canal.

La modulación negativa de la liberación de ACh por $GABA_B$ -Rs presinápticos, tanto en la sinapsis MOC-CCI como en la MOC-CCE, había sido descrita previamente por nuestro laboratorio (Wedemeyer et al., 2013). Más aún, en dicho trabajo se comprobó la ausencia de un efecto directo del GABA sobre las células postsinápticas, aunque existe un reporte que sugiere la presencia de receptores ionotrópicos $GABA_A$ en CCEs (Gitter y Zenner, 1992). Sin embargo, los experimentos realizados en ese trabajo corresponden CCEs aisladas de individuos adultos de conejillos de India, lo que podría explicar las discrepancias con los resultados de nuestro laboratorio, realizados en CCEs de ratones alrededor del comienzo de la audición. En este trabajo de Tesis mostramos además que, tal como sucede en la sinapsis MOC-CCI (Wedemeyer et al., 2013), esta modulación actúa sobre los CCDVs de tipo P/Q en terminales MOC correspondientes a ratones de edad P11-13 (**Figura 28**).

Al igual que lo que ocurre con los canales BK, este tipo de modulación puede ser importante para darle forma a la transmisión sináptica. En particular, se ha demostrado que $GABA_B$ -Rs presinápticos pueden regular el tamaño del RRP, ya que éste es sensible a mecanismos regulatorios sobre la entrada

de Ca^{2+} a los terminales presinápticos durante un potencial de acción (Thanawala y Regehr, 2013). Sin embargo, en este trabajo hemos encontrado que la regulación mediada por GABA se mantiene hasta una etapa en la cual el sistema auditivo ya ha madurado (**Figura 28**), aunque no hemos demostrado si su acción inhibitoria sobre la liberación de ACh es a través de los CCDVs de tipo P/Q, como ocurre al comienzo de la audición. Si este fuera el caso, tendría sentido pensar que la regulación sobre la transmisión sináptica a través de los GABA_B -Rs es estable durante el desarrollo postnatal y no influye sobre los cambios en la fuerza sináptica aquí descritos. La descripción de una modulación por GABA_B -Rs se contradice, sin embargo, con evidencias que sugieren que, en el órgano de Corti de roedores adultos (6-8 semanas), no hay inmunoreactividad por GABA (Maison et al., 2008). No obstante, las técnicas inmunohistoquímicas son menos sensibles que las electrofisiológicas aquí empleadas, por lo que podría ocurrir que en dicho trabajo no hayan detectado el neurotransmisor aunque esté allí. Alternativamente, podría pensarse que P20-22, el estadio de mayor madurez estudiado aquí, es un estadio intermedio entre el comienzo de la audición, donde la presencia de los GABA_B -Rs es muy clara, y la madurez completa del sistema.

Por último, si bien la ACh sería el neurotransmisor predominante en las fibras MOC, se ha sugerido la posibilidad de que otros neurotransmisores y neuropéptidos también sean liberados por estos terminales (Eybalin, 1993). En particular, el GABA y el CGRP han sido los más estudiados (Maison et al., 2003a, 2003b, 2006, 2008). Cabe destacar que hasta el momento no se han descrito otras fibras eferentes distintas de las MOC llegando a la región de las CCEs, de manera que resulta lógico considerar la posibilidad de que exista co-liberación de ACh y GABA desde las fibras MOC. Aunque esto no se ha demostrado aún en la sinapsis MOC-CCE, se han descrito procesos de co-liberación en otras preparaciones, como por ejemplo en la sinapsis entre neuronas que proyectan desde la *substantia nigra* hacia el cuerpo estriado dorsal (Tritsch et al., 2012), así como entre neuronas ubicadas en el cerebro anterior que proyectan hacia la capa más superficial de la corteza (Saunders et al., 2015), y también, más recientemente, en células cromafines (Zhang et al., 2019).

La regulación presináptica mediada por GABA liberado desde el mismo terminal difiere de otro mecanismo regulatorio descrito sobre los terminales MOC que contactan a las CCI durante el

desarrollo postnatal. En este caso, el glutamato liberado desde las sinapsis en cinta impacta, no sólo sobre receptores de tipo AMPA en las NGEs de tipo I, sino también sobre receptores metabotrópicos de tipo mGluR1 presentes en los terminales MOC, aumentando la liberación de ACh (Ye et al., 2017). Aún resta determinar si algo similar podría ocurrir en las sinapsis MOC-CCE, aunque la fuente de glutamato provista por las sinapsis en cinta de las CCEs podría ser insuficiente, dada la baja eficiencia de liberación descrita en ellas (Weisz et al., 2014).

Capítulo II - Efecto de una mutación puntual en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ sobre las propiedades funcionales de la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las células ciliadas externas

II. Introducción

El sistema eferente olivococlear, a través de la actividad colinérgica de las fibras MOC, modula la actividad de las CCEs y reduce la ganancia del sistema auditivo al inhibir el proceso de amplificación coclear (Kujawa et al., 1994; Guinan Jr., 2006; Fuchs y Lauer, 2018). La fuerza de esta inhibición varía proporcionalmente con la actividad de las fibras MOC, que a su vez depende de la intensidad de sonido a la que esté expuesto el sistema (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987; Brown, 1989). Por esta razón, este mecanismo de control es de particular relevancia durante la exposición del sistema auditivo a sonidos de intensidad elevada, ya que puede brindar protección frente al trauma acústico (Liberman, 1991; Rajan, 2000; Maison et al., 2002).

El nAChR $\alpha 9\alpha 10$ que media la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs pertenece, como todos los nAChRs, a la superfamilia de receptores pentaméricos activados por ligando (Corringer et al., 2012), que están formados por cinco subunidades dispuestas simétricamente alrededor de un poro central, que conforma el canal iónico. Cada subunidad presenta un dominio extracelular conformado por la porción amino-terminal, un dominio transmembrana compuesto por cuatro pasos transmembrana (TM), siendo el TM2 el que tapiza el poro del canal, y un dominio intracelular entre los pasos TM3 y TM4. Para profundizar en la comprensión de la importancia del sistema eferente en la protección contra el trauma acústico, en nuestro laboratorio se desarrolló un ratón modificado genéticamente con una mutación puntual en la subunidad $\alpha 9$ del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Taranda et al., 2009). Esta mutación consiste en la sustitución de una leucina por una treonina en la posición 9' (L9'T) del segundo TM2 de dicha subunidad, y fue previamente caracterizada mediante el uso de un sistema heterólogo (Plazas et al., 2005a). A través de su expresión en oocitos de *Xenopus laevis* seguida del estudio por canal único con la técnica de *patch-clamp*, se determinó que los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ con la mutación L9'T presentan aperturas espontáneas y un aumento en el tiempo de apertura aparente del canal sin cambios en la conductancia del mismo, lo que sugiere que la mutación L9'T afecta el mecanismo de gatillado del canal. Esto se evidencia en una menor tasa de desensibilización de los mismos, tanto para ACh como para agonistas parciales.

Experimentos en la sinapsis transitoria MOC-CCI de ratones con el receptor mutado en homocigosis (de aquí en más llamados *L9'T* o *knock-in*) determinaron que esta mutación le confiere al nAChR una ganancia de función a partir de corrientes sinápticas más prolongadas en las CCIs (Taranda et al., 2009) en respuesta a la aplicación aguda de ACh. Esto implica una mayor resistencia de los ratones *L9'T* al trauma acústico en respuesta a sonidos de alta intensidad, lo que se explica a partir de un aumento en la supresión de la amplificación coclear mediada por las CCEs y consecuentemente una menor pérdida de sinapsis aferentes en las CCIs (Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018). Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que en la sinapsis MOC-CCE la facilitación de origen presináptico junto a fenómenos de sumación postsináptica son determinantes del mecanismo inhibitorio que las fibras MOC ejercen sobre las CCEs (Ballesteros et al., 2011). Esto es algo que podría tener particular relevancia en los ratones *L9'T*, ya que en diversas sinapsis, la tasa de desensibilización de los receptores postsinápticos puede afectar los patrones de plasticidad de corto término (Jones y Westbrook, 1996; Wong et al., 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, hipotetizamos que la presencia de esta mutación puntual en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$, que le confiere al mismo una ganancia de función, podría afectar la dinámica de la sinapsis MOC-CCE y en consecuencia ser determinante en la respuesta inhibitoria exacerbada que presentan los ratones *L9'T*. Por estas razones, esta parte de la Tesis consistió en investigar la funcionalidad de la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T*, en el período de desarrollo postnatal comprendido alrededor del comienzo de la audición, es decir, a P11-13. Esta parte del trabajo se desarrolló haciendo particular hincapié en los fenómenos de plasticidad de corto término, y sus consecuencias sobre la actividad de las CCEs.

II. Resultados

Propiedades de la transmisión sináptica entre las fibras MOC y las CCEs de ratones *L9'T*.

En primer lugar, se caracterizaron las corrientes sinápticas evocadas en las CCEs de ratones *knock-in* (*L9'T*) y salvajes (*wild-type* o *wt*, por sus siglas en inglés), a P11-13, en respuesta a la estimulación eléctrica de 1 Hz sobre las fibras MOC, manteniendo a las CCEs con un $V_s = -40$ mV. Las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (eIPSCs por sus siglas en inglés, *evoked inhibitory postsynaptic currents*) obtenidas en CCEs de animales *L9'T* fueron significativamente más prolongadas que las de los animales *wt*, algo que se evidenció en la cinética de las fases de crecimiento y decaimiento de la respuesta reportadas por el $\tau_{\text{crecimiento}}$ y el $\tau_{\text{decaimiento}}$, respectivamente (**Figura 29A, Tabla VI**; $\tau_{\text{crecimiento}}$, $p = 0.0005$, y $\tau_{\text{decaimiento}}$, $p = 0.0037$, entre ambos genotipos), así como en el ancho medio de las eIPSCs (**Figura 29A, Tabla VI**, $p = 0.0001$ entre *L9'T* y *wt*). Las eIPSCs de ratones *L9'T* presentaron además una menor amplitud en el pico de la respuesta, en comparación con los *wt* (**Figura 29A, Tabla VI**; $p = 0.0008$), de manera similar a lo reportado previamente en la sinapsis MOC-CCI (Taranda et al.,

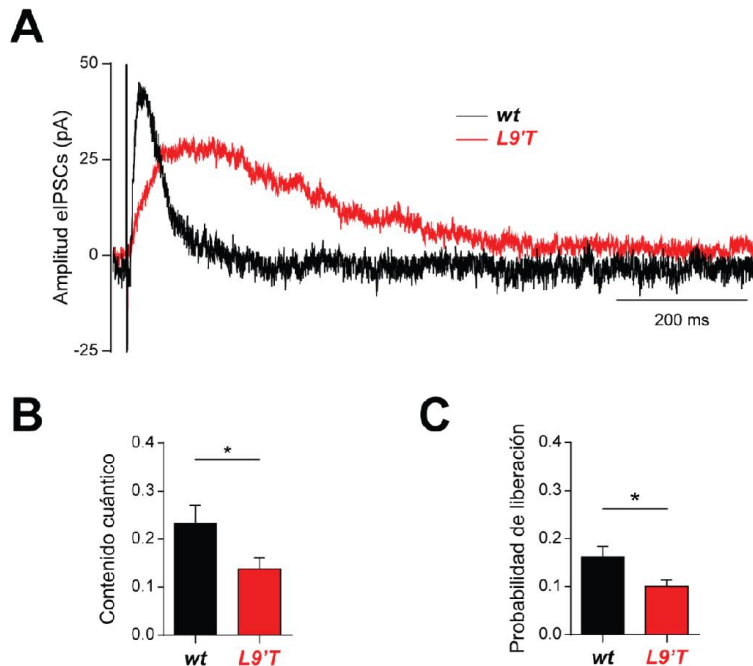


Figura 29 | Corrientes sinápticas y contenido cuántico en la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* y *wt*.

A, Trazos representativos de eIPSCs en respuesta a la estimulación eléctrica de las fibras MOC en ratones *knock-in* para la mutación *L9'T* (rojo) y ratones *wt* (negro). $V_s = -40$ mV. **B**, Estimación del contenido cuántico de la sinapsis MOC-CCE de ratones *wt* ($n = 12$) y *L9'T* ($n = 15$). **C**, Probabilidad de liberación, calculada como número de eventos exitosos sobre el total de rondas de estimulación ($n = 43$ para ambos genotipos). Para la estimación de la probabilidad de liberación se utilizaron los datos correspondientes a experimentos de 1 Hz y también los de experimentos de pulsos pareados y trenes de 10 pulsos de estimulación que se mostrarán a lo largo de este Capítulo, para los cuales se tomó en cuenta la respuesta al primer pulso únicamente. En **B** y **C**, prueba de t no pareada; $*p < 0.05$.

2009). La respuesta de la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* resultó más lenta y por ende más sostenida en el tiempo que la de los *wt*, razón por la cual la transferencia de carga (Q) de dichas respuestas, medida como el área correspondiente a cada evento sináptico, o eIPSC, fue mayor en ratones *knock-in*, en comparación a ratones *wt* (**Figura 29A, Tabla VI**; $p = 0.04$).

Tabla VI | Propiedades de las corrientes en CCEs de ratones *L9'T* y *wt*.

$V_s = -40$ mV. Prueba de *t* no pareada o prueba de Kolmogorov-Smirnov; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Genotipo:	<i>wt</i> (n = 12)	<i>L9'T</i> (n = 15)
Amplitud eIPSCs (pA)	42.3 ± 4.3	21.9 ± 2.8***
$\tau_{\text{crecimiento}}$ (ms) (20-80%)	8.5 ± 0.4	51.5 ± 6.7***
$\tau_{\text{decaimiento}}$ (ms) (10-90%)	55.2 ± 7.4	166.7 ± 21.5**
Ancho medio (ms)	48.5 ± 2.7	150.3 ± 18.8***
Q (pC)	2.3 ± 0.32	3.23 ± 0.39*

Además, al medir el contenido cuántico (m) de la liberación evocada en la sinapsis MOC-CCE para ambos genotipos, se encontró que los ratones *L9'T* presentaban una reducción en dicho parámetro, en comparación a los *wt* (**Figura 29B**; $m_{wt} = 0.23 \pm 0.04$, y $m_{L9'T} = 0.14 \pm 0.02$, $p = 0.035$), y que esto se asociaba a una disminución en la probabilidad de liberación (P) inicial (**Figura 29C**; $P_{wt} = 0.16 \pm 0.02$, y $P_{L9'T} = 0.10 \pm 0.01$, $p = 0.02$). Esta reducción en la fuerza sináptica sugiere que una mutación puntual a nivel del nAChR postsináptico involucrado en la respuesta inhibitoria del sistema MOC no solo alteró las propiedades de la respuesta postsináptica, sino que además pudo haber introducido modificaciones a nivel del terminal presináptico durante el desarrollo postnatal, determinando una menor liberación de vesículas de ACh ante la llegada de un potencial de acción.

Plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T*.

Los parámetros cinéticos de las eIPSCs descritos en la sección previa están vinculados a factores postsinápticos, ya que la dinámica de la corriente medida en las CCEs está determinada por las propiedades del acople funcional entre los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y los canales SK2 (Oliver et al., 2000; Ballesteros et al., 2011; Elgoyhen y Katz, 2012). Sin embargo, la diferencia observada en el contenido

cuántico entre ratones *L9'T* y *wt* sugiere la posibilidad de que la mutación *L9'T* hubiese inducido cambios a nivel presináptico durante el desarrollo postnatal. Para investigar esta hipótesis, se analizó la plasticidad de corto término de la sinapsis MOC-CCE en ambos genotipos.

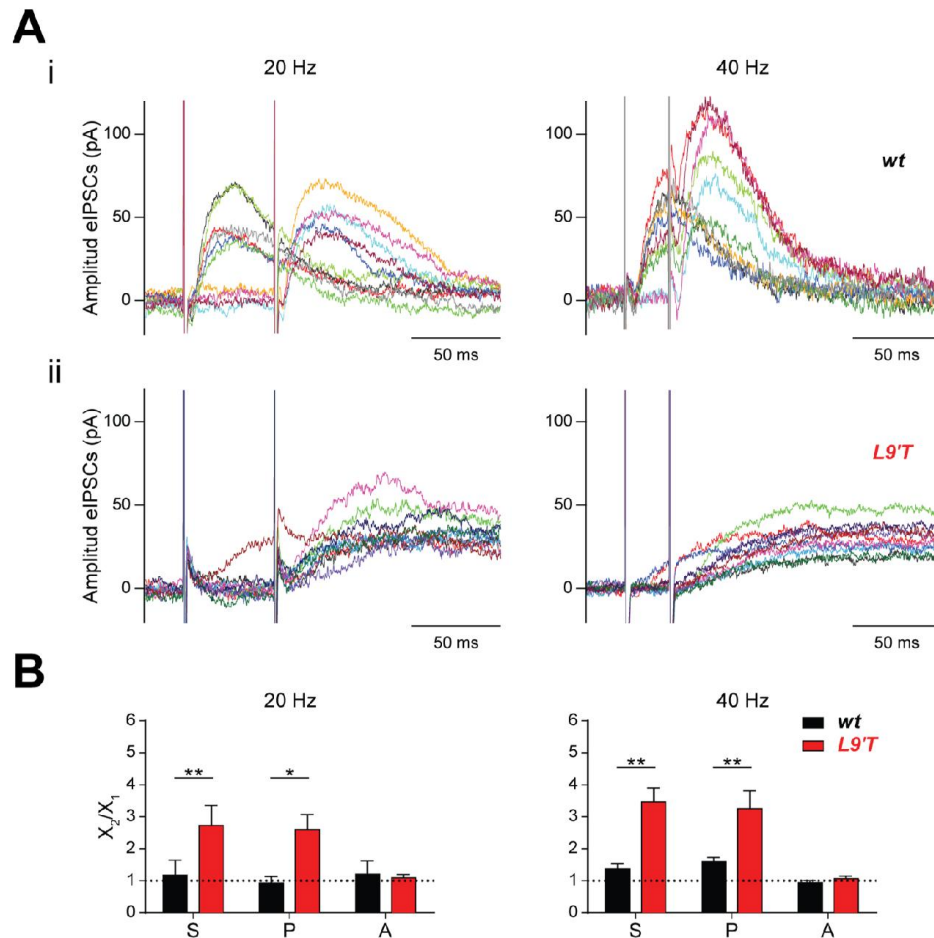


Figura 30 | Plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* y *wt*.

