UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Modulación gabaérgica de la sinapsis eferente olivococlear

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Tais Castagnola

Directora de Tesis: Dra. Carolina Wedemeyer

Director Adjunto: Dr. Juan Diego Goutman

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 17 de julio del 2023.

Título: Modulación GABAérgica de la sinapsis eferente olivococlear

Resumen

Durante el desarrollo postnatal las células ciliadas internas (CCIs) en la cóclea de mamíferos altriciales no responden a estímulos acústicos, pero presentan una actividad eléctrica intrínseca que es crucial para el normal desarrollo de la vía auditiva. Durante este mismo período, las neuronas eferentes del complejo medial olivococlear (MOC) inervan transitoriamente los somas de las CCIs. Esta sinapsis es mediada por acetilcolina (ACh), la cual activa receptores nicotínicos ensamblados por subunidades α9 y α10, y controla la excitabilidad de las CCIs previo al inicio de la audición. A pesar de que esta es una sinapsis colinérgica, hay evidencia de la presencia de GABA y de receptores presinápticos del tipo $GABA_B$ en la cóclea. Mas aún, ha sido demostrado que GABA, a través de estos receptores, inhibe la liberación de ACh de los terminales eferentes MOC.

A fin de profundizar nuestra comprensión sobre dicha sinapsis en el desarrollo, se realizaron experimentos en los cuales se estimularon optogenéticamente por primera vez las fibras eferentes colinérgicas (MOC; ChAT;ChR2-eYPF) y las fibras GABAérgicas (GAD;ChR2-eYFP) en la cóclea. Además, se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica para caracterizar la expresión de marcadores colinérgicos y GABAérgicos tanto en el órgano de Corti en donde se encuentran las CCIs, como en el tronco encefálico, donde se encuentran los somas de las neuronas MOC. A partir de estos experimentos se demostró que al menos una subpoblación de terminales posee toda la maquinaria necesaria para la co-transmisión de GABA y ACh en la sinapsis MOC-CCI.

Con el fin de entender como es la modulación por GABA a nivel de las sinapsis únicas, se realizaron experimentos de imágenes de calcio en este mismo rango etario en ratones WT (*Balb-c*). Se registraron las señales de calcio provenientes de influjo de Ca^{2+} a través de los receptores α9α10, a partir de registros en los cuales se estimularon las fibras eferentes antes o después de la aplicación de un antagonista de los receptores $GABA_B$ (CGP 100-200 μM). Se observó que solo una subpoblación del total de las sinapsis estudiadas es modulada por el antagonista GABAérgico.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que GABA y ACh están siendo co-transmitidos de al menos algunos terminales MOC. Mientras que la ACh actúa postsinápticamente activando receptores α9α10, GABA actúa presinápticamente como un mecanismo de regulación local de la inhibición colinérgica medial olivococlear sobre las CCIs. Esta modulación GABAérgica de la sinapsis MOC-CCI demostró ser, además, heterogénea entre los múltiples contactos eferentes de una misma CCI.

Palabras clave: GABA, ACh, MOC, CCIs, desarrollo.

Title: GABAergic modulation of the efferent olivocochlear synapse

Abstract

During development, inner hair cells (IHCs) in the mammalian cochlea are unresponsive to acoustic stimuli but instead present intrinsic electrical activity, crucial for the normal development of the auditory pathway. During this same period, efferent neurons originating from the medial olivocochlear complex (MOC) transiently innervate the soma of IHCs. This synapse is mediated by acetylcholine (ACh), which activates nicotinic receptors assembled by α9 and α10 subunits and ultimately controls IHC excitability during this period. Even though this is a cholinergic synapse, previous evidence indicates the presence of abundant GABA and presynaptic $GABA_B$ receptors. Moreover, the application of $GABA_B$ receptors agonists can reduce ACh release, while antagonists increase it.

In order to have a better understanding of this synapse during development, experiments were made in which cholinergic efferent fibers (MOC; ChAT;ChR2-eYPF) and GABAergic efferent fibers (GAD;ChR2-eYFP) were optogenetically stimulated for the first time in the cochlea. Moreover, immunohistochemistry techniques were utilized to characterize the expression of cholinergic and GABAergic markers in the organ of Corti where IHC bodies are located, as well as in the brainstem where MOCs somas are found. These experiments showed that at least a subpopulation of efferent terminals had all the necessary machinery to co-transmit GABA and ACh from the MOC-IHC synapse.

Furthermore, calcium imaging experiments were performed at the same age on WT (*Balb-c*) mice to record single synapses. Efferent fibers were stimulated before and after the perfusion of a $GABA_B$ antagonist (CGP 100-200 μM), and calcium signals produced by the influx of Ca^{2+} from the α9α10 receptors were measured. We observed that only a subset of MOC terminals is subject to GABA modulation.

In conclusion, our results demonstrate that GABA and ACh are being co-transmitted from at least a subpopulation of MOC terminals. While ACh acts postsynaptically activating α9α10 receptors, GABA acts presinaptically as a negative feedback mechanism regulating locally the cholinergic inhibition of IHCs. This GABAergic modulation