A, Trazos representativos de corriente en respuesta a protocolos de estimulación de pulsos pareados a 20 Hz y 40 Hz (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Se muestran 10 trazos individuales para ratones *wt* (**i**) y *L9'T* (**ii**), y para cada frecuencia de estimulación empleada. Las distintas eIPSCs están representadas por distintos colores para facilitar su reconocimiento. $V_s = -40$ mV. **B**, Comparación del IF_x , definido como la fracción X_2/X_1 , entre ratones *wt* (negro) y *L9'T* (rojo). Se calculó el IF_x para la respuesta postsináptica promedio (S; IF_S), la probabilidad de éxito en la liberación de neurotransmisor (P; IF_P) y la amplitud de eventos postsinápticos exitosos (A; IF_A), a 20 Hz y 40 Hz (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Para ambos genotipos se encontró que IF_S e IF_P varían conjuntamente en función de la frecuencia: en ratones *wt* se encontraron $IF_S > 1$ e $IF_P > 1$ únicamente al estimular las fibras MOC con 40 Hz (20 Hz, $n = 4$; 40 Hz, $n = 6$), mientras que en ratones *L9'T* se obtuvieron $IF_S > 1$ e $IF_P > 1$ para las dos frecuencias de estimulación (20 Hz, $n = 7$; 40 Hz, $n = 8$). Para ambas frecuencias se encontraron diferencias significativas en los IF_S e IF_P de ambos genotipos, siendo la facilitación de la sinapsis MOC-CCE de animales *L9'T* siempre mayor a la calculada para los *wt*. Prueba de Kolmogorov-Smirnov; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Al igual que en el Capítulo I, se utilizó el cálculo del IF a partir de protocolos de pulsos pareados como estimador de la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE. En consistencia con los resultados del Capítulo I y con estudios previos del laboratorio (Ballester et al., 2011), se encontró que la sinapsis MOC-CCE de ratones *wt* presentaba el mismo patrón de plasticidad de corto término previamente observado en animales de P11-13. En consecuencia, el IF_S no difirió significativamente de 1 al estimular las fibras MOC a una frecuencia de 20 Hz, mientras que al hacerlo a 40 Hz se obtuvo un $IF_S > 1$ (**Figura 30A-i y B, Tabla VII**; IF_S : 20 Hz, $p = 0.63$; 40 Hz, $p = 0.031$). En cambio, al analizar el comportamiento de la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T*, se observó un $IF_S > 1$ en respuesta a las dos frecuencias de estimulación estudiadas (**Figura 30A-ii y B, Tabla VII**; IF_S : 20 Hz, $p = 0.016$; 40 Hz, $p = 0.008$), y se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos, para ambas frecuencias de estimulación (**Figura 30B**; S_2/S_{1-wt} vs $S_2/S_{1-L9'T}$: 20 Hz, $p = 0.0061$; 40 Hz, $p = 0.0047$). A continuación,

Tabla VII | Cálculo de $IF_x = X_2/X_1$, para S, P y A, a 20 Hz y 40 Hz, en animales *L9'T* y *wt*.
 $V_S = -40$ mV. Prueba de *t* pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Genotipo:	<i>wt</i> (n = 4-6)			<i>L9'T</i> (n = 7-8)		
	$IF_S = S_2/S_1$	$IF_P = P_2/P_1$	$IF_A = A_2/A_1$	$IF_S = S_2/S_1$	$IF_P = P_2/P_1$	$IF_A = A_2/A_1$
20 Hz	1.00 ± 0.08	0.93 ± 0.21	1.21 ± 0.41	2.87 ± 0.58*	2.60 ± 0.47*	1.09 ± 0.10
40 Hz	1.37 ± 0.16*	1.59 ± 0.13**	0.94 ± 0.07	3.47 ± 0.44**	3.25 ± 0.56*	1.08 ± 0.08

siguiendo el razonamiento del Capítulo I, se estimó el IF para la probabilidad de liberación y la amplitud de eIPSCs exitosas (IF_P e IF_A , respectivamente). El patrón de IF_P observado coincide con el de IF_S para ambos genotipos, es decir que en el *wt* se observó un $IF_P > 1$ únicamente en respuesta a la estimulación de las fibras MOC mediante un protocolo de doble pulso a 40 Hz (**Figura 30B, Tabla VII**; *wt*, IF_P : 20 Hz, $p = 0.75$; 40 Hz, $p = 0.003$), mientras que en animales *knock-in* se obtuvo un $IF_P > 1$ para las dos frecuencias evaluadas (**Figura 30B, Tabla VII**; *L9'T*, IF_P : 20 Hz, $p = 0.016$; 40 Hz, $p = 0.016$). Por el contrario, los valores de IF_A obtenidos para ambos genotipos frente a las dos frecuencias de estimulación empleadas no fueron significativamente distintos de 1 (**Figura 30B, Tabla VII**; *wt*, IF_A : 20 Hz, $p = 0.88$, y 40 Hz, $p = 0.07$; *L9'T*, IF_A : 20 Hz, $p = 0.52$, y 40 Hz, $p = 0.89$). Finalmente, se evaluó si los IF_P e IF_A calculados difieren entre ambos genotipos, y se encontró un IF_P significativamente mayor en animales *L9'T* en comparación a los *wt*, mientras que el IF_A no difirió significativamente entre ellos (**Figura 30B**; P_2/P_{1-wt} vs $P_2/P_{1-L9'T}$: 20 Hz, $p = 0.0303$, y 40 Hz, $p = 0.0047$; A_2/A_{1-wt} vs $A_2/A_{1-L9'T}$: 20 Hz, $p =$

0.2121, y 40 Hz, $p = 0.3763$). Estos resultados permiten concluir que la sinapsis MOC-CCE de ratones *knock-in* está sujeta a un fenómeno de facilitación de corto término más pronunciado que el de los animales *wt*. Además, sugieren que el origen de este fenómeno se encuentra a nivel presináptico, ya que los cambios en el IF_S concuerdan con los cambios en el IF_P , pero no con el patrón observado para el IF_A .

En los experimentos de la **Figura 30**, las respuestas sinápticas fueron medidas a un $V_S = -40$ mV. A este valor de potencial la respuesta postsináptica está dominada por la cinética de los canales de K^+ SK2, que se activan en respuesta al Ca^{2+} entrante por los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ (Oliver et al., 2000). Además, la activación de los mismos puede a su vez estar parcialmente mediada por Ca^{2+} proveniente de la cisterna sinaptoplásmica cercana a al sitio de inervación de los terminales MOC (Lioudyno et al., 2004; Fuchs, 2014; Fuchs et al., 2014). Por estas razones y considerando que la dinámica de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ que presentan la mutación L9'T se encuentra alterada (Plazas et al., 2005a), se decidió profundizar en el estudio de la plasticidad de corto término previniendo la activación de los canales SK2. Para ello, se repitieron los experimentos de pulsos pareados en preparaciones del órgano de Corti de ratones L9'T, pero utilizando una solución de registro intracelular en la que el EGTA, *buffer* de Ca^{2+} comúnmente empleado para registrar células ciliadas, fue remplazado por BAPTA, un compuesto de similares características pero con una cinética de acción más rápida, debida a una constante de unión al Ca^{2+} 150 veces mayor que la del EGTA (Naraghi y Neher, 1997; Neher, 1998). De esta manera se puede prevenir que el Ca^{2+} proveniente del nAChR ejerza su efecto sobre los canales SK2, y también sobre la cisterna sinaptoplásmica. Además las eIPSCs fueron registradas a un $V_S = -82$ mV, valor correspondiente al E_{rev} del K^+ en las condiciones de trabajo utilizadas, de manera de evitar cualquier posible corriente de K^+ a través de los canales SK2. Estas dos estrategias permitieron minimizar la contribución de dichos canales a la respuesta postsináptica, dando lugar a respuestas principalmente mediadas por los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. En estas condiciones de trabajo, se procedió de la misma manera que se describió anteriormente: se llevaron a cabo experimentos de pulsos pareados estimulando las fibras MOC a 20 y 40 Hz, y se calcularon el IF_S , IF_P e IF_A . Las eIPSCs obtenidas en presencia de BAPTA intracelular fueron de amplitud muy pequeña, de entre 10 y 20 pA (**Figura 31A**), consistente con la corriente descrita para el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en ausencia de actividad de los canales SK2, tanto en la sinapsis MOC-CCI (Glowatzki y Fuchs,

2000), como en la MOC-CCE (Oliver et al., 2000). Al analizar la plasticidad de corto término, nuevamente obtuvimos valores de $IF_S > 1$ e $IF_P > 1$ para ambas frecuencias de estimulación (**Figura 31B, Tabla VIII**; IF_S : 20 Hz, $p = 0.031$, y 40 Hz, $p = 0.001$; IF_P : 20 Hz, $p = 0.031$, y 40 Hz, $p = 0.0003$), mientras que IF_A no fue significativamente distinto de 1 para ninguna de las dos (**Figura 31B, Tabla VIII**; IF_A : 20 Hz, $p = 0.84$, y 40 Hz, $p = 0.31$). Luego se compararon los IF_S obtenidos en presencia de BAPTA intracelular con aquellos calculados anteriormente utilizando EGTA para el mismo genotipo (**Figura 30**), y no se encontraron diferencias significativas en IF_S para ambas condiciones (**Figura 31B**; $L9^T$ en presencia de EGTA y BAPTA; 20 Hz, S_2/S_{1-EGTA} VS $S_2/S_{1-BAPTA}$: 20 Hz, $p = 0.43$, y 40 Hz, $p = 0.08$). De esta manera, se

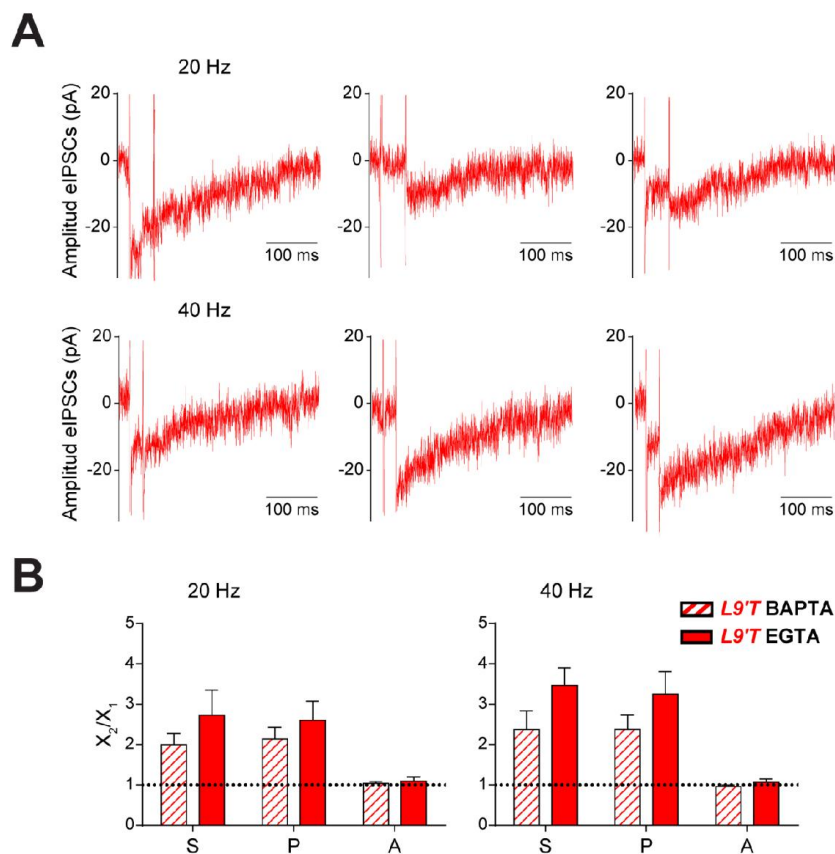


Figura 31 | Plasticidad de corto término de la sinapsis MOC-CCE en animales $L9^T$ en ausencia de actividad de los canales SK2.

A, Trazos representativos de corrientes sinápticas de ratones $L9^T$, obtenidos con BAPTA en la solución intracelular en lugar de EGTA, a 20 Hz (panel superior) y 40 Hz (panel inferior). Se muestran tres trazos individuales para cada frecuencia, en los que se ven respuestas sinápticas frente al primer (izquierda) o segundo pulso (medio) únicamente, así como frente a los dos pulsos de estimulación (derecha). $V_s = -82$ mV. **B**, Comparación de los IF_S , IF_P e IF_A en presencia de BAPTA intracelular para la sinapsis MOC-CCE de ratones $L9^T$, a 20 Hz y 40 Hz (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Con fines comparativos, se muestran también los datos presentados en la **Figura 30** correspondientes a registros electrofisiológicos con EGTA intracelular para el mismo genotipo (BAPTA, barras rayadas: 20 Hz, $n = 6$, y 40 Hz, $n = 8$; EGTA, barras llenas: 20 Hz, $n = 7$, y 40 Hz, $n = 8$). Prueba de Kolmogorov-Smirnov; no se encontraron diferencias significativas entre ambas

confirmó que la facilitación de corto término exacerbada en la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* se debe exclusivamente a un mecanismo presináptico.

Tabla VIII | Cálculo de $IF_x = X_2/X_1$ para la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T*, con BAPTA en el electrodo de registro intracelular.

$V_s = -82$ mV. Prueba de *t* pareada o prueba de rangos de Wilcoxon; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Genotipo:	<i>L9'T</i> (n = 6-8) BAPTA		
	$IF_S = S_2/S_1$	$IF_P = P_2/P_1$	$IF_A = A_2/A_1$
20 Hz	$2.00 \pm 0.25^*$	$2.15 \pm 0.28^*$	1.04 ± 0.04
40 Hz	$2.38 \pm 0.46^{**}$	$2.38 \pm 0.46^{***}$	0.95 ± 0.03

Los protocolos de pulsos pareados son una herramienta clásica a la hora de evaluar la plasticidad sináptica de corto término, y si bien dan excelentes resultados, no representan el comportamiento de las neuronas en situaciones fisiológicas. Con el fin de obtener algo más de información sobre el funcionamiento de la sinapsis MOC-CCE en ratones *L9'T*, se emplearon protocolos de trenes de estimulación de diez pulsos, y a diferencia de las mediciones realizadas en la **Figura 30**, en esta ocasión los IF fueron definidos entre el primer y el décimo pulso ($IF_x = X_{10}/X_1$). Cabe destacar que originalmente se intentó trabajar a las mismas dos frecuencias analizadas en experimentos de pulsos pareados, 20 y 40 Hz. Sin embargo, producto de la cinética más lenta ya descrita para las corrientes en la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T*, y especialmente al utilizar una rutina de análisis automatizada, resultaba difícil identificar el origen de cada respuesta sináptica, información vital para calcular la probabilidad de liberación luego de cada pulso de estimulación. Además, a la hora de obtener respuestas sinápticas confiables en las CCEs, es común estimular las fibras eferentes MOC con intensidades de corriente altas, incrementando significativamente la duración del artefacto de estimulación y dificultando aún más el análisis. Por todo esto, el análisis de las corrientes obtenidas a 40 Hz en dicho genotipo no resultaba concluyente, y se decidió trabajar con trenes de estimulación de 10 y 20 Hz. Al utilizar una frecuencia de 10 Hz no se observó facilitación de corto término en ninguno de los dos genotipos (**Figura 32, Tabla IX**; *wt*: $IF_S, p = 0.42$, $IF_P, p = 0.31$, $IF_A, p = 0.23$; *L9'T*, $IF_S, p = 0.69$, $IF_P, p = 0.90$, $IF_A, p = 0.41$), y en consecuencia tampoco hubo diferencias significativas entre ellos (**Figura 32**; S_{10}/S_{1-wt} vs $S_{10}/S_{1-L9'T}$, $p = 0.43$; P_{10}/P_{1-wt} vs $P_{10}/P_{1-L9'T}$, $p = 0.94$; A_{10}/A_{1-wt} vs $A_{10}/A_{1-L9'T}$, $p = 0.89$). En cambio, a 20 Hz y en

Tabla IX | Cálculo de $IF_X = X_{10}/X_1$ para S, P y A en ratones *wt* y *L9'T*, a 10 Hz y 20 Hz. $V_S = -40$ mV. Prueba de *t* pareada; ** $p < 0.01$.

Genotipo:	<i>wt</i> (n = 4-5)			<i>L9'T</i> (n = 7)		
	$IF_S = S_{10}/S_1$	$IF_P = P_{10}/P_1$	$IF_A = A_{10}/A_1$	$IF_S = S_{10}/S_1$	$IF_P = P_{10}/P_1$	$IF_A = A_{10}/A_1$
10 Hz	1.39 ± 0.45	1.14 ± 0.38	1.30 ± 0.31	1.00 ± 0.27	1.08 ± 0.27	0.91 ± 0.10
20 Hz	0.92 ± 0.21	0.95 ± 0.13	1.01 ± 0.23	$5.54 \pm 1.13^{**}$	$5.77 \pm 1.56^{**}$	1.07 ± 0.06

consistencia con lo reportado en la **Figura 30**, los ratones *knock-in* para la mutación *L9'T* presentaron facilitación de corto término, siendo los valores de IF_S e IF_P significativamente mayores a 1, mientras que IF_A no varió respecto de 1 (**Figura 32, Tabla IX; *L9'T***: IF_S , $p = 0.007$, IF_P , $p = 0.005$, IF_A , $p = 0.82$). Al igual que en los protocolos de pulsos pareados, los ratones *wt* no presentaron facilitación de corto término a 20 Hz (**Figura 32, Tabla IX; *wt***: IF_S , $p = 0.47$, IF_P , $p = 0.92$, IF_A , $p = 0.69$). En consecuencia, los valores de IF_P e IF_S fueron significativamente distintos entre ambos genotipos para esta frecuencia, en tanto que IF_A no cambió entre animales *wt* y *knock-in* (**Figura 32; S_{10}/S_{1-wt} vs $S_{10}/S_{1-L9'T}$, $p = 0.009$; P_{10}/P_{1-wt} vs $P_{10}/P_{1-L9'T}$, $p = 0.009$; A_{10}/A_{1-wt} vs $A_{10}/A_{1-L9'T}$, $p = 0.92$). Estos resultados son coherentes con lo**

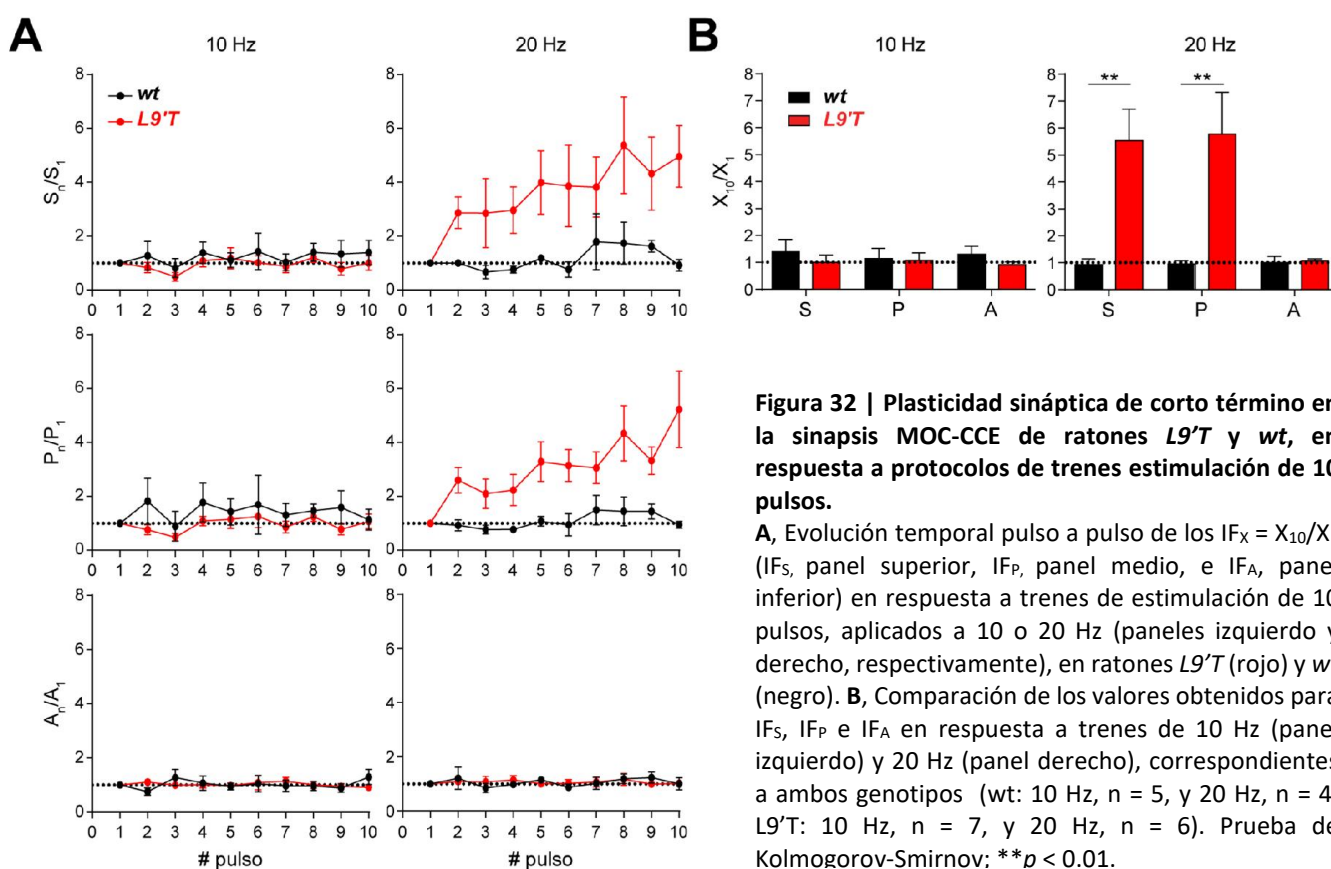


Figura 32 | Plasticidad sináptica de corto término en la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* y *wt*, en respuesta a protocolos de trenes estimulación de 10 pulsos.

A, Evolución temporal pulso a pulso de los $IF_X = X_{10}/X_1$ (IF_S , panel superior, IF_P , panel medio, e IF_A , panel inferior) en respuesta a trenes de estimulación de 10 pulsos, aplicados a 10 o 20 Hz (paneles izquierdo y derecho, respectivamente), en ratones *L9'T* (rojo) y *wt* (negro). **B**, Comparación de los valores obtenidos para IF_S , IF_P e IF_A en respuesta a trenes de 10 Hz (panel izquierdo) y 20 Hz (panel derecho), correspondientes a ambos genotipos (*wt*: 10 Hz, $n = 5$, y 20 Hz, $n = 4$; *L9'T*: 10 Hz, $n = 7$, y 20 Hz, $n = 6$). Prueba de Kolmogorov-Smirnov; ** $p < 0.01$.

observado anteriormente, sugiriendo una vez más que los ratones *knock-in* para la mutación L9'T en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ presentan una facilitación de corto término exacerbada, y que este fenómeno puede explicarse mediante factores presinápticos.

Efecto de la mutación L9'T sobre la respuesta de la sinapsis MOC-CCE frente a la estimulación de las fibras MOC en el rango fisiológico

La magnitud de la inhibición coclear aumenta con la frecuencia de disparo de las fibras MOC (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987), y se ha demostrado *in vivo* que la actividad eléctrica de las mismas depende de la intensidad del sonido a la que un organismo se vea expuesto, cubriendo un amplio rango de frecuencias que puede ascender hasta 120 Hz (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989). Además, en la sinapsis MOC-CCE confluyen mecanismos de facilitación presináptica y sumación de la respuesta postsináptica que dan forma a las corrientes inhibitorias, dependiendo a su vez de la frecuencia de estimulación de las fibras MOC (Ballesterero et al., 2011). En las secciones previas se demostró que los ratones L9'T presentan respuestas sinápticas significativamente más prolongadas, además de una facilitación presináptica de corto término exacerbada. En conjunto, estos mecanismos podrían contribuir a darle forma a la respuesta postsináptica, resultando relevantes para el aumento de la ganancia del sistema eferente olivococlear descrito en ratones L9'T y la menor susceptibilidad de estos animales frente al trauma acústico tanto a nivel fisiológico como anatómico (Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018).

Por estas razones, resultó oportuno evaluar la respuesta sináptica frente a la estimulación repetitiva de las fibras MOC en ratones L9'T. Para ello se utilizaron protocolos de trenes de estimulación de 10 pulsos con frecuencias de entre 10 y 80 Hz, dentro del rango fisiológico. Cabe destacar que la utilización de frecuencias mayores a 80 Hz compromete seriamente la estabilidad de los registros en las CCEs, razón por la cual se decidió hacer los experimentos con esa frecuencia como límite superior. En la **Figura 33A** se muestran trazos representativos promedio de las respuestas obtenidas en las CCEs de animales *wt* y L9'T. En forma consistente con la cinética de la respuesta postsináptica previamente

descrita para eventos únicos en ratones *knock-in* se observó, para todas las frecuencias estudiadas, que las corrientes evocadas por trenes de estimulación en estos animales fueron más lentas y prolongadas que las de los animales *wt*. En consecuencia, el total de carga transferida en promedio a

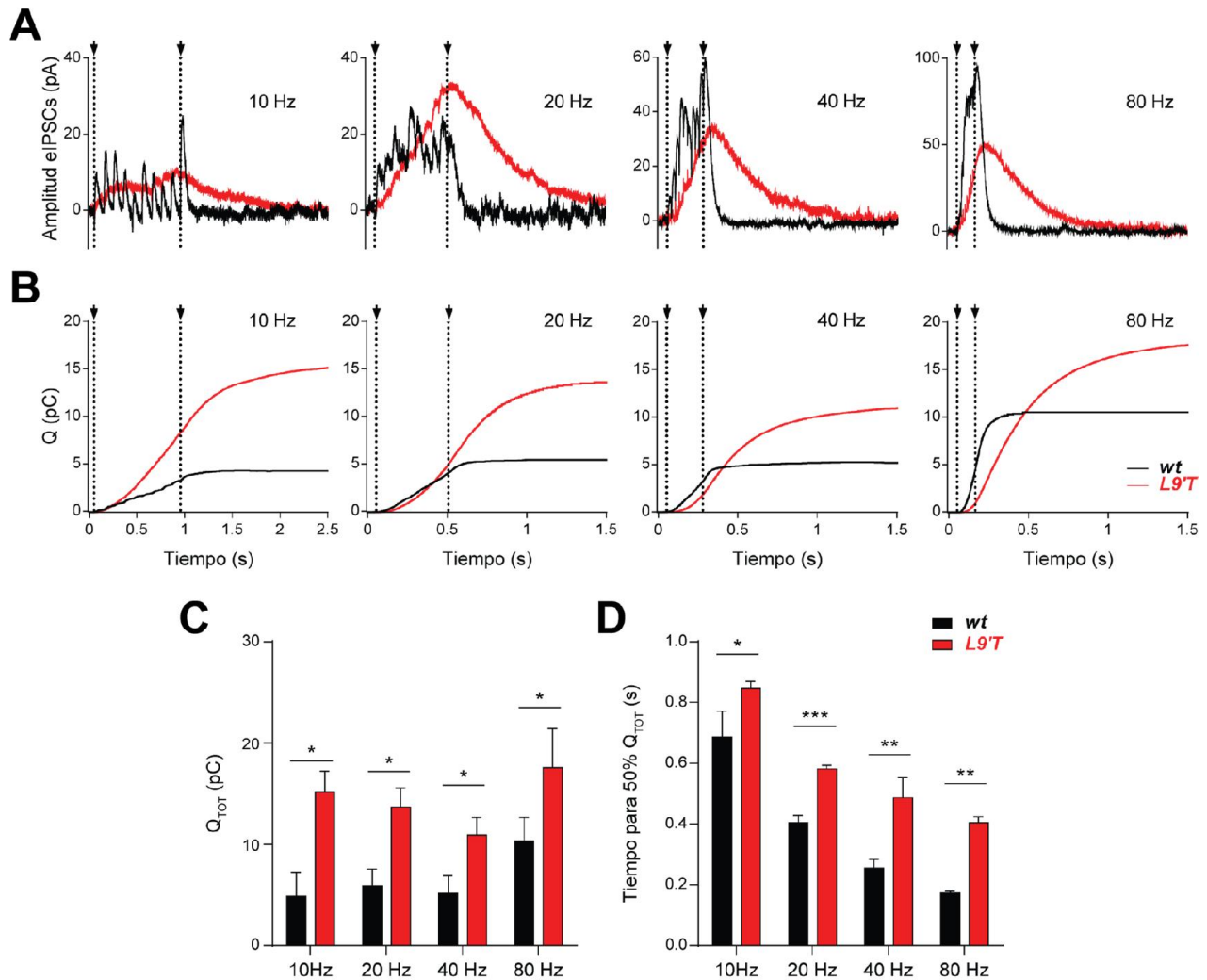


Figura 33 | Respuestas sinápticas y carga total en CCEs de ratones *wt* y *L9T* frente a la estimulación de las fibras MOC en el rango fisiológico de disparo.

A, Promedios de respuestas sinápticas obtenidas en CCEs frente a trenes de estimulación de 10 pulsos, a 10, 20, 40 y 80 Hz. Para cada frecuencia se muestra el promedio de 30 trazos obtenidos en una misma CCE, para cada *wt* (negro) y *L9T* (rojo). Para mayor claridad, los artefactos de estimulación fueron removidos y reemplazados por líneas punteadas que indican el comienzo y el final del tren de estimulación. $V_s = -40$ mV. **B**, Promedio de carga (Q) acumulada para 30 pulsos, a lo largo del protocolo de estimulación. Los gráficos corresponden a las CCEs ilustradas en **A**. **C** y **D**, Cuantificación de la carga total al final de cada protocolo (Q_{TOT} , **C**) y del tiempo necesario para alcanzar el 50% de dicho valor (**D**), para todas las CCEs registradas en ratones *wt* (negro; 10 Hz, $n = 3$; 20 Hz, $n = 6$; 40 Hz, $n = 4$; 80 Hz, $n = 5$) y *L9T* (rojo; 10 Hz, $n = 7$; 20 Hz, $n = 10$; 40 Hz, $n = 7$; 80 Hz, $n = 11$). Prueba de Kolmogorov-Smirnov; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

lo largo de todo el protocolo de estimulación resultó mayor en ratones *knock-in*, respecto a los *wt* (**Figura 33B y C**; 10 Hz: *wt*, 4.85 ± 2.42 pC, *L9'T*: 16.84 ± 1.41 pC, $p = 0.024$; 20 Hz: *wt*, 5.91 ± 1.66 pC, y *L9'T*, 13.69 ± 1.87 pC, $p = 0.019$; 40 Hz: *wt*, 43.71 ± 1.1 pC, y *L9'T*, 11.77 ± 1.77 pC, $p = 0.024$; 80 Hz: *wt*, 10.34 ± 2.33 , y *L9'T*: 17.59 ± 3.86 , $p = 0.048$). Además, el tiempo necesario para alcanzar el 50% del total de la carga fue mayor en animales *L9'T*, lo que se evidenció en un retardo (Δt) significativo entre ambos genotipos (**Figura 33D**; 10 Hz: *wt*, 0.69 ± 0.09 s, y *L9'T*, 0.85 ± 0.02 , $\Delta t = 160$ ms, $p = 0.017$; 20 Hz: *wt*, 0.40 ± 0.02 s, y *L9'T*, 0.58 ± 0.01 s, $\Delta t = 180$ ms, $p = 0.0002$; 40 Hz: *wt*, 0.26 ± 0.03 s, y *L9'T*, 0.48 ± 0.07 s, $\Delta t = 220$ ms, $p = 0.006$; 80 Hz: *wt*, 0.17 ± 0.01 s, y *L9'T*, 0.40 ± 0.02 s, $\Delta t = 230$ ms, $p = 0.0005$).

A lo largo de los experimentos mostrados hasta ahora en este Capítulo, el grado de similitud entre las condiciones experimentales y la situación fisiológica se incrementó progresivamente. En primer lugar se estudiaron respuestas sinápticas individuales, para luego implementar distintos protocolos utilizados clásicamente en el estudio de la plasticidad sináptica de corto término. En este contexto se aplicaron trenes de estimulación de diez pulsos, a frecuencias comprendidas dentro del rango fisiológico (**Figura 33**). Sin embargo, la activación de las fibras MOC *in vivo* da lugar a mecanismos cocleares que ocurren en una escala temporal mayor a la que puede surgir de una actividad eléctrica constreñida en diez pulsos. Considerando que la tasa de disparo de potenciales de acción de las fibras MOC aumenta con la intensidad del sonido (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987; Brown, 1989) y que el sistema eferente sería importante en la protección del sistema auditivo frente al trauma acústico (Liberman, 1991; Rajan, 2000; Maison et al., 2002), sería esperable que este sistema operara mayoritariamente a frecuencias altas dentro del rango fisiológico. Si este fuera el caso, los trenes de diez pulsos aplicados a 80 Hz, por ejemplo, podrían no ser una buena aproximación a la situación fisiológica, ya que si bien la frecuencia de disparo se corresponde con un valor lógico para la respuesta del sistema MOC, la escala temporal en la que esta actividad tiene lugar es insuficiente para emular los mecanismos que se quieren investigar. De hecho, los efectos inhibitorios de la actividad eferente sobre la reducción de la actividad electromotil de las CCEs ocurren en una escala temporal de varios segundos en animales *wt*, pero se mantienen por varios minutos en ratones *L9'T* (Taranda et al., 2009). Siguiendo este razonamiento, se realizaron experimentos de trenes de estimulación durante 10 segundos, a 80 Hz, ilustrados en la **Figura 34A**. En consistencia con lo reportado

a lo largo de este Capítulo, las respuestas sinápticas de los animales *L9'T* se vieron potenciadas en comparación a las de ratones *wt*, lo que se evidencia en respuestas más lentas pero sostenidas en el tiempo. La **Figura 34B** muestra la evolución temporal del promedio de amplitudes normalizadas, obtenidas al medir en intervalos discretos de tiempo a lo largo del tren de estímulos: a los 0.35, 0.5 y 1 segundos, para luego continuar cada un segundo hasta la finalización de la estimulación. Como puede observarse, en las mediciones realizadas entre la cuarta y octava medición (correspondientes a 1 y 8

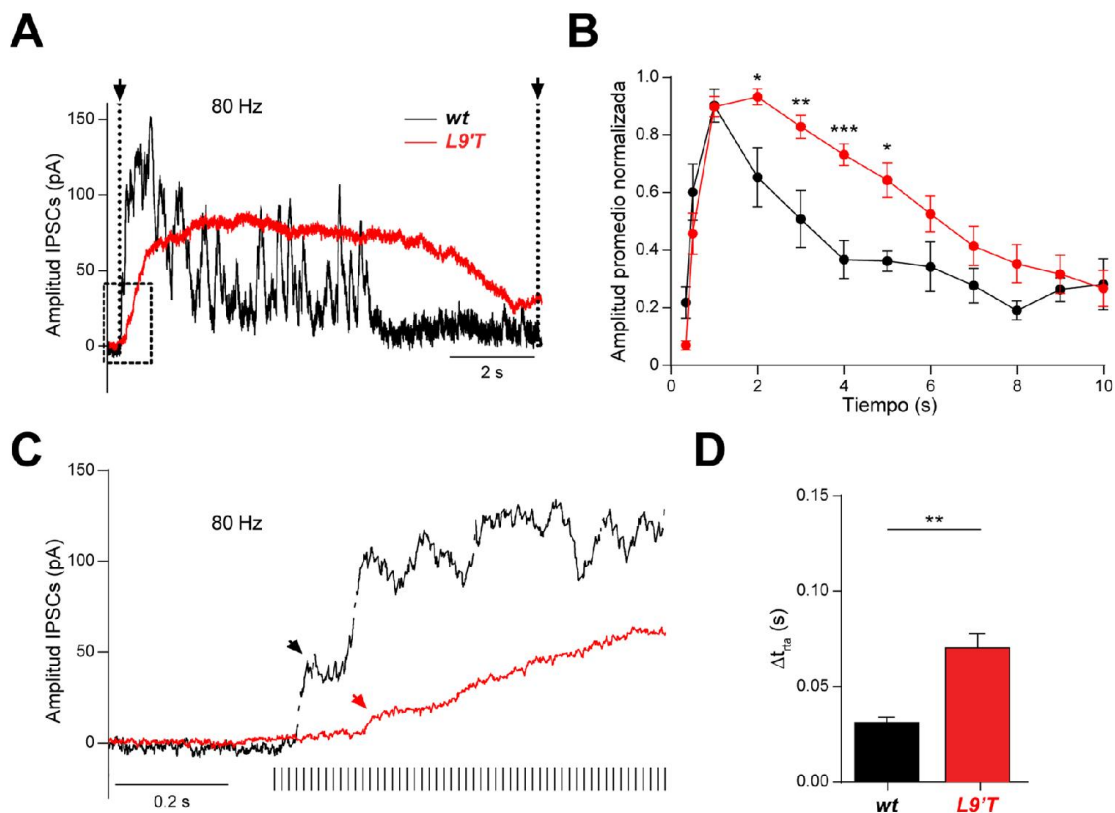


Figura 34 | Corrientes sinápticas en las CCEs en respuesta a la estimulación de alta frecuencia prolongada de las fibras MOC para animales *wt* y *L9'T*.

A, Trazos representativos de la respuesta sináptica en CCEs de ratones *wt* (negro) y *L9'T* (rojo) a un tren de estimulación de 10 segundos a 80 Hz. Para mayor claridad, los artefactos de estimulación fueron removidos. Las líneas punteadas indican el comienzo y el final del tren de estímulos. **B**, Amplitud promedio normalizada de las respuestas sinápticas frente a la estimulación de 10 segundos a 80 Hz, en función del tiempo. La amplitud de las respuestas fue medida en intervalos discretos y normalizada a la máxima amplitud obtenida a lo largo de todo el tren, para cada célula. **C**, Expansión de la región dentro de la línea punteada en **A** con el fin de ilustrar el tiempo necesario para evocar una respuesta (latencia) luego del primer estímulo, en sinapsis MOC-CCE de ambos genotipos. Las flechas indican el pico de la primera respuesta detectada una vez comenzada la estimulación, y los artefactos fueron remplazados por barras en la parte inferior de la figura. **D**, Latencia de la respuesta sináptica para sinapsis MOC-CCE de ratones *wt* y *L9'T*, medida como el tiempo transcurrido entre el comienzo de la estimulación y el pico de la primera respuesta detectada (flechas en **C**). ANOVA de dos factores con medidas repetidas (**B**) y prueba de Kolmogorov-Smirnov (**D**); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. En ambos casos *wt*, $n = 9$, y *L9'T*, $n = 17$.

segundos, respectivamente) las amplitudes promedio obtenidas para la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* fueron mayores que las de ratones *wt*, con diferencias significativas entre ambos genotipos para las mediciones correspondientes a los 2, 3, 4 y 5 segundos de registro, a partir del inicio de la estimulación (**Figura 34B**). Esto se relaciona con el hecho de que, luego de alcanzar los valores máximos de respuesta, la corriente sináptica en ratones *wt* retorna más rápidamente a sus valores basales, permitiendo concluir que los ratones *knock-in* para la mutación *L9'T* presentan un efecto más duradero en la respuesta a un estímulo sostenido de alta frecuencia. Cabe destacar además que, como se observa en la **Figura 34B**, el máximo de la respuesta en ratones *L9'T* ocurrió, en promedio, a los 2 segundos desde el comienzo del tren de estímulos, mientras que para ratones *wt*, el máximo se alcanzó, en promedio, luego de 1 segundo de estimulación. Para cuantificar el efecto de la cinética más lenta observada en las corrientes sinápticas de ratones *L9'T* se midió la latencia de la respuesta sináptica (Δt_{rta}), definida como el tiempo necesario para alcanzar el pico de la primera respuesta sináptica desde el comienzo del tren de estímulos. Se obtuvo una diferencia significativa en el tiempo necesario para evocar una respuesta entre ambos genotipos (**Figura 34C y D**; Δt_{rta-wt} , 0.031 ± 0.002 s y $\Delta t_{rta-L9'T}$, 0.069 ± 0.007 s, $p = 0.005$). En conjunto, estas observaciones sugieren que, en consistencia con lo descrito hasta el momento, la cinética más lenta de las corrientes observadas en las sinapsis MOC-CCE de animales *L9'T* es determinante en la forma de la respuesta sináptica durante la estimulación sostenida de alta frecuencia.

Finalmente, con el fin de comprender las implicancias de la estimulación sostenida de alta frecuencia en las fibras MOC sobre la inhibición de las CCEs, se evaluó el efecto de la estimulación sostenida de alta frecuencia sobre el potencial de membrana de las CCEs. Para esto se emplearon trenes de 80 Hz de 10 segundos de duración, y se registraron las respuestas de las CCEs en la configuración de fijación de corriente. Como puede observarse en los trazos representativos de la **Figura 35A** y en consistencia con lo descrito previamente, la hiperpolarización resultante en respuesta a la activación de las fibras MOC de ratones *L9'T* fue más lenta pero más persistente en el tiempo que en los animales *wt* detectada (**Figura 35B**; Δt_{rta-wt} , 0.073 ± 0.006 s y $\Delta t_{rta-L9'T}$, 0.125 ± 0.025 s, $p = 0.04$), mientras que la máxima hiperpolarización alcanzada (ΔV_{MAX}) fue, en promedio, igual entre ambos genotipos (**Figura 35C**; ΔV_{MAX-wt} , 8.07 ± 1.45 mV y $\Delta V_{MAX-L9'T}$, 6.47 ± 2.54 mV, $p = 0.19$). El hecho de que la hiperpolarización

de las CCEs en respuesta a la estimulación eferente sea más sostenida en ratones *L9'T* es consistente con las evidencias que indican que estos animales son más resistentes al trauma acústico (Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018).

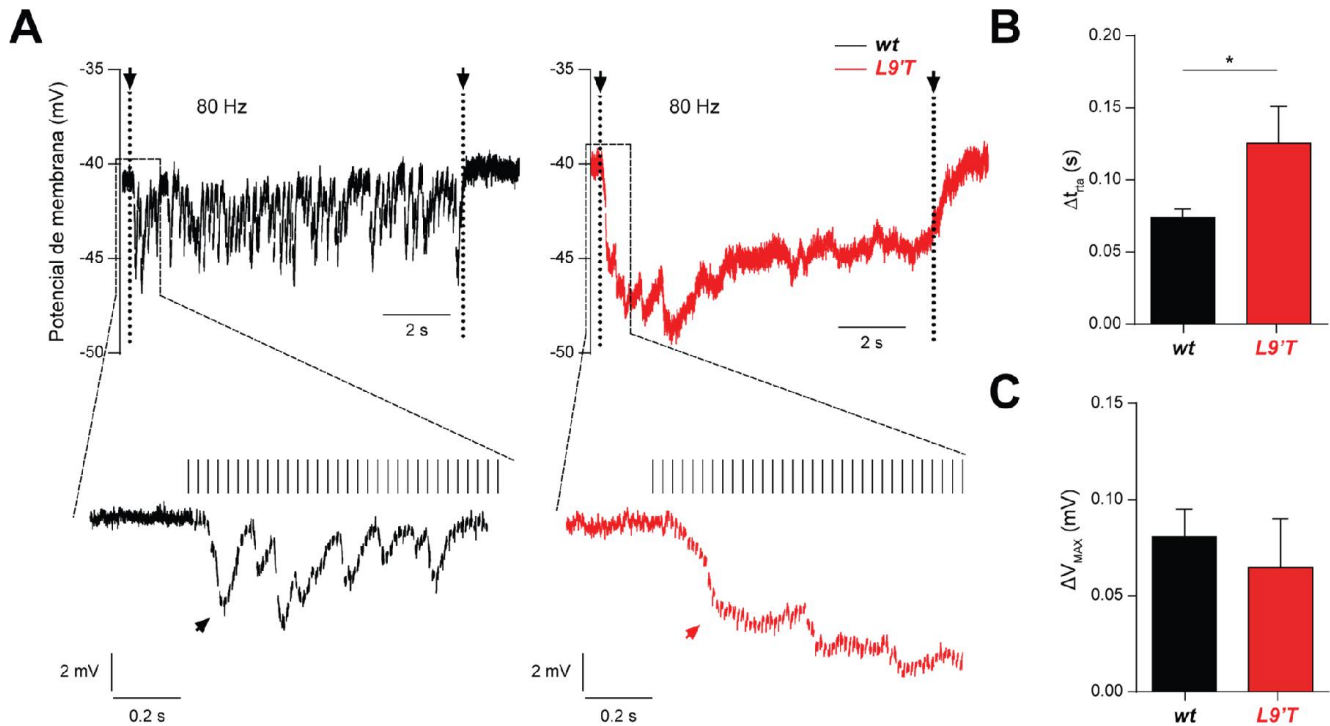


Figura 35 | Efectos sobre el potencial de membrana de CCEs de ratones *L9'T* y *wt*, en respuesta a la estimulación de alta frecuencia sostenida de las fibras MOC.

A, Trazos representativos de CCEs correspondientes a animales *wt* (negro) y *L9'T* (rojo) en configuración *current-clamp*, en respuesta a trenes de estimulación de 10 segundos a 80 Hz. Los artefactos de estimulación fueron removidos y reemplazados por líneas punteadas que indican el comienzo y el final del tren de estímulos. En el panel inferior se muestra una ampliación de los trazos al comienzo de la estimulación, para observar en detalle el tiempo necesario en cada caso para alcanzar el pico de la primera hiperpolarización detectable, indicado con flechas. En este caso los artefactos de estimulación fueron reemplazados por barras. **B,** Máxima hiperpolarización alcanzada en cada genotipo, calculada como la diferencia entre el potencial de membrana (V_m) más negativo a lo largo del tren de estímulos y el valor de potencial antes del comienzo del mismo (ΔV_m). **C,** Latencia en el cambio de potencial de membrana para sinapsis MOC-CCE de ratones *wt* y *L9'T*, medida como el tiempo transcurrido entre el comienzo del tren de estímulos y el pico de la primera respuesta detectada (flechas en **A**). Para **B** y **C**: *wt*, $n = 6$ y *L9'T*, $n = 5$. Prueba de Kolmogorov-Smirnov; $*p < 0.05$.

II. Apéndice de Resultados

Los resultados hasta aquí presentados fueron recientemente publicados en un trabajo en el que el autor de esta Tesis es co-primer autor (Wedemeyer, Vattino et al., 2018). En esta sección se incluyen resultados que forman parte de dicha publicación pero que fueron obtenidos, en parte o totalmente, por co-autores de la misma. Los datos aquí descritos corresponden a experimentos de fisiología sináptica realizados sobre la sinapsis transitoria MOC-CCI a P9-11, o bien a experimentos que estudian las implicancias de la mutación L9'T sobre la inhibición de la amplificación coclear *in vivo*, en ratones adultos. Estos resultados contribuyen a la interpretación de aquellos presentados en este Capítulo, razón por la cual se hará una breve descripción de ellos en esta sección, para luego discutirlos en la sección siguiente. Todas las figuras aquí presentadas fueron modificadas a partir de la publicación original.

La Figura 36 y la **Tabla X** corresponden al estudio comparativo de las eIPSCs correspondientes a sinapsis MOC-CCI de ratones *L9'T* y *wt*. Las eIPSCs de ratones *L9'T* fueron significativamente más prolongadas, producto de una cinética más lenta (Figura 36 y **Tabla X**; $\tau_{\text{crecimiento}}$, $p = 0.0043$; $\tau_{\text{decaimiento}}$, $p = 0.0159$; ancho medio, $p = 0.0159$), a la vez que la transferencia de carga también fue significativamente mayor respecto de los animales *wt* (Figura 36 y **Tabla X**; $p = 0.0159$). También la amplitud de las corrientes observadas fue menor en las CCI del *knock-in* (**Figura 36 y Tabla X**; $p = 0.0295$), así como la eficacia de liberación de ACh, reportada por la estimación del contenido cuántico (m) de la sinapsis (**Tabla X**; $p = 0.0414$). En conjunto, las diferencias observadas entre ambos genotipos fueron esencialmente idénticas a las descriptas para la sinapsis MOC-CCE.

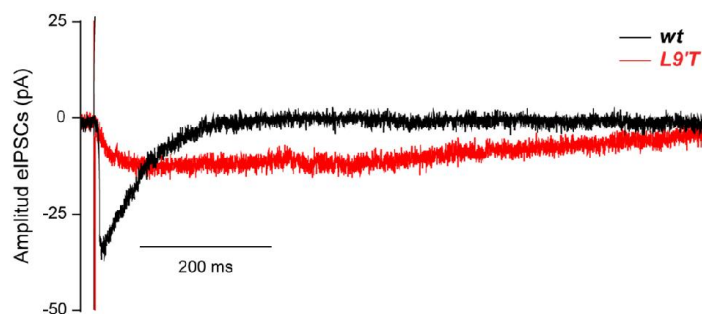


Figura 36 | Corrientes sinápticas en la sinapsis MOC-CCI de ratones *L9'T* y *wt*.

Trazos representativos de eIPSCs en respuesta a la estimulación eléctrica de las fibras MOC en ratones *L9'T* (rojo) y *wt* (negro). $V_s = -90$ mV.

Tabla X | Propiedades de la transmisión sináptica y de las corrientes en CCI de ratones *wt* y *L9'T*.

$V_s = -90$ mV. Prueba de *t* no pareada o prueba de Kolmogorov-Smirnov; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Datos correspondientes a experimentos realizados por el autor de esta Tesis junto con la Dra. Carolina Wedemeyer.

Genotipo:	<i>wt</i> (n = 6)	<i>L9'T</i> (n = 5)
Contenido cuántico	1.29 ± 0.21	0.83 ± 0.12*
Amplitud eIPSCs (pA)	28.4 ± 4.6	14.9 ± 2.2*
$\tau_{\text{crecimiento}}$ (ms) (20-80%)	5.3 ± 0.6	16.3 ± 2.2**
$\tau_{\text{decaimiento}}$ (ms) (10-90%)	63.6 ± 9.7	290.4 ± 62.3*
Ancho medio (ms)	38.3 ± 4.7	175.2 ± 24.9*
Q (pC)	1.1 ± 0.2	2.7 ± 0.2*

Como se ha mencionado anteriormente, los ratones *knock-in* para la mutación *L9'T* se caracterizan por tener una mayor resistencia al trauma acústico en respuesta a sonidos de alta intensidad, lo que se explica por un aumento en la ganancia del sistema eferente (Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018). Teniendo en cuenta que dicho sistema actúa a través de la sinapsis colinérgica entre las fibras MOC y las CCEs, mediada por nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ funcionalmente acoplados a canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} intracelular, sería esperable que las respuestas sinápticas más prolongadas observadas en los ratones *L9'T* deriven en una mayor entrada de Ca^{2+} a las células postsinápticas. Este tipo de información puede obtenerse a través de imágenes de Ca^{2+} en las células ciliadas en respuesta a la estimulación de las fibras MOC, como se muestra en la **Figura 37**. Debido a limitaciones técnicas, no fue posible llevar a cabo este tipo de abordaje experimental en las CCEs, razón por la cual se hizo en las CCI. Estas células solo se encuentran invadidas por fibras MOC durante el desarrollo postnatal temprano, previo al comienzo de la audición, por lo que no se encuentran directamente involucradas en el aumento en la protección frente al trauma acústico descrito en los ratones transgénicos *L9'T*. Sin embargo, al igual que en la sinapsis MOC-CCE, en la sinapsis MOC-CCI también se observaron eIPSCs más prolongadas en los ratones *L9'T*, en comparación con los *wt*, por lo que se evaluó la entrada de Ca^{2+} postsináptico en las CCI frente a la estimulación eferente. Para ello, se registró la respuesta sináptica en las CCI en respuesta a trenes de diez pulsos, a 20 y 80 Hz, al mismo tiempo que se obtuvieron señales de Ca^{2+} utilizando un indicador fluorescente, que fue incorporado a las CCI a través del electrodo de registro. En estas condiciones, las corrientes sinápticas más sostenidas en el tiempo fueron acompañadas por señales de Ca^{2+} más prolongadas en ratones *L9'T*, respecto de los *wt* (**Figura 37A y B**), lo que se tradujo en valores significativamente mayores del ancho medio de la respuesta (**Figura**

37C; 20 Hz: ancho medio_{wt} = 0.45 ± 0.12 s, ancho medio_{L9'T} = 1.08 ± 0.03 s, $p = 0.008$; 80 Hz: ancho medio_{wt} = 0.36 ± 0.06 s, ancho medio_{L9'T} = 1.26 ± 0.16 s, $p = 0.0012$) y la constante de decaimiento

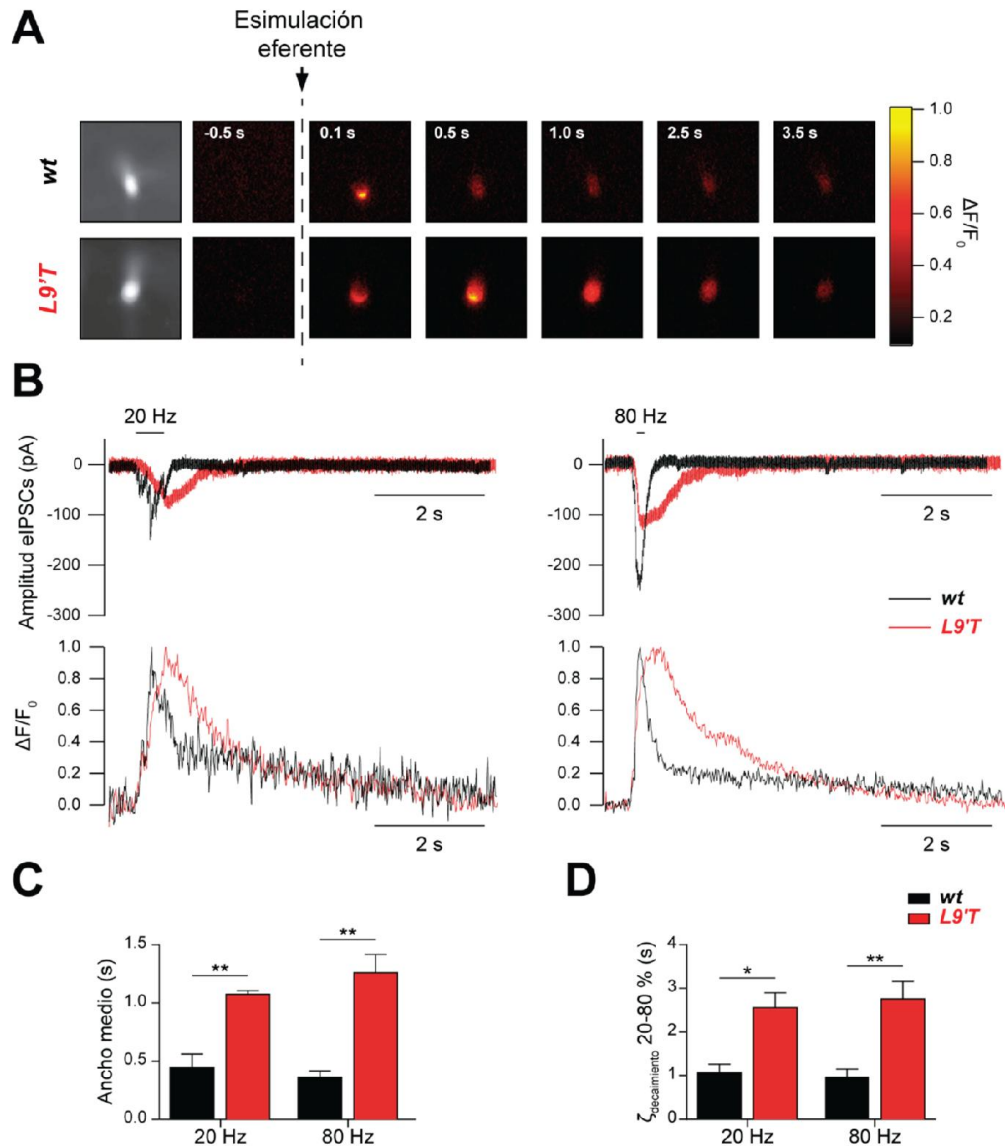


Figura 37 | Señales de Ca^{2+} en las CClis luego de la activación de las fibras MOC, en ratones *L9'T* y *wt*.

A, Secuencia de imágenes de Ca^{2+} obtenidas en CClis de ratones *L9'T* y *wt*, durante la estimulación de las fibras eferentes MOC mediante un tren de diez pulsos, a 80 Hz. Las imágenes fueron obtenidas a través de un microscopio de campo amplio, utilizado para monitorear la actividad de Ca^{2+} en las CClis, previamente cargadas con el indicador de Ca^{2+} intracelular Fluo-4, en respuesta a la iluminación con un LED de 488 nm. Se indica el momento en que se aplica el tren de estímulos sobre las fibras MOC. La señal de fluorescencia fue normalizada a su valor máximo. **B**, Trazos representativos (arriba) y cambios en la fluorescencia expresados como $\Delta F/F_0$ (abajo), en CClis de animales *wt* (negro) y *L9'T* (rojo) durante la estimulación de las fibras MOC con trenes de diez pulsos a 20 y 80 Hz. La fluorescencia de las CClis fue medida en la región de la misma en que la señal alcanzó su valor máximo. **C**, Cuantificación del ancho medio de las señales de Ca^{2+} durante protocolos de estimulación como los ilustrados en **B**. **D**, Cuantificación de la constante de decaimiento ($\tau_{\text{decaimiento}}$, entre el 20 y el 80 % entre el pico y el retorno a la línea de base) de las señales de Ca^{2+} durante los mismos protocolos. En **C** y **D**, *wt* (negro; $n = 7$) y *L9'T* (rojo; $n = 7$). Prueba de Kolmogorov-Smirnov; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Datos correspondientes a experimentos realizados por el Dr. Marcelo J. Moglie.

($\tau_{\text{decaimiento}}$) de la misma (**Figura 37D**; 20 Hz: $\tau_{\text{decaimiento-}wt} = 1.07 \pm 0.20$ s, $\tau_{\text{decaimiento-}L9'T} = 2.56 \pm 0.34$ s, $p = 0.026$; 80 Hz: $\tau_{\text{decaimiento-}wt} = 0.97 \pm 0.18$ s, $\tau_{\text{decaimiento-}L9'T} = 2.76 \pm 0.40$ s, $p = 0.008$), tanto a 20 como a 80 Hz. Teniendo en cuenta estos resultados, resulta lógico pensar que el aumento de la ganancia de la sinapsis MOC-CCE involucra un fenómeno similar al descrito en la sinapsis MOC-CCI, en el que la entrada de Ca^{2+} postsináptica se encuentra exacerbada.

Durante el desarrollo postnatal del órgano de Corti, la sinapsis transitoria entre las fibras MOC y las CCIs es crucial para regular la frecuencia de disparo de potenciales de acción espontáneos en estas células (Johnson et al., 2011b; Sendin et al., 2014). Teniendo en cuenta los resultados de la **Figura 37** que evidenciaron señales de Ca^{2+} más prolongadas en las CCIs de ratones *knock-in*, se decidió estudiar el impacto de las mismas sobre la inhibición del disparo de potenciales de acción. Para ello, mediante la aplicación de un pulso despolarizante de 10 segundos de duración en las CCIs, se evaluó la frecuencia de disparo de potenciales de acción antes (pre; 1.3 a 3.2 s), durante (est; 3.4 a 5.4 s) y después (post; 5.5 a 8.5 s) de la estimulación eléctrica sobre las fibras MOC, en ambos genotipos (**Figura 38A**). En los ratones *wt*, la estimulación eferente durante 2 segundos a una frecuencia de 5 Hz generó una leve disminución en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (PA/s), aunque no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos en los tres períodos evaluados (**Figura 38B**; 5 Hz: $\text{pre}_{wt} = 5.9 \pm 1.2$ PA/s, $\text{est}_{wt} = 2.4 \pm 0.3$ PA/s, $\text{post}_{wt} = 5.6 \pm 1.5$ PA/s; $p = 0.08$), mientras que a 10 Hz se observó una disminución significativa en la frecuencia de disparo, que retornó rápidamente a sus valores basales luego de finalizado el estímulo (**Figura 38B**; 10 Hz: $\text{pre}_{wt} = 6.1 \pm 1.9$ PA/s, $\text{est}_{wt} = 0.2 \pm 0.2$ PA/s, $\text{post}_{wt} = 5.6 \pm 1.2$ PA/s; $p = 0.003$). En cambio, en los ratones *L9'T* la disminución de la frecuencia de disparo de potenciales de acción fue significativa a 5 Hz (**Figura 38B**; 5 Hz: $\text{pre}_{L9'T} = 8.2 \pm 2.1$ PA/s, $\text{est}_{L9'T} = 0.3 \pm 0.2$ PA/s, $\text{post}_{L9'T} = 3.7 \pm 1.6$ PA/s; $p = 0.005$), mientras que a 10 Hz, la disminución significativa durante la estimulación eferente se prolongó hasta el período posterior al fin de dicho estímulo (**Figura 38B**; 10 Hz: $\text{pre}_{L9'T} = 15.2 \pm 6.4$ PA/s, $\text{est}_{L9'T} = 0.8 \pm 0.8$ PA/s, $\text{post}_{L9'T} = 1.3 \pm 0.7$ PA/s; $p = 0.0009$). Más aún, al evaluar las eIPSCs en la sinapsis MOC-CCI de animales *L9'T* mediante la estimulación eferente con trenes de diez pulsos a 10 Hz en la configuración de fijación de voltaje, se observó un aumento

significativo en la transferencia de carga (Q) sobre las CCI durante la actividad eferente (**Figura 38C y D**; $Q_{wt} = 15.81 \pm 3.16$, $Q_{L9'T} = 77.37 \pm 7.06$ pC; $p = 0.036$). Estos resultados sugieren que la dinámica más

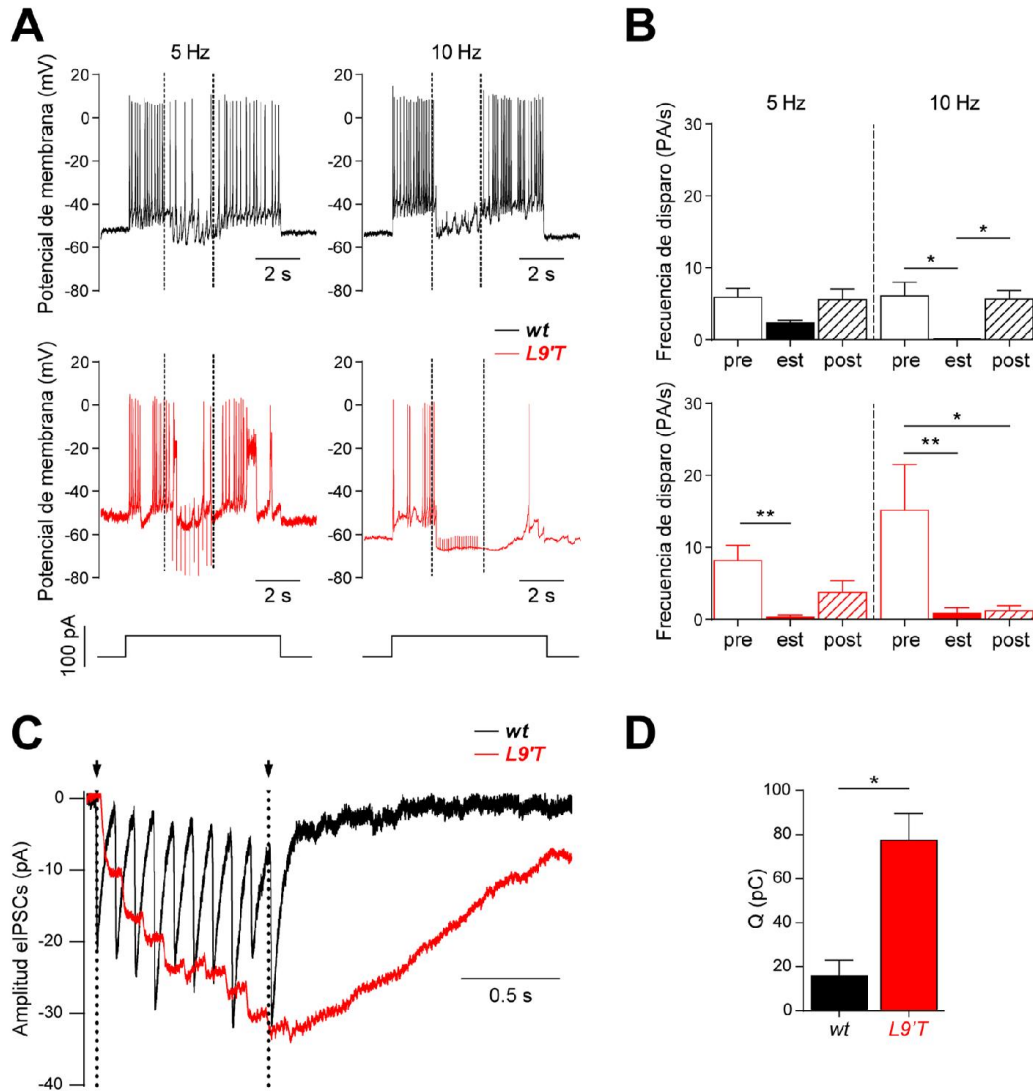


Figura 38 | Inhibición del disparo de potenciales de acción en las CCI mediada por la estimulación de las fibras MOC en ratones $L9'T$ y wt .

A, Trazos representativos de CCI en la configuración de fijación de corriente, en los que se observa el disparo de potenciales de acción evocados por un pulso despolarizante de 50 pA y 10 s de duración (panel inferior) antes, durante y después de estimular las fibras MOC por 2 s, a una frecuencia de 5 o 10 Hz. **B**, Cuantificación de la frecuencia de potenciales de acción (PA/s) durante protocolos como los ilustrados en **A**, para ratones wt (negro; $n = 5$) y $L9'T$ (rojo; $n = 5$). Se ilustra la frecuencia antes (barras vacías), durante (barras llenas) y después (barras rayadas) del tren de estímulos. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Experimentos realizados por la Dra. Carolina Wedemeyer. **C**, Trazos representativos de eIPSCs registradas en la sinapsis MOC-CCI de ratones wt (negro) y $L9'T$ (rojo) frente a un tren de estímulos de diez pulsos, a 10 Hz. **D**, Cuantificación de la carga total (Q) al final de protocolos como los ilustrados en **C** para la sinapsis MOC-CCI de animales wt (negro; $n = 4$) y $L9'T$ (rojo; $n = 3$). Prueba de Kolmogorov-Smirnov; * $p < 0.05$. Datos obtenidos en experimentos realizados por el autor de esta Tesis junto con la Dra. Carolina Wedemeyer.

lenta y prolongada de la corriente inhibitoria mediada por los nAChRs que portan la mutación L9'T impacta sobre el efecto inhibitorio que las fibras MOC pueden tener sobre las CCI.

Por último, se realizó un experimento de activación de las fibras MOC *in vivo*, ilustrado en la **Figura 39**, que permite estimar el efecto del sistema eferente sobre la amplificación coclear a través de la medición de la amplitud de productos de distorsión de las emisiones otoacústicas (DPOAEs, por sus siglas en inglés, *distortion products of otoacoustic emissions*). Los DPOAEs son emitidos por el oído en respuesta a un estímulo sonoro (de 22.6 kHz en el experimento de la **Figura 39**) y su amplitud es una medida indirecta del nivel de actividad de amplificación mediada por las CCEs. La estimulación eléctrica de las fibras eferentes a la altura del tallo encefálico a 200 Hz durante 70 segundos, produjo una disminución en la amplitud de los DPOAEs tanto en los animales *wt* como *L9'T*. Sin embargo, en estos últimos el efecto fue más pronunciado, como lo indica el máximo nivel de supresión alcanzado durante la estimulación, con respecto a la línea de base (*wt*, -9.6 ± 2.1 dB, y *L9'T*, -20.4 ± 1.7 dB; prueba de Kolmogorov-Smirnov, $p = 0.03$). Además, el efecto en los ratones *L9'T* fue alcanzado de manera significativamente más lenta (*wt*, 1.5 ± 0.4 s, y *L9'T*, 44.1 ± 3.1 s; prueba de Kolmogorov-Smirnov, $p = 0.000007$), y en general persistió por más de 5 minutos luego de terminada la estimulación de las fibras MOC, mientras que en los animales *wt* el retorno a la línea de base ocurrió durante la estimulación MOC. Los resultados aquí descriptos son consistentes con un aumento en la ganancia del sistema eferente y con una mayor protección frente al trauma acústico en este modelo animal (Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018).

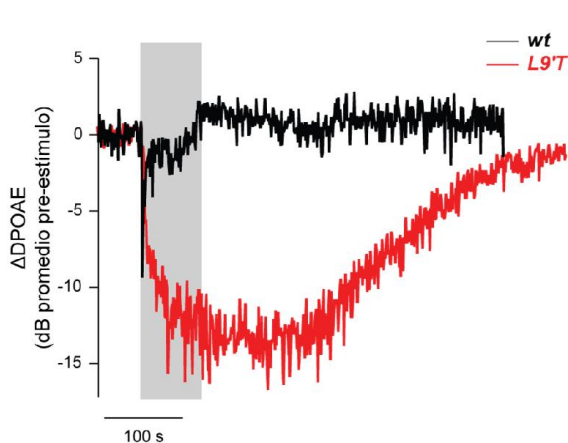


Figura 39 | Efecto de la mutación L9'T sobre la amplitud de los DPOAEs.

Cambios representativos en la amplitud de DPOAEs en un ratón *L9'T* (rojo) en comparación con un animal *wt* (negro). Los DPOAEs fueron generados a partir de un estímulo sonoro de 22.6 kHz y su amplitud fue medida antes, durante y después de un tren de estímulos eléctricos de 70 segundos a 200 Hz (recuadro gris), aplicado sobre el haz de fibras eferentes MOC, con los animales anestesiados. El cambio en la amplitud de los DPOAEs se expresa de manera relativa a la amplitud previa a la aplicación del tren de estímulos. Como puede observarse, los ratones *L9'T* tienen una mayor y más duradera reducción en la amplitud de los DPOAEs consistente con una menor actividad de las CCEs. Experimentos realizados por el Dr. Stéphane F. Maison.

II. Discusión

Esta parte de la Tesis consistió en la caracterización de la sinapsis MOC-CCE de ratones *knock-in* para una mutación puntual en la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ (Taranda et al., 2009), que les confiere una ganancia de función (Plazas et al., 2005a). Los resultados aquí presentados forman parte de una publicación reciente del laboratorio (Wedemeyer, Vattino et al., 2018). Esta publicación también incluye experimentos en la sinapsis transitoria MOC-CCI, que se distinguen de los resultados previamente obtenidos por Taranda et al., 2009, por haberse realizado en condiciones más fisiológicas, es decir, a través de la estimulación eléctrica de las fibras MOC en lugar de mediante la aplicación de concentraciones saturantes de ACh.

De manera consistente con los resultados presentados en la **Figura 36** y la **Tabla X** que fueron recientemente publicados en Wedemeyer, Vattino et al., 2018, sumados las evidencias previas de nuestro laboratorio en la sinapsis transitoria MOC-CCI (Taranda et al., 2009), las eIPSCs de la sinapsis MOC-CCE en ratones *L9'T* presentaron una cinética significativamente más prolongada que las eIPSCs de los *wt*, con un consecuente aumento en la carga acumulada frente a cada evento sináptico. Este efecto estaría relacionado a las consecuencias de la mutación puntual sobre el TM2 de la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$, que tapiza el poro de canal. De esta manera, el receptor mutado tiene modificadas las propiedades de gatillado, lo que provoca un aumento en el tiempo de apertura del canal y una mayor probabilidad de apertura espontánea. Esto indicaría que el estado abierto del canal con la mutación *L9'T* se encuentra favorecido, determinando una desensibilización más lenta de las corrientes evocadas por ACh (Plazas et al., 2005a) y una mayor entrada de Ca^{2+} a las células ciliadas, que se evidencia por la presencia de eventos transitorios de Ca^{2+} más prolongados en la sinapsis MOC-CCI (Wedemeyer, Vattino et al., 2018).

Los cambios observados en la cinética de las respuestas individuales impactan también en las respuestas de la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T* frente a protocolos de estimulación repetitiva, lo que se evidencia en una mayor carga total asociada a estos eventos, en conjunto con corrientes más lentas, pero más prolongadas. Este resultado es coherente con los experimentos de activación de las fibras MOC *in vivo* (Wedemeyer, Vattino et al., 2018), aunque en estos últimos el efecto es más

pronunciado y duradero que lo observado a nivel de una sinapsis individual. Esto es consistente con un aumento en la ganancia del sistema eferente y con una mayor protección frente al trauma acústico en este modelo animal (Taranda et al., 2009). El correlato sináptico de este tipo de experimentos es sumamente difícil de obtener, ya que una estimulación de 200 Hz por 70 segundos comprometería la estabilidad del registro electrofisiológico en las CCEs. Por ello se realizaron, a modo de aproximación, experimentos a 80 Hz durante 10 segundos y, en consistencia con lo reportado *in vivo*, se observaron respuestas sinápticas más sostenidas en el tiempo para los ratones *L9'T*, las que determinan hiperpolarizaciones más duraderas en las CCEs y en consecuencia una menor capacidad de amplificar los sonidos. Si bien estos experimentos parecen ser una buena aproximación experimental para los resultados obtenidos *in vivo*, resulta pertinente destacar las diferencias entre ambas condiciones. En primer lugar, los experimentos *in vivo* involucran la actividad de múltiples CCEs (Lukashkin et al., 2002), mientras que en los experimentos de fisiología sináptica solamente se estudia la actividad de una sinapsis MOC-CCE individual. En segundo lugar, dado que se utilizó un estímulo sonoro de 22.6 kHz, las mediciones realizadas *in vivo* corresponden a la actividad de CCEs en la porción medial de la cóclea, donde la inervación MOC es más densa (Maison et al., 2003a). En cambio, debido a limitaciones experimentales, los registros electrofisiológicos en el explanto coclear se realizan a partir de CCEs en la región apical. En tercer lugar, los experimentos *in vivo* se realizan a temperatura fisiológica, mientras que los experimentos sinápticos se desarrollaron a temperatura ambiente, dada la dificultad técnica de los mismos. Por último, también resulta fundamental destacar que los experimentos *in vivo* se realizan sobre ratones adultos, mientras que los experimentos de fisiología sináptica aquí presentados fueron llevados a cabo a P11-13, alrededor del comienzo de la audición. A la luz de los resultados presentados en el Capítulo I, sería esperable que la dinámica de la sinapsis MOC-CCE de los animales transgénicos adultos presente diferencias con lo que se describe en esta sección. En conjunto, todas estas diferencias limitan la extrapolación de las conclusiones que podemos sacar a partir de lo que se observa en una única respuesta MOC-CCE, respecto de la actividad del sistema eferente de un animal adulto.

Además de la modificación en la cinética de la respuesta sináptica, los experimentos realizados evidenciaron una disminución en el contenido cuántico y la probabilidad de liberación vesicular de la sinapsis MOC-CCE de ratones *L9'T*, respecto de los *wt*, algo que también se observó en la sinapsis MOC-

CCI (Wedemeyer, Vattino et al., 2018) y que había sido estudiado previamente (Taranda et al., 2009). Este resultado fue sorprendente, puesto que los parámetros que determinan el contenido cuántico son típicamente presinápticos (Bennett y Kearns, 2000), lo que implicaría que la mutación en el nAChR postsináptico indujo, de alguna manera, cambios en el terminal presináptico. Esta idea fue respaldada por los resultados obtenidos en experimentos de pulsos pareados y de trenes de estimulación de diez pulsos utilizados para describir los patrones de plasticidad sináptica. En concordancia con resultados previos del laboratorio (Ballestero et al., 2011) y con los del Capítulo I, se observó que los animales *wt* de P11-13 presentan facilitación de corto término frente a frecuencias de estimulación de 40 Hz, mientras que en los *L9'T* se encontró que la facilitación estaba exacerbada: por un lado, a 40 Hz resultó significativamente mayor que en los *wt*, y por otro, únicamente en la sinapsis MOC-CCE de los ratones *L9'T* se observó facilitación a 20 Hz. Estos resultados son coherentes con la idea de que la plasticidad de corto término depende de la magnitud de la fuerza sináptica, y que estas diferencias pueden explicarse por factores presinápticos (Murthy et al., 1997; Jackman y Regehr, 2017). Sin embargo, aún resta determinar a qué nivel de la presinapsis se encontrarían las modificaciones que podrían haber inducido los nAChRs postsinápticos con la mutación *L9'T*.

Se han reportado alteraciones morfológicas en distintos modelos transgénicos que afectan la sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas de ratones. Por ejemplo, en modelos de animales que carecen de los canales de K^+ SK2 se ha demostrado que la ausencia de funcionalidad de la sinapsis eferente sobre las CCEs deriva en cisternas sinaptoplásmicas más pequeñas, y terminales MOC presinápticos reducidos que degeneran hasta desaparecer (Murthy et al., 2009a; Fuchs et al., 2014). De manera similar, los ratones que carecen de la subunidad $\alpha 9$ o $\alpha 10$ en el nAChR que media la sinapsis eferente presentan menos contactos sinápticos sobre las CCEs, con botones sinápticos de tamaño reducido y una inervación eferente desorganizada (Vetter et al., 1999, 2007). También se ha descrito que los ratones *L9'T* presentan alteraciones morfológicas, a nivel de la cisterna sinaptoplásmica, cuyo volumen es mayor que en los ratones *wt* (Fuchs et al., 2014), y también a nivel presináptico, donde los botones sinápticos de las fibras MOC que contactan a las CCEs son más grandes, a la vez que hay más contactos por cada CCE, de manera que la superficie sináptica total sobre las CCEs es mayor (Murthy et al., 2009b). Esto podría impactar en el funcionamiento de la maquinaria presináptica encargada de la

liberación de ACh y justificar las variaciones en el contenido cuántico y la plasticidad de corto término observadas en los animales *L9'T*. Si bien podría haber múltiples modificaciones involucradas, una explicación plausible para entender lo que podría estar sucediendo es considerar que los cambios morfológicos observados en las fibras MOC alteren, de alguna manera, la población de vesículas que conforman el RRP en estas fibras. Considerando las evidencias que vinculan el tamaño del RRP con las propiedades de la transmisión sináptica (Thanawala y Regehr, 2013; Kearney et al., 2019), se intentó medir el tamaño de este conjunto de vesículas, típicamente anclado a los sitios activos, tal como se hizo en el Capítulo I. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, ya que la cinética lenta de las respuestas sinápticas a frecuencias altas en el *knock-in* resulta en un fenómeno de sumación postsináptica más prolongado que en los animales *wt*, lo que dificulta definir un estado estacionario en la liberación de neurotransmisor, paso fundamental para el correcto análisis del protocolo usado para medir el RRP. Otra posibilidad a considerar es que los cambios morfológicos observados impacten en la distribución de los CCDVs y canales BK que sostienen y/o modulan la liberación de ACh en los terminales MOC. Este tipo de cambios a su vez pueden alterar la fuerza sináptica, lo que podría traducirse en la disminución de la probabilidad de liberación observada y por ende en los patrones de plasticidad de corto término (Taschenberger et al., 2002; Fedchyshyn y Wang, 2005; Jackman y Regehr, 2017).

Los experimentos de pulsos pareados en presencia de BAPTA intracelular y $V_s = -82$ mV en ratones *L9'T* permitieron confinar la respuesta postsináptica a la corriente a través de los nAChR, evitando la activación de los canales de K^+ SK2. El hecho de que la facilitación exacerbada se mantuviera en estas condiciones experimentales apoya la idea de que el fenómeno observado es presináptico. No obstante, se ha demostrado a través de microscopía electrónica que la cisterna sinaptoplásmica de los ratones *L9'T* presenta un volumen significativamente mayor que la de los *wt* (Fuchs et al., 2014), lo que permitiría especular que, en estos animales, la misma podría contribuir diferencialmente a la respuesta sináptica. Si este fuera el caso, su efecto debería ser sobre los canales SK2 (Lioudyno et al., 2004), cuya contribución fue neutralizada en las condiciones experimentales empleadas. Además, la menor desensibilización reportada para los nAChRs *L9'T* (Plazas et al., 2005a) podría contribuir a los fenómenos que se describen en este trabajo. De hecho, estudios realizados en el calyx de Held demostraron que a frecuencias de estimulación mayores a 10 Hz la desensibilización de los receptores

de glutamato exagera el efecto de depresión de corto término y puede incluso enmascarar un efecto de facilitación (Wong et al., 2003). Más aún, esta menor desensibilización explicaría la respuesta sináptica más prolongada que presentan las sinapsis MOC-CCE y MOC-CCI de los ratones L9'T (Taranda et al., 2009; Wedemeyer, Vattino et al., 2018). Este escenario podría complementarse con el hecho de que la colina, subproducto de la de ACh luego de ser hidrolizada por la acetilcolinesterasa presente en la brecha sináptica, active el nAChR en eventos subsiguientes a su apertura por ACh, ya que a diferencia de lo que ocurre en los nAChRs de ratones *wt*, en los nAChRs de animales L9'T funciona como agonista total (Plazas et al., 2005a).

A pesar de que los resultados obtenidos sugieren que la mutación en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ determina cambios a nivel presináptico, aún resta determinar cuáles podrían ser los mecanismos involucrados. Una posibilidad a considerar es la existencia de una señal retrógrada que, a partir de una alteración postsináptica, sea capaz de modificar la estructura presináptica y su funcionamiento, algo que ha sido demostrado tanto en invertebrados como en vertebrados (Davis y Müller, 2015). Por un lado, se ha demostrado la existencia de una señal de este tipo en la placa neuromuscular de *Drosophila melanogaster*, que le permite a la presinapsis ajustar la cantidad de neurotransmisor liberado en función de la densidad de inervaciones que reciben las fibras musculares postsinápticas (Petersen et al., 1997; Davis y Goodman, 1998). Por otro lado, en la sinapsis colinérgica del ganglio cervical superior, en vertebrados, se evidenció la existencia de una señal retrógrada mediante el uso de un ratón transgénico que carece del nAChR $\alpha 3$, encargado de mediar la respuesta sináptica (Krishnaswamy y Cooper, 2009). En este estudio, se demostró que el rescate de la expresión del nAChR $\alpha 3$ induce un aumento dependiente de la actividad sináptica en la expresión de un transportador de colina presináptico, cuyo efecto se evidencia una semana luego del tratamiento. Sin embargo, en ninguno de estos casos se ha podido determinar aún la naturaleza de la señal retrógrada involucrada. En este sentido, el óxido nítrico es un candidato recurrente, ya que se ha demostrado que puede estar involucrado en mecanismos de señalización retrógrada en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas (Hardingham et al., 2013). Su presencia puede determinar cambios en el tamaño del RRP (Ratnayaka et al., 2012), estar acoplada al reciclado vesicular (Steinert et al., 2008), regular la actividad de CCDVs de tipo N mediante segundos mensajeros (Huang et al., 2003) y también aumentar la facilitación sináptica

de corto término mediante modificaciones en las proteínas que integran la maquinaria de fusión celular y, en particular, sobre Munc-18-1 (Palmer et al., 2008), actor fundamental en la regulación de la plasticidad de corto término (Genç et al., 2014). En lo que respecta al sistema auditivo periférico, se ha demostrado que el óxido nítrico puede modular la fuerza sináptica en la sinapsis transitoria MOC-CCI de ratas, alterando en consecuencia la plasticidad de corto término (Kong et al., 2013). Más aún, se ha reportado que dicho compuesto puede aumentar las corrientes de K^+ mediadas por canales de tipo BK presinápticos (Klyachko et al., 2001). Teniendo en cuenta los resultados del Capítulo I en los que demostramos que los canales BK modulan negativamente la liberación, resulta plausible pensar que, de existir señalización retrógrada mediada óxido nítrico, ésta podría aumentar el efecto de los canales BK sobre la liberación de ACh, provocando una disminución en la misma y por ende un aumento en la facilitación. Por estos motivos, no podemos descartar que este compuesto intervenga en los fenómenos aquí descritos y su posible participación deberá ser considerada para futuros experimentos.

Resulta interesante destacar que los mecanismos de señalización retrógrada usualmente involucrados en la regulación presináptica se enmarcan en procesos de plasticidad homeostática, que produce cambios compensatorios dependientes de la actividad. En este sentido, las consecuencias de la mutación $L9'T$ resultan ambiguas desde el punto de vista homeostático. Por un lado, la disminución en la probabilidad inicial de liberación de las fibras MOC frente a un aumento en la ganancia del nAChR postsináptico va en línea con la hipótesis homeostática. Por otro lado, la disminución en la probabilidad de liberación determina, de manera esperable, un aumento en la facilitación presináptica (**Figura 30**; **Figura 32**). Teniendo en cuenta que este fenómeno se observa a frecuencias de estimulación en el rango fisiológico en el que funcionan las fibras MOC (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989) y que las respuestas sinápticas de los ratones $L9'T$ presentan una mayor transferencia de carga frente a la estimulación repetitiva (**Figura 33**), esto implicaría que en estas condiciones podría entrar mucho Ca^{2+} a las CCEs. De hecho, la **Figura 37** confirma que frente a la estimulación repetitiva de las fibras MOC, las CCIs de los ratones $L9'T$ presentan señales de Ca^{2+} más prolongadas. Este efecto sería perjudicial para la célula y por ende iría en contra de un cambio homeostático en estos animales, ya que el Ca^{2+} intracelular en elevadas concentraciones puede comprometer la estabilidad celular (Fettiplace y Nam, 2018). No obstante, el hecho de que los ratones $L9'T$ tengan cisternas

sinaptoplásmicas de mayor volumen sí puede considerarse un cambio homeostático (Fuchs et al., 2014), ya que éstas tienen la capacidad de contribuir a la compartimentalización del Ca^{2+} entrante (Moglie et al., 2018), algo que podría ser determinante para la estabilidad de las CCI y CCEs de los ratones *L9'T*.

Por último, se ha demostrado que la ausencia de la subunidad $\alpha 9$ del nAChR $\alpha 9\alpha 10$, y por ende de toda actividad eferente sobre el órgano de Corti, implica cambios tonotópicos y funcionales a nivel del SNC (Clause et al., 2014, 2017), sugiriendo un importante rol de la regulación eferente antes del comienzo de la audición. En línea con estas evidencias, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que en los animales *L9'T* también ocurren cambios a nivel del SNC (Di Guilmi et al., 2018). De hecho, como muestra la **Figura 38** que en este modelo animal el silenciamiento de los potenciales de acción en las CCI antes del comienzo de la audición es más eficiente (Wedemeyer, Vattino et al., 2018). En suma, nuestras evidencias sugieren que una ganancia de función en el sistema eferente tiene consecuencias funcionales determinantes para la actividad sináptica inhibitoria sobre las CCEs, explicando parcialmente el fenómeno macroscópico de protección frente al trauma acústico en respuesta a sonidos de intensidad elevada.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo postnatal del sistema nervioso tienen lugar diversos procesos que ocurren en ventanas de tiempo discretas y que dan forma a los circuitos neuronales de los animales adultos. Los cambios que se producen en dichos períodos incluyen modificaciones tanto a nivel morfológico como en las propiedades de la transmisión sináptica, y moldean, en última instancia, la actividad que de los circuitos que integran el sistema nervioso maduro (Hensch, 2005; Spitzer, 2006; Sanes y Bao, 2009). El sistema auditivo periférico no es una excepción a este tipo de procesos. Durante los primeros días de vida de los roedores altriciales atraviesan cambios significativos en la inervación sobre el órgano de Corti que son cruciales para el funcionamiento del sistema auditivo durante la madurez (Simmons, 2002; Bulankina y Moser, 2012). En particular, el desarrollo de la inervación MOC sobre las CCI y CCE del órgano de Corti es un sistema interesante, adecuado y de fácil abordaje para estudiar estos procesos. La maduración final del epitelio auditivo de mamíferos involucra un activo proceso de remodelación sináptica que consta de un establecimiento inicial de contactos sinápticos de las fibras MOC con las CCI, un establecimiento más tardío de contactos sinápticos con las CCE y una retracción final de las sinapsis formadas con las CCI, alrededor del comienzo de la audición (Simmons, 2002; Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

Como se demostró en el Capítulo I de esta Tesis, durante el desarrollo postnatal de ratones la sinapsis entre las fibras MOC y las CCE presenta importantes modificaciones en sus propiedades. Alrededor del comienzo de la audición, como fuera demostrado anteriormente por nuestro laboratorio (Ballesteros et al., 2011), esta sinapsis se caracteriza por presentar facilitación de corto término, fenómeno característico en los circuitos neuronales durante el desarrollo postnatal (Hübener y Bonhoeffer, 2014). Al madurar, este comportamiento se ve significativamente disminuido en la sinapsis MOC-CCE, en paralelo a un aumento en la fuerza sináptica y modificaciones en los CCDVs que sostienen la liberación de ACh en los terminales MOC. Resulta interesante destacar que en la sinapsis transitoria MOC-CCI se han encontrado cambios muy similares (Kearney et al., 2019), apoyando la idea de un origen común para ambas inervaciones (Simmons et al., 1996). En el futuro, sería interesante analizar

la contribución de cada uno de los distintos tipos de CCDVs en la transmisión sináptica, y en particular, en la plasticidad de corto término.

La regulación de la fuerza sináptica resulta crucial en la transmisión de la información en el sistema nervioso, ya que dicho parámetro permite la adaptación de los circuitos a los cambios en el entorno. La sinapsis MOC-CCE presenta una regulación presináptica en, al menos, dos niveles diferentes. En primer lugar, hemos demostrado una regulación mediada por canales de K^+ de tipo BK presinápticos, que debido a su acople funcional a CCDVs de tipo L modularían el ancho del potencial de acción en ambos períodos del desarrollo analizados. Este mecanismo puede ser de particular importancia durante la actividad sináptica de alta frecuencia, que conlleva una mayor entrada de Ca^{2+} a los terminales presinápticos, gatillando con mayor eficacia la actividad de los canales BK, que dependen tanto del potencial de membrana como de la presencia de este catión. Esto sería altamente relevante en la sinapsis MOC-CCE, ya que la inhibición de la función auditiva mediada por este sistema es altamente dependiente de la frecuencia de estimulación de las fibras MOC (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan Jr., 1987; Brown, 1989). Además, teniendo en cuenta las evidencias halladas que sugieren cambios en la compartimentalización de la actividad mediada por los CCDVs de tipo L y los canales BK durante el desarrollo postnatal, resultará de vital importancia a futuro estudiar sus posibles implicancias sobre la regulación del disparo de potenciales de acción. En este sentido, si bien no se ha logrado establecer completamente el registro de los terminales presinápticos MOC, se han sentado las bases para este tipo de estudios que deberán ser profundizados en el futuro. En segundo lugar, hemos demostrado que durante ambos períodos del desarrollo analizados, la liberación de ACh también se encuentra regulada por la presencia de receptores presinápticos de tipo $GABA_B$. Si bien nuestros resultados son contundentes, aún resta determinar el origen del GABA, razón por la cual en nuestro laboratorio ya se están realizando estudios para comprobar un posible mecanismo de co-liberación de ACh y GABA desde las fibras MOC.

El Capítulo II de este trabajo consistió en estudiar las implicancias sobre la transmisión sináptica entre las fibras MOC y las CCEs de una mutación puntual en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$, que le confiere al mismo una ganancia de función. Para ello se empleó un modelo transgénico desarrollado por nuestro

laboratorio, en el que se demostró que la introducción de dicha mutación aumenta la protección de los ratones frente al trauma acústico por exposición a sonidos de alta intensidad (Taranda et al., 2009; Boero et al., 2018), en concordancia con la relevancia del sistema MOC en este tipo de procesos (Liberman, 1991; Rajan, 2000; Maison et al., 2002). Los resultados aquí presentados demuestran que la sinapsis MOC-CCE de ratones transgénicos *L9'T* presenta una menor fuerza sináptica acompañada por una potenciación de los mecanismos de facilitación de corto término, con respecto a los ratones *wt*. Más aún, hemos demostrado que el origen de estas diferencias se explica por factores presinápticos, lo que nos permite plantear que, durante el desarrollo postnatal de los ratones *L9'T*, ocurren cambios importantes en los terminales de las fibras MOC. Si bien estos resultados son consistentes con evidencias previas que indican cambios morfológicos en los terminales MOC (Murthy et al., 2009b), aún desconocemos la naturaleza de las señales involucradas en estas modificaciones, y cómo podrían impactar en las propiedades de la transmisión sináptica. Por otra parte, la inhibición exacerbada sobre la amplificación mediada por las CCEs podría explicarse a través de las corrientes más prolongadas observadas en los ratones transgénicos. Sin embargo, dicha explicación podría ser incompleta, dado que los experimentos de fisiología sináptica fueron realizados a P11-13, estadio correspondiente al momento del comienzo de la audición, y los experimentos in vivo que permiten evaluar la funcionalidad del sistema MOC se realizaron en animales adultos. Teniendo en cuenta las evidencias encontradas en el Capítulo I acerca de los cambios que ocurren en la transmisión sináptica durante el desarrollo postnatal, sería interesante evaluar qué ocurre con la plasticidad de corto término de ratones *L9'T* a P20-22, estadio de mayor madurez en el sistema auditivo.

Bibliografía

- Abe T, Kakehata S, Kitani R, Maruya SI, Navaratnam D, Santos-Sacchi J, Shinkawa H (2007) Developmental expression of the outer hair cell motor prestin in the mouse. *J Membr Biol* 215:49–56.
- Adams PR, Constanti A, Brown DA, Clark RB (1982) Intracellular Ca²⁺ activates a fast voltage-sensitive K⁺ current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature* 296:746–749.
- Adler EM, Augustine GJ, Duffy SN, Charlton MP (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 11:1496–1507.
- Art JJ, Fettiplace R, Fuchs PA (1984) Synaptic hyperpolarization and inhibition of turtle cochlear hair cells. *J Physiol* 356:525–550.
- Ashmore JF (1987) A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol*:323–347.
- Ashmore JF (2008) Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Physiol Rev*:173–210.
- Atluri PP, Regehr WG (1996) Determinants of the Time Course of Facilitation at the Granule Cell to Purkinje Cell Synapse. *J Neurosci* 16:5661–5671.
- Augustine GJ (2001) How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 11:320–326.
- Babola TA, Li S, Gribizis A, Lee BJ, Issa JB, Wang HC, Crair MC, Bergles DE (2018) Homeostatic Control of Spontaneous Activity in the Developing Auditory System. *Neuron* 99:511–524.
- Bain AI, Quastel DMJ (1992) Multiplicative and additive Ca²⁺-dependent components of facilitation at mouse endplates. *J Physiol* 455:383–405.
- Ballesteros J, Zorrilla de San Martín J, Goutman JD, Elgoyhen AB, Fuchs PA, Katz E (2011) Short-term synaptic plasticity regulates the level of olivocochlear inhibition to auditory hair cells. *J Neurosci* 31:14763–14774.
- Ballesteros A, Fenollar-ferrer C, Swartz KJ (2018) Structural relationship between the putative hair cell mechanotransduction channel TMC1 and TMEM16 proteins. *Elife*:1–26.
- 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.

- Bennett MR, Kearns JL (2000) Statistics of transmitter release at nerve terminals. *Prog Neurobiol* 60:545–606.
- Benson TE, Brown MC (2004) Postsynaptic targets of type II auditory nerve fibers in the cochlear nucleus. *J Assoc Res Otolaryngol* 5:111–125.
- Berglund AM, Ryugo DK (1987) Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J Comp Neurol* 255:560–570.
- Berkefeld H, Fakler B (2008) Repolarizing responses of BKCa-Cav complexes are distinctly shaped by their Cav subunits. *J Neurosci* 28:8238–8245.
- Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schultes U, Fakler B (2006) BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* (80-) 314:615–620.
- 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, Kim KX, Fettiplace R (2014) Conductance and block of hair-cell mechanotransducer channels in transmembrane channel-like protein mutants. *J Gen Physiol* 144:55–69.
- Beutner D, Moser T (2001) The Presynaptic Function of Mouse Cochlear Inner Hair Cells during Development of Hearing. *J Neurosci* 21:4593–4599.
- Birks R, MacIntosh FC (1961) Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Can J Biochem Physiol* 39:787–827.
- Blanchet C, Eróstegui C, Sugasawa M, Dulon D (1996) Acetylcholine-Induced Potassium Current of Guinea Pig Outer Hair Cells: Its Dependence on a Calcium Influx through Nicotinic-Like Receptors. *J Neurosci* 16:2574–2584.
- 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.
- Blioch ZL, Glagoleva I, Liberman EA, Nenashev VA (1968) A study of the mechanism of quantal transmitter release at a chemical synapse. *J Physiol* 199:11–35.
- Bloodgood BL, Sabatini BL (2007) Nonlinear Regulation of Unitary Synaptic Channels Located in Dendritic Spines. *Neuron* 53:249–260.
- Boero LE, Castagna VC, Di Guilmi MN, Goutman JD, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME (2018)

- Enhancement of the medial olivocochlear system prevents hidden hearing loss. *J Neurosci* 38:7440–7451.
- Borst JGG, Sakmann B (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383:431–434.
- 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 $\alpha 1E$ (CaV2.3) calcium channels. *Biophys J* 81:79–88.
- Bowery NG, Smart TG (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: A brief history. *Br J Pharmacol* 147:109–119.
- Brown MC (1987) Morphology of labeled afferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol* 260:591–604.
- Brown MC (1989) Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. *Hear Res* 40:93–109.
- Brown MC (2014) Single-unit labeling of medial olivocochlear neurons: the cochlear frequency map for efferent axons. *J Neurophysiol* 111:2177–2186.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, De Ribaupierre Y (1985) Evoked Mechanical Responses of Isolated Cochlear Outer Hair Cells. *Science* 227:194–196.
- Bulankina A V, Moser T (2012) Neural Circuit Development in the Mammalian Cochlea. *Physiology* 27:100–112.
- Buño W (1978) Auditory nerve fiber activity influenced by contralateral ear sound stimulation. *Exp Neurol* 59:62–74.
- Castellano-Muñoz M, Israel SH, Hudspeth a J (2010) Efferent control of the electrical and mechanical properties of hair cells in the bullfrog's sacculus. *PLoS One* 5:e13777.
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Chamberland S, Tóth K (2016) Functionally heterogeneous synaptic vesicle pools support diverse synaptic signalling. *J Physiol* 594:825–835.
- Chan DK, Hudspeth AJ (2005) Ca²⁺ current-driven nonlinear amplification by the mammalian cochlea in vitro. *Nat Neurosci* 8:149–155.
- Charlton BYMP, Smithtt SJ, Zuckert RS (1982) Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic

- facilitation and depression at the squid giant synapse. *J Physiol* 323:173–193.
- Chen C, Regehr WG (1999) Contributions of Residual Calcium to Fast Synaptic Transmission. *J Neurosci* 19:6257–6266.
- Chen Z, Das B, Nakamura Y, DiGregorio DA, Young SM (2015) Ca²⁺ channel to synaptic vesicle distance accounts for the readily releasable pool kinetics at a functionally mature auditory synapse. *J Neurosci* 35:2083–2100.
- Cheung G, Jupp OJ, Cousin MA (2010) Activity-Dependent Bulk Endocytosis and Clathrin-Dependent Endocytosis Replenish Specific Synaptic Vesicle Pools in Central Nerve Terminals. *J Neurosci* 30:8151–8161.
- Clause A, Kim G, Sonntag M, Weisz CJC, Vetter DE, Rubsamen 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.
- Cole KS, Robertson D (1992) Early efferent innervation of the developing rat cochlea studied with a carbocyanine dye. *Brain Res* 575:223–230.
- Cooper NP, Guinan Jr JJ (2006) Efferent-mediated control of basilar membrane motion. *J Physiol* 576:49–54.
- Corns LF, Johnson SL, Kros CJ, Marcotti W (2014) Calcium entry into stereocilia drives adaptation of the mechano-electrical transducer current of mammalian cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14918–14923.
- Corringer PJ, Poitevin F, Prevost MS, Sauguet L, Delarue M, Changeux JP (2012) Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: From bacteria to brain. *Structure* 20:941–956.
- Couperus JW, Mangun GR (2010) Signal enhancement and suppression during visual-spatial selective attention. *Brain Res* 1359:155–177.
- Dai B, Chen C, Long Y, Zheng L, Zhao H, Bai X, Liu W, Zhang Y, Liu L, Guo T, Ding G, Lu C (2018) Neural mechanisms for selectively tuning in to the target speaker in a naturalistic noisy situation. *Nat Commun* 9.

- Dallos P (1985) Response characteristics of mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 5:1591–1608.
- Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575–4585.
- Dallos P (1996) *Springer Handbook of Auditory Research - Volume 8 - The Cochlea*. New York: Springer-Verlag, New York Inc.
- Dallos P (2008) Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr Opin Neurobiol* 18:370–376.
- Dallos P, Santos-Sacchi J, Flock Å (1982) Intracellular recordings from cochlear outer hair cells. *Science* 218:582–584.
- Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WHY, Sengupta S, He DZZ, Zuo J (2008) Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron* 58:333–339.
- Davis GW, Goodman CS (1998) Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature* 392:82–86.
- Davis GW, Müller M (2015) Homeostatic Control of Presynaptic Neurotransmitter Release. *Annu Rev Physiol* 77:251–270.
- Davis H (1983) An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* 9:79–90.
- Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 491:163–176.
- Del Castillo J, Katz B (1954a) Quantal Components of the End-Plate Potential. *J Physiol* 124:560–573.
- Del Castillo J, Katz B (1954b) Statistical Factors Involved in Neuromuscular Facilitation and Depression. *J Physiol* 124:574–585.
- Del Castillo J, Katz B (1954c) The Effect of Magnesium on the Activity of Motor Nerve Endings. *J Physiol*:553–559.
- Delacroix L, Malgrange B (2015) Cochlear afferent innervation development. *Hear Res* 330:157–169.
- Delaney KR, Tank DW (1994) A quantitative measurement of the dependence of short-term synaptic enhancement on presynaptic residual calcium. *J Neurosci* 14:5885–5902.
- Delano PH, Elgueda D, Hamame CM, Robles L (2007) Selective Attention to Visual Stimuli Reduces Cochlear Sensitivity in Chinchillas. *J Neurosci* 27:4146–4153.
- Deng PY, Rotman Z, Blundon JA, Cho Y, Cui J, Cavalli V, Zakharenko SS, Klyachko VA (2013) FMRP

Regulates Neurotransmitter Release and Synaptic Information Transmission by Modulating Action Potential Duration via BK Channels. *Neuron* 77:696–711.

Denker A, Bethani I, Kröhnert K, Körber C, Horstmann H, Wilhelm BG, Barysch S V, Kuner T, Neher E, Rizzoli SO (2011) A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17177–17182.

Dewey JB, Xia A, Müller U, Belyantseva IA, Applegate BE, Oghalai JS (2018) Mammalian Auditory Hair Cell Bundle Stiffness Affects Frequency Tuning by Increasing Coupling along the Length of the Cochlea. *Cell Rep* 23:2915–2927.

Di Guilmi MN, Boero LE, Castagna VC, Rodriguez-Contreras A, Wedemeyer C, Gomez-Casati ME, Elgoyhen AB (2018) Strengthening of the efferent olivocochlear system leads to synaptic dysfunction and tonotopy disruption of a central auditory nucleus. *bioRxiv*.

Ding N, Simon JZ (2013) Adaptive Temporal Encoding Leads to a Background-Insensitive Cortical Representation of Speech. *J Neurosci* 33:5728–5735.

Dodge FA, Rahamimoff R (1967) Co-operative Action of Calcium Ions in Transmitter Release at the Neuromuscular Junction. *J Physiol*:419–432.

Doering CJ, Zamponi GW (2003) Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491–505.

Dulon D, Luo L, Zhang C, Ryan AF (1998) Expression of small-conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 10:907–915.

Echteler SM (1992) Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6324–6327.

Eckrich T, Blum K, Milenkovic I, Engel J (2018) Fast Ca²⁺ Transients of Inner Hair Cells Arise Coupled and Uncoupled to Ca²⁺ Waves of Inner Supporting Cells in the Developing Mouse Cochlea. *Front Mol Neurosci* 11:1–16.

Ehret G (1976) Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *J Am Audiol Soc* 1:179–184.

Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705–715.

Elgoyhen AB, Katz E (2012) The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris* 106:47–

56.

- Elgoyhen AB, 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.
- Elmqvist D, Quastel D (1965) A Quantitative Study of End-Plate Potentials in Isolated Human Muscle. *J Physiol* 178:505–529.
- ErosteGUI C, Nenov AP, Norris CH, Bobbin RP (1994a) Acetylcholine activates a K⁺ conductance permeable to Cs⁺ in guinea pig outer hair cells. *Hear Res* 81:119–129.
- ErosteGUI C, Norris CH, Bobbin RP (1994b) In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hear Res* 74:135–147.
- Evans BN, Dallos P (1993) Stereocilia displacement induced somatic motility of cochlear outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8347–8351.
- Evans MG (1996) Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J Physiol*:563–578.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309–373.
- Fakler B, Adelman JP (2008) Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59:873–881.
- Fatt P, Katz B (1950) Some observations on biological noise. *Nature* 166:597–598.
- Fatt P, Katz B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109–128.
- Fedchyshyn MJ, Wang L-Y (2005) Developmental Transformation of the Release Modality at the Calyx of Held Synapse. *J Neurosci* 25:4131–4140.
- Felmy F, Neher E, Schneggenburger R (2003) Probing the Intracellular Calcium Sensitivity of Transmitter Release during Synaptic Facilitation. *Neuron* 37:801–811.
- Fettiplace R (2017) Hair cell transduction, tuning, and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Compr Physiol* 7:1197–1227.
- Fettiplace R, Kim KX (2014) The Physiology of Mechanoelectrical Transduction Channels in Hearing. *Physiol Rev* 94:951–986.
- Fettiplace R, Nam J (2018) Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells. *Hear Res*.

- Findeisen F, Minor DL (2010) Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation. *Channels* 4:459–474.
- Flink MT, Atchison WD (2003) Iberiotoxin-Induced Block of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Induces Dihydropyridine Sensitivity of ACh Release from Mammalian Motor Nerve Terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 305:646–652.
- 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*:1–7.
- Fortune ES, Rose GJ (2001) Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci* 24:17–19.
- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* 394:149–172.
- Frank G, Hemmert W, Gummer AW (1999) Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4420–4425.
- Fredj N Ben, Burrone J (2009) A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nat Neurosci* 12:751–758.
- Fritz JB, Elhilali M, David S V, Shamma SA (2007) Auditory attention - focusing the searchlight on sound. *Curr Opin Neurobiol* 17:437–455.
- Fritzsche B (1996) Development of the labyrinthine efferent system. *Ann N Y Acad Sci* 781:21–33.
- Froud KE, Wong ACY, Cederholm JME, Klugmann M, Sandow SL, Julien J-P, Ryan AF, Housley GD (2015) Type II spiral ganglion afferent neurons drive medial olivocochlear reflex suppression of the cochlear amplifier. *Nat Commun* 6:7115.
- Fuchs PA (2005) Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *J Physiol* 566:7–12.
- Fuchs PA (2014) A “calcium capacitor” shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells. *J Physiol* 592:3393–3401.
- Fuchs PA, Glowatzki E (2015) Synaptic studies inform the functional diversity of cochlear afferents. *Hear Res* 330:18–25.
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452–458.

- Fuchs PA, Lauer AM (2018) Efferent Inhibition of the Cochlea. *Cold Spring Harb Perspect Med*: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.
- Fuchs PA, Murrow BW (1992a) Cholinergic Cochlea Inhibition of Short (Outer) Hair Cells of the Chick's Cochlea. *J Neurosci* 12:800–809.
- Fuchs PA, Murrow BW (1992b) A novel cholinergic receptor mediates inhibition of chick cochlear hair cells. *Proc R Soc London - Biol Sci* 248:35–40.
- Fujino K, Koyano K, Ohmori H (1997) Lateral and medial olivocochlear neurons have distinct electrophysiological properties in the rat brain slice. *J Neurophysiol* 77:2788–2804.
- Gabashvili IS, Sokolowski BHA, Morton CC, Giersch ABS (2007) Ion channel gene expression in the inner ear. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol* 8:305–328.
- Galambos R (1956) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 5:424–437.
- Gale JE, Ashmore JF (1997) An intrinsic frequency limit to the cochlear amplifier. *Nature* 389:63–66.
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083–11090.
- Gassmann M, Bettler B (2012) Regulation of neuronal GABAB receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci* 13:380–394.
- Genç Ö, Kochubey O, Toonen RF, Verhage M, Schneggenburger R (2014) Munc18-1 is a dynamically regulated PKC target during short-term enhancement of transmitter release. *Elife* 3:1–19.
- Gifford ML, Guinan Jr. JJ (1987) Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear Res* 29:179–194.
- Gitter AH, Zenner HP (1992) γ -Aminobutyric acid receptor activation of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 249:62–65.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2000) Cholinergic Synaptic Inhibition of Inner Hair Cells in the Neonatal Mammalian Cochlea. *Science (80-)* 288:2366–2368.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147–

154.

- Gogos JA, Osborne J, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (2000) Genetic Ablation and Restoration of the Olfactory Topographic Map. *Cell* 103:609–620.
- Gold T (1948) Hearing. II. The Physical Basis of the Action of the Cochlea. *Proc R Soc B Biol Sci* 135:492–498.
- Gomez-Casati ME, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Katz E (2005) Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *J Physiol* 566:103–118.
- Gorbunov D, Sturlese M, Nies F, Kluge M, Bellanda M, Battistutta R, Oliver D (2014) Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters. *Nat Commun* 5.
- Goutman JD, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME (2015) Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. *FEBS Lett*.
- 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.
- 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.
- Griguoli M, Sgritta M, Cherubini E (2016) Presynaptic BK channels control transmitter release: physiological relevance and potential therapeutic implications. *J Physiol* 594:3489–3500.
- Grunnet M, Kaufmann WA (2004) Coassembly of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in rat brain. *J Biol Chem* 279:36445–36453.
- 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, Warr WB, Norris BE (1983) Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 221:358–370.
- Guinan Jr. JJ (2006) Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear* 27:589–607.
- Hang J, Pan W, Chang A, Li S, Li C, Fu M, Tang J (2016) Synchronized Progression of Prestin Expression and Auditory Brainstem Response during Postnatal Development in Rats. *Neural Plast* 2016.

- Hanse E, Gustafsson B (2001) Vesicle release probability and pre-primed pool at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 531:481–493.
- Hardingham N, Dachtler J, Fox K (2013) The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci* 7:1–19.
- 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.
- He DZZ, Dallos P (1999) Development of Acetylcholine-Induced Responses in Neonatal Gerbil Outer Hair Cells. *J Neurophysiol* 81:1162–1170.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371:513–515.
- Hensch TK (2005) Critical Period Plasticity in Local Cortical Circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877–888.
- Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1984) Different modes of Ca channel gating behavior favoured by DHP Ca agonists and antagonists. *Nature* 311:538–544.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay IAN (2010) Inwardly Rectifying Potassium Channels : Their Structure , Function , and Physiological Roles. *Physiol Rev*:291–366.
- Hodgkin AL, Horowicz P (1959) The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. *J Physiol* 148:127–160.
- Housley GD, Ashmore JF (1991) Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc R Soc B Biol Sci* 244:161–167.
- Housley GD, Ashmore JF (1992) Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 448:73–98.
- 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.
- Huang C-C, Chan SHH, Hsu K-S (2003) cGMP/Protein Kinase G-Dependent Potentiation of Glutamatergic Transmission Induced by Nitric Oxide in Immature Rat Rostral Ventrolateral Medulla Neurons in Vitro. *Mol Pharmacol* 64:521–532.
- Hubbard JI (1961) The effect of calcium and magnesium on the spontaneous release of transmitter from mammalian motor nerve endings. *J Physiol* 159:507–517.

- Hübener M, Bonhoeffer T (2014) Neuronal plasticity: Beyond the critical period. *Cell* 159:727–737.
- Huberman AD, Feller MB, Chapman B (2008) Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. *Annu Rev Neurosci* 31:479–509.
- Hudspeth AJ (1997) How Hearing Happens? *Neuron* 19:947–950.
- Hudspeth AJ (2008) Making an Effort to Listen: Mechanical Amplification in the Ear. *Neuron* 59:530–545.
- Hudspeth AJ (2014) Integrating the active process of hair cells with cochlear function. *Nat Rev Neurosci* 15:600–614.
- Hutter OF, Kostial K (1954) Effect of magnesium and calcium ions on the release of acetylcholine. *J Physiol* 124:234–241.
- Iftinca MC (2011) Neuronal T-type calcium channels : What `s new ? *J Med Life* 4:126–138.
- Iwasa KH, Adachi M (1997) Force generation in the outer hair cell of the cochlea. *Biophys J* 73:546–555.
- Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel O, Takahashi T (2000) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission. *J Neurosci* 20:59–65.
- Iwasaki S, Takahashi T (1998) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* 5:419–423.
- Iwasaki S, Takahashi T (2001) Developmental regulation of transmitter release at the calyx of Held in rat auditory brainstem. *J Physiol* 534:861–871.
- Jackman SL, Regehr WG (2017) The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94:447–464.
- Jackman SL, Turecek J, Belinsky JE, Regehr WG (2016) The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* 529:88–91.
- Jackson MB, Konnerth A, Augustine GJ (1991) Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci* 88:380–384.
- Jan LY, Jan YN (1976) Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* 262:189–214.
- Jessen KR, Mirsky R, Dennison ME, Burnstock G (1979) GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous system. *Nature* 281:71–74.
- Johnson SL, Beurg M, Marcotti W, Fettiplace R (2011a) Prestin-driven cochlear amplification is not

- limited by the outer hair cell membrane time constant. *Neuron* 70:1143–1154.
- Johnson SL, Eckrich T, Kuhn S, Zampini V, Franz C, Ranatunga KM, Roberts TP, Masetto S, Knipper M, Kros CJ, Marcotti W (2011b) Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat Neurosci* 14:711–717.
- 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.
- Johnson SL, Wedemeyer C, Vetter DE, Adachi R, Holley MC, Elgoyhen AB, Marcotti W (2013) Cholinergic efferent synaptic transmission regulates the maturation of auditory hair cell ribbon synapses. *Open Biol* 3.
- Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinflug C (2010) Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol* 588:3187–3200.
- Jones V, Westbrook GL (1996) The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19:96–101.
- 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 (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481–492.
- Katz E, Elgoyhen AB (2014) Short-term plasticity and modulation of synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear synapses. *Front Syst Neurosci* 8:1–14.
- Katz E, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs PA, Glowatzki E (2004) Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24:7814–7820.
- 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.
- Kearney G, Zorrilla J, Martín DS, Vattino LG, Elgoyhen AB, Katz E, Wedemeyer C, Katz E (2019) Developmental synaptic changes at the transient olivocochlear-inner hair cell synapse. *J Neurosci* 2019; 101523/JNEUROSCI2746-182019.

- Kennedy HJ, Crawford AC, Fettiplace R (2005) Force generation by mammalian hair bundles supports a role in cochlear amplification. *Nature* 433:880–883.
- Kennedy HJ, Evans MG, Crawford AC, Fettiplace R (2006) Depolarization of Cochlear Outer Hair Cells Evokes Active Hair Bundle Motion by Two Mechanisms. *J Neurosci* 26:2757–2766.
- Kerlin JR, Shahin AJ, Miller LM (2010) Attentional Gain Control of Ongoing Cortical Speech Representations in a “Cocktail Party.” *J Neurosci* 30:620–628.
- Klyachko VA, Ahem GP, Jackson MB (2001) cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization. *Neuron* 31:1015–1025.
- Kochubey O, Babai N, Kochubey O, Babai N, Schneggenburger R (2016) A Synaptotagmin Isoform Switch during the Development of an Identified CNS Synapse. *Neuron* 90:984–999.
- Kong J-H, Adelman JP, Fuchs PA (2008) Expression of the SK2 calcium-activated potassium channel is required for cholinergic function in mouse cochlear hair cells. *J Physiol* 586:5471–5485.
- 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.
- Krishnaswamy A, Cooper E (2009) An Activity-Dependent Retrograde Signal Induces the Expression of the High-Affinity Choline Transporter in Cholinergic Neurons. *Neuron* 61:272–286.
- Kros CJ, Ruppersberg JP, Rüscher A (1998) Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 2:281–284.
- Kujawa SG, Glatfke TJ, Fallon M, Bobbin RP (1993) Contralateral sound suppresses distortion product otoacoustic emissions through cholinergic mechanisms. *Hear Res* 68:97–106.
- Kujawa SG, Glatfke TJ, Fallon M, Bobbin RP (1994) A nicotinic-like receptor mediates suppression of distortion product otoacoustic emissions by contralateral sound. *Hear Res* 74:122–134.
- Kuno M, Takahashi T (1986) Effects of calcium and magnesium on transmitter release at Ia synapses of rat spinal motoneurons in vitro. *J Physiol* 376:543–553.
- Latorre R, Castillo K, Carrasquel-Ursulaez W, Sepulveda R V., Gonzalez-Nilo F, Gonzalez C, Alvarez O (2017) Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol Rev* 97:39–87.
- Lauer AM, Fuchs PA, Ryugo DK, Francis HW (2012) Efferent synapses return to inner hair cells in the aging cochlea. *Neurobiol Aging* 33:2892–2902.

- Lavoie N, Jeyaraju D V., Peralta MR, Seress L, Pellegrini L, Toth K (2011) Vesicular Zinc Regulates the Ca²⁺ Sensitivity of a Subpopulation of Presynaptic Vesicles at Hippocampal Mossy Fiber Terminals. *J Neurosci* 31:18251–18265.
- Lelli A, Asai Y, Forge A, Holt JR, Géléoc GSG (2009) Tonotopic Gradient in the Developmental Acquisition of Sensory Transduction in Outer Hair Cells of the Mouse Cochlea. *J Neurophysiol* 101:2961–2973.
- Liberman MC (1980) Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:45–63.
- Liberman MC (1982) Single-Neuron Labeling in the Cat Auditory Nerve. *Science* (80-) 216:1239–1241.
- Liberman MC (1989) Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: Suppression of compound action potentials by contralateral sound. *Hear Res* 38:47–56.
- Liberman MC (1991) The olivocochlear efferent bundle and susceptibility of the inner ear to acoustic injury. *J Neurophysiol* 65:123–132.
- Liberman MC, Brown MC (1986) Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res* 24:17–36.
- Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: Quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443–460.
- Liberman MC, Gao J, He DZZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419.
- Liley AW (1956) The quantal components of the mammalian end-plate potential. *J Physiol* 133:571–587.
- Liley AW, North KAK (1953) An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 16:509–527.
- Lioudyno M, Hiel H, Kong J-H, 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.
- Liu C, Glowatzki E, Fuchs PA (2015) Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proc Natl Acad Sci* 112:14723–14727.
- Llinás R, Sugimori M, Silver RB (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* (80-) 256:677–679.

- Lukashkin AN, Lukashkina VA, Russell IJ (2002) One source for distortion product otoacoustic emissions generated by low- and high-level primaries. *J Acoust Soc Am* 111:2740–2748.
- Magnaghi V, Ballabio M, Consoli A, Lambert JJ, Roglio I, Melcangi RC (2006) GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system. *J Mol Neurosci* 28:303–307.
- Mahendrasingam S, Beurg M, Fettiplace R, Hackney CM (2010) The ultrastructural distribution of prestin in outer hair cells: A post-embedding immunogold investigation of low-frequency and high-frequency regions of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 31:1595–1605.
- Maison SF, Adams JC, Liberman MC (2003a) Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J Comp Neurol* 455:406–416.
- Maison SF, Casanova E, Holstein GR, Bettler B, Liberman MC (2008) Loss of GABAB Receptors in Cochlear Neurons: Threshold Elevation Suggests Modulation of Outer Hair Cell Function by Type II Afferent Fibers. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:50–63.
- Maison SF, Emeson RB, Adams JC, Luebke AE, Liberman MC (2003b) Loss of alpha CGRP reduces sound-evoked activity in the cochlear nerve. *J Neurophysiol* 90:2941–2949.
- Maison SF, Liberman LD, Liberman MC (2016) Type-II cochlear ganglion neurons do not drive the olivocochlear reflex: re-examination of the cochlear phenotype in peripherin knockout mice. *eNeuro* 3:e0207–16.2016.
- Maison SF, Luebke AE, Liberman MC, Zuo J (2002) Efferent protection from acoustic injury is mediated via alpha9 nicotinic acetylcholine receptors on outer hair cells. *J Neurosci* 22:10838–10846.
- Maison SF, Rosahl TW, Homanics GE, Liberman MC (2006) Functional Role of GABAergic Innervation of the Cochlea: Phenotypic Analysis of Mice Lacking GABAA α 1, α 2, α 5, α 6, β 2, β 3, or δ Receptor Subunits. *J Neurosci* 26:10315–10326.
- Mallart A, Martin AR (1967) An analysis of facilitation of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 193:679–694.
- Marcotti W, Géléoc GSG, Lennan GWT, Kros CJ (1999) Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 439:113–122.
- 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, Kros CJ (2004a) A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 560:691–708.

Marcotti W, Johnson SL, Kros CJ (2004b) Effects of intracellular stores and extracellular Ca²⁺ on Ca²⁺-activated K⁺ currents in mature mouse inner hair cells. *J Physiol* 557:613–633.

Marcotti W, Johnson SL, Rusch 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 contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol*:653–660.

Marrion N V, Tavalin SJ (1998) Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature* 395:900–905.

Mesgarani N, Chang EF (2012) Selective cortical representation of attended speaker in multi-talker speech perception. *Nature* 485:233–236.

Mikaelian D, Ruben RJ (1965) Development of hearing in the normal CBA-J mouse: correlation of physiological observations with behavioral responses and with cochlear anatomy. *Acta Otolaryngol* 59:451–461.

Miki T, Kaufmann WA, Malagon G, Gomez L, Tabuchi K, Watanabe M (2017) Numbers of presynaptic Ca²⁺ channel clusters match those of functionally defined vesicular docking sites in single central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*:1–10.

Mintz IM, Bean BP (1993) Block of calcium channels in rat neurons by synthetic ω -Aga-IVA. *Neuropharmacology* 32:1161–1169.

Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG (1995) Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15:675–688.

Moglie MJ, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Goutman JD (2018) Compartmentalization of antagonistic Ca²⁺ signals in developing cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci*:201719077.

Mombaerts P (1999) Molecular Biology of Odorant Receptors in Vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 22:487–509.

Momiyama T (2003) Parallel decrease in ω -conotoxin-sensitive transmission and dopamine-induced

- inhibition at the striatal synapse of developing rats. *J Physiol* 546:483–490.
- 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, Goutman JD, Kochubey O, Schneggenburger R (2010) Interaction between facilitation and depression at a large CNS synapse reveals mechanisms of short-term plasticity. *J Neurosci* 30:2007–2016.
- Murthy V, Maison SF, Taranda J, Haque N, Bond CT, Elgoyhen AB, Adelman JP, Liberman MC, Vetter DE (2009a) SK2 channels are required for function and long-term survival of efferent synapses on mammalian outer hair cells. *Mol Cell Neurosci* 40:39–49.
- Murthy V, Taranda J, Elgoyhen AB, Vetter DE (2009b) Activity of nAChRs containing $\alpha 9$ subunits modulates synapse stabilization via bidirectional signaling programs. *Dev Neurobiol* 69:931–949.
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18:599–612.
- Murugasu E, Russell IJ (1996) The Effect of Efferent Stimulation on Basilar Membrane Displacement in the Basal Turn of the Guinea Pig Cochlea. *J Neurosci* 16:325–332.
- Myoga MH, Regehr WG (2011) Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses. *J Neurosci* 31:5235–5243.
- Nakamura Y, Harada H, Kamasawa N, Matsui K, Rothman JS, Shigemoto R, Silver RA, DiGregorio DA, Takahashi T (2015) Nanoscale Distribution of Presynaptic Ca²⁺ Channels and Its Impact on Vesicular Release during Development. *Neuron* 85:145–159.
- Nam JH, Fettiplace R (2010) Force transmission in the organ of corti micromachine. *Biophys J* 98:2813–2821.
- Nanou E, Catterall WA (2018) Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* 98:466–481.
- Naraghi M, Neher E (1997) Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci* 17:6961–6973.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389–399.

- Neher E (2015) Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles. *Neuron* 87:1131–1142.
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen XH, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37:15353–15362.
- Ngo-Anh TJ, Bloodgood BL, Lin M, Sabatini BL, Maylie J, Adelman JP (2005) SK channels and NMDA receptors form a Ca²⁺-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat Neurosci* 8:642–649.
- Nouvian R, Eybalin M, Puel J-L (2015) Cochlear efferents in developing adult and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 361:301–309.
- Oatman LC (1971) Role of visual attention on auditory evoked potentials in unanesthetized cats. *Exp Neurol* 32:341–356.
- Oatman LC (1976) Effects of visual attention on the intensity of auditory evoked potentials. *Exp Neurol* 51:41–53.
- Oghalai JS, Patel AA, Nakagawa T, Brownell WE (1998) Fluorescence-Imaged Microdeformation of the Outer Hair Cell Lateral Wall. *J Neurosci* 18:48–58.
- Oghalai JS, Zhao H, Kutz JW, Brownell WE (2000) Voltage- and tension-dependent lipid mobility in the outer hair cell plasma membrane. *Science* (80-) 287:658–661.
- Oliver D, Fakler B (1999) Expression density and functional characteristics of the outer hair cell motor protein are regulated during postnatal development in rat. *J Physiol* 519:791–800.
- Oliver D, He DZZ, Klo N, Ludwig J, Dallos P, Fakler B (2001) Intracellular Anions as the Voltage Sensor of Prestin , the Outer Hair Cell Motor Protein. *Science* 292:2340–2344.
- Oliver D, Klöcker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP, Fakler B (2000) Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595–601.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994) Calcium Channel Diversity and Neurotransmitter Release: The ω -Conotoxins and ω -Agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823–867.
- Palmer ZJ, Duncan RR, Johnson JR, Lian L-Y, Mello L V, Booth D, Barclay JW, Graham ME, Burgoyne RD, Prior IA, Morgan A (2008) S-nitrosylation of syntaxin 1 at Cys145 is a regulatory switch controlling

- Munc18-1 binding. *Biochem J* 413:479–491.
- Pan B, Akyuz N, Liu X, 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 Article TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron* 99:736–753.
- Pan B, Géléoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, Kawashima Y, Griffith AJ, Holt JR (2013) TMC1 and TMC2 Are Components of the Mechanotransduction Channel in Hair Cells of the Mammalian Inner Ear. *Neuron* 79:504–515.
- Pangrsic T, Singer JH, Koschak A (2018) Voltage-Gated Calcium Channels: Key Players in Sensory Coding in the retina and the inner ear. *Physiol Rev* 98:2063–2096.
- Park H, Kayser C, Thut G, Gross J (2016) Lip movements entrain the observers' low-frequency brain oscillations to facilitate speech intelligibility. *Elife* 5:e14521.
- Peng AW, Ricci AJ (2011) Somatic motility and hair bundle mechanics , are both necessary for cochlear amplification ? *Hear Res* 273:109–122.
- Perissinotti PP, Tropper BG, Uchitel OD (2008) L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 27:1333–1344.
- 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.
- Petersen SA, Fetter RD, Noordermeer JN, Goodman CS, DiAntonio A (1997) Genetic analysis of glutamate receptors in drosophila reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron* 19:1237–1248.
- Plazas P V, De Rosa MJ, Gomez-Casati ME, Verbitsky M, Weisstaub N, Katz E, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005a) Key roles of hydrophobic rings of TM2 in gating of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *Br J Pharmacol* 145:963–974.
- Plazas P V, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005b) Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* 25:10905–10912.
- Pouzat C, Hestrin S (1997) Developmental regulation of basket/stellate cell --> Purkinje cell synapses in the cerebellum. *J Neurosci* 17:9104–9112.
- Preyer S, Hemmert W, Pfister M, Zenner HP, Gummer AW (1994) Frequency response of mature guinea-

- pig outer hair cells to stereociliary displacement. *Hear Res* 77:116–124.
- Purves D (2004) *Neuroscience*, 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Pyott SJ, Glowatzki E, Trimmer JS, Aldrich RW (2004) Extrasynaptic Localization of Inactivating Calcium-Activated Potassium Channels in Mouse Inner Hair Cells. *J Neurosci* 24:9469–9474.
- 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.
- Rajan R (2000) Centrifugal pathways protect hearing sensitivity at the cochlea in noisy environments that exacerbate the damage induced by loud sound. *J Neurosci* 20:6684–6693.
- Raphael Y, Altschuler RA (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 60:397–422.
- Ratnayaka A, Marra V, Bush D, Burden JJ, Branco T, Staras K (2012) Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol* 590:1585–1597.
- Recio-Spinoso A, Oghalai JS (2017) Mechanical tuning and amplification within the apex of the guinea pig cochlea. *J Physiol* 595:4549–4561.
- Regehr WG, Delaney R, Tank DW (1994) The Role of Presynaptic Calcium in Short-Term Enhancement at the Hippocampal Mossy Fiber Synapse. *J Neurosci* 14:523–537.
- Reijntjes DOJ, Pyott SJ (2016) The afferent signaling complex: Regulation of type I spiral ganglion neuron responses in the auditory periphery. *Hear Res* 336:1–16.
- Renier N, Dominici C, Erzurumlu RS, Kratochwil CF, Rijli FM, Gaspar P, Chedotal A (2017) A mutant with bilateral whisker to barrel inputs unveils somatosensory mapping rules in the cerebral cortex. *Elife* 6:e23494:1–19.
- Ricci AJ, Fettiplace R (1998) Calcium permeation of the turtle hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph. *J Physiol* 506:159–173.
- Ricoy UM, Frerking ME (2014) Distinct roles for Cav2.1-2.3 in activity-dependent synaptic dynamics. *J Neurophysiol* 111:2404–2413.
- 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 D, Gummer M (1985) Physiological and morphological characterization guinea pig cochlea of efferent neurones in the. *Hear Res* 20:63–77.
- Robitaille R, Charlton MP (1992) Presynaptic Calcium Signals and Transmitter by Calcium-activated Potassium Channels. *J Neurosci* 12:297–305.
- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Chariton MP (1993) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11:645–655.
- Robles L, Ruggero MA (2001) Mechanics of the Mammalian Cochlea. *Physiol Rev* 81:1305–1352.
- 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.
- Rothlin C V, Katz E, Verbitsky M, Elgoyhen AB (1999) The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine, and type 3 serotonin receptors. *Mol Pharmacol* 55:248–254.
- Roux I, Wersinger E, McIntosh JM, Fuchs PA, Glowatzki E (2011) Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J Neurosci* 31:15092–15101.
- Rubel EW, Fritsch B (2002) Auditory System Development: Primary Auditory Neurons and Their Targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51–101.
- Ruggero MA, Rich NC, Recio A, Narayan SS, Robles L (1997) Basilar membrane responses to tones at the base of the chinchilla cochlea. *J Acoust Soc Am* 101:2151–2163.
- Ruggero MA, Temchin AN (2002) The roles of the external, middle, and inner ears in determining the bandwidth of hearing. *Proc Natl Acad Sci* 99:13206–13210.
- Ruiz R, Cano R, Casanas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L (2011) Active Zones and the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles at the Neuromuscular Junction of the Mouse. *J Neurosci* 31:2000–2008.
- Russell IJ, Cody AR, Richardson GP (1986) The responses of inner and outer hair cells in the basal turn of the guinea-pig cochlea and in the mouse cochlea grown in vitro. *Hear Res* 22:199–216.
- Russell IJ, Kössl M (1991) The voltage responses of hair cells in the basal turn of the guinea-pig cochlea.

J Physiol 435:493–511.

- Russell IJ, 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.
- Russell IJ, Sellick PM (1978) Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J Physiol* 284:261–290.
- Sailer CA, Kaufmann WA, Kogler M, Chen L, Sausbier U, Ottersen OP, Ruth P, Shipston MJ, Knaus HG (2006) Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24:442–454.
- Sanes DH, Bao S (2009) Tuning up the developing auditory CNS. *Curr Opin Neurobiol* 19:188–199.
- Santos-Sacchi J, Huang GJ, Wu M (1997) Mapping the distribution of outer hair cell voltage-dependent conductances by electrical amputation. *Biophys J* 73:1424–1429.
- Santos-Sacchi J, Tan W (2018) The frequency response of outer hair cell voltage-dependent motility is limited by kinetics of prestin. *J Neurosci* 38:5495–5506.
- Sara Y, Virmani T, Deák F, Liu X, Kavalali ET (2005) An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron* 45:563–573.
- Saunders A, Granger AJ, Sabatini BL (2015) Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *Elife*:1–13.
- Saviane C, Silver RA (2006) Fast vesicle reloading and a large pool sustain high bandwidth transmission at a central synapse. *Nature* 439:983–987.
- Schaechinger TJ, Oliver D (2007) Nonmammalian orthologs of prestin (SLC26A5) are electrogenic divalent/chloride anion exchangers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7693–7698.
- Scheibe F, Haupt H, Ising H (1999) Total magnesium concentrations of perilymph, cerebrospinal fluid and blood in guinea pigs fed different magnesium-containing diets. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 256:215–219.
- Schiess ARB, Scullin C, Partridge LD (2010) Maturation of Schaffer collateral synapses generates a phenotype of unreliable basal evoked release and very reliable facilitated release. *Eur J Neurosci* 31:1377–1387.
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal. *J Neurosci* 17:5858–5867.

- Schikorski T, Stevens CF (1999) Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4107–4112.
- Schmidt RS, Fernandez C (1963) Development of mammalian endocochlear potential. *J Exp Zool* 153:227–235.
- Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 23:399–409.
- Schneggenburger R, Rosenmund C (2015) Molecular mechanisms governing Ca²⁺ regulation of evoked and spontaneous release. *Nat Neurosci* 18:935–941.
- 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.
- Sheng J, He L, Zheng H, Xue L, Luo F, Shin W, Sun T, Kuner T, Yue DT, Wu L (2012) Calcium-channel number critically influences synaptic strength and plasticity at the active zone. *Nat Neurosci* 15:998–1006.
- Silver RA (2003) Estimation of nonuniform quantal parameters with multiple-probability fluctuation analysis: Theory, application and limitations. *J Neurosci Methods* 130:127–141.
- Simmons DD (2002) Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53:228–250.
- Simmons DD, Bertolotto C, Kim J, Raji-Kubba J, Mansdorf N (1998) Choline acetyltransferase expression during a putative developmental waiting period. *J Comp Neurol* 397:281–295.
- 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.
- Sippy T, Cruz-martín A, Jeromin A, Schweizer FE (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci* 6:1031–1038.
- Sirko P, Gale JE, Ashmore JF (2019) Intercellular Ca²⁺ signalling in the adult mouse cochlea. *J Physiol* 597:303–317.
- Smith CA, Sjöstrand FS (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J Ultrastructure Res* 5:184–192.
- Smith SJ, Augustine GJ, Charlton MP (1985) Transmission at voltage-clamped giant synapse of the squid: Evidence for cooperativity of presynaptic calcium action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:622–625.

- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444:707–712.
- Stanley EF (1986) Decline in Calcium Cooperativity as the Basis of Facilitation at the Squid Giant Synapse. *J Neurosci* 6:762–769.
- Stanley EF (1993) Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron* 11:1007–1011.
- Steinert JR, Kopp-Scheinflug C, Baker C, Challiss RAJ, Mistry R, Haustein MD, Griffin SJ, Tong H, Graham BP, Forsythe ID (2008) Nitric Oxide Is a Volume Transmitter Regulating Postsynaptic Excitability at a Glutamatergic Synapse. *Neuron* 60:642–656.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385:733–759.
- Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547.
- Sugai T, Yano J, Sugitani M, Ooyama H (1992) Actions of cholinergic agonists and antagonists on the efferent synapse in the frog sacculus. *Hear Res* 61:56–64.
- Sugiura Y, Ko CP (1997) Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17:1101–1111.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic Calcium Current Modulation by a Metabotropic Glutamate Receptor. *Science* (80-) 274:594–597.
- Tank DW, Regehr WG, Delaney KR (1995) A quantitative analysis of presynaptic calcium dynamics that contribute to short-term enhancement. *J Neurosci* 15:7940–7952.
- 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:e18.
- Taschenberger H, Leão RM, Rowland KCKC, Spirou GAGA, 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* 9:1–8.

Terreros G, Jorratt P, Aedo C, Elgoyhen AB, Delano PH (2016) Selective Attention to Visual Stimuli Using Auditory Distractors Is Altered in Alpha-9 Nicotinic Receptor Subunit Knock-Out Mice. *J Neurosci* 36:7198–7209.

Thanawala MS, Regehr WG (2013) Presynaptic Calcium Influx Controls Neurotransmitter Release in Part by Regulating the Effective Size of the Readily-Releasable Pool. *J Neurosci* 33:4625–4633.

Trigo FF, Sakaba T, Ogden D, Marty A (2012) Readily releasable pool of synaptic vesicles measured at single synaptic contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:18138–18143.

Tritsch NX, Bergles DE (2010) Developmental regulation of spontaneous activity in the Mammalian cochlea. *J Neurosci* 30:1539–1550.

Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL (2012) Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490:262–266.

Tritsch NX, Rodríguez-Contreras A, Crins TTH, Wang HC, Borst JGG, Bergles DE (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.

Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290:527–528.

Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 441:824–831.

Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballesterio J, Liberman MC, Elgoyhen a B, Boulter J (2007) The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20594–20599.

Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of $\alpha 9$ nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23:93–103.

Vivas O, Moreno CM, Santana LF, Hille B (2017) Proximal clustering between BK and Ca V 1 . 3 channels promotes functional coupling and BK channel activation at low voltage. *Elife*:1–18.

Vollrath MA, Kwan KY, Corey DP (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu*

Rev Neurosci 30:339–365.

von Békésy G (1960) Experiments in Hearing. McGraw Hill Book Company.

Waguespack J, Salles FT, Kachar B, Ricci AJ (2007) Stepwise Morphological and Functional Maturation of Mechanotransduction in Rat Outer Hair Cells. *J Neurosci* 27:13890–13902.

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.

Wang HC, Bergles DE (2015) Spontaneous activity in the developing auditory system. *Cell Tissue Res* 361:65–75.

Wang HC, Lin C-C, 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* 163:1–12.

Wang Z, Van den Berg RJ, Ypey DL (1994) Resting membrane potentials and excitability at different regions of rat dorsal root ganglion neurons in culture. *Neuroscience* 60:245–254.

Warr WB, Guinan JJ (1979) Efferent innervation of the organ of Corti: two separate systems. *Brain Res* 173:152–155.

Wedemeyer C, Vattino LG, Moglie MJ, Ballestero J, Maison SF, Guilmi MN Di, Taranda J, Liberman MC, Fuchs PA, Katz E, Elgoyhen AB (2018) A Gain-of-Function Mutation in the $\alpha 9$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Alters Medial Olivocochlear Efferent Short-Term Synaptic Plasticity. *J Neurosci* 38:3939–3954.

Wedemeyer C, Zorrilla de San Martín J, Ballestero J, Gomez-Casati ME, Torbidoni AV, Fuchs P a, Bettler B, Elgoyhen AB, Katz E (2013) Activation of presynaptic GABA(B(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 $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res* 167:122–135.

Weisz C, Glowatzki E, Fuchs PA (2009) The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature* 461:1126–1129.

Weisz CJC, Glowatzki E, Fuchs PA (2014) Excitability of type II cochlear afferents. *J Neurosci* 34:2365–2373.

- Wersinger E, McLean WJ, Fuchs PA, Pyott SJ (2010) BK channels mediate cholinergic inhibition of high frequency cochlear hair cells. *PLoS One* 5:e13836.
- Wiederhold ML, Kiang NYS (1970) Effects of Electric Stimulation of the Crossed Olivocochlear Bundle on Single Auditory-Nerve Fibers in the Cat. *J Acoust Soc Am* 48:950–965.
- Wilson JL, Henson MM, Henson OW (1991) Course and distribution of efferent fibers in the cochlea of the mouse. *Hear Res* 55:98–108.
- Wittekindt a., Kaiser J, Abel C (2014) Attentional Modulation of the Inner Ear: A Combined Otoacoustic Emission and EEG Study. *J Neurosci* 34:9995–10002.
- Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2004) Calcium-Activated Potassium Channels Are Selectively Coupled to P/Q-Type Calcium Channels in Cerebellar Purkinje Neurons. *J Neurosci* 24:8818–8822.
- Wong AYC, Graham BP, Billups B, Forsythe ID (2003) Distinguishing between Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms of Short-Term Depression during Action Potential Trains. *J Neurosci* 23:4868–4877.
- Wu LG, Westenbroek RE, Borst JGG, 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.
- Xiang Z et al. (2011) The discovery and characterization of ML218: A novel, centrally active T-Type calcium channel inhibitor with robust effects in STN neurons and in a rodent model of Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci* 2:730–742.
- Xiong W, Grillet N, Elledge HM, Wagner TFJ, Zhao B, Johnson KR, Kazmierczak P, Müller U (2012) TMHS is an integral component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Cell* 151:1283–1295.
- Yamada WM, Zucker RS (1992) Time course of transmitter release calculated from simulations of a calcium diffusion model. *Biophys J* 61:671–682.
- Yamamoto K, Kobayashi M (2018) Opposite roles in short-term plasticity for N-type and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in GABAergic neuronal connections in the rat cerebral cortex. *J Neurosci* 38:9814–9828.
- 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.

- Yost WA (1993) *Fundamentals of Hearing: an Introduction*. San Diego Academic Press.
- Yu N, Zhu ML, Zhao HB (2006) Prestin is expressed on the whole outer hair cell basolateral surface. *Brain Res* 1095:51–58.
- Yuhas WA, Fuchs PA (1999) Apamin-sensitive, small-conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells. *J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol* 185:455–462.
- Zachary SP, Fuchs PA (2015) Re-Emergent Inhibition of Cochlear Inner Hair Cells in a Mouse Model of Hearing Loss. *J Neurosci* 35:9701–9706.
- Zamponi GW, Bourinet E, Snutch TP (1996) Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol* 151:77–90.
- Zhang Q et al. (2019) Differential Co-release of Two Neurotransmitters from a Vesicle Fusion Pore in Mammalian Adrenal Chromaffin Cells. *Neuron*:1–11.
- Zhao B, Müller U (2015) The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 34:172–179.
- Zheng J, Shen W, He DZZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149–155.
- Zorrilla de San Martín J, Pyott S, Ballesteros 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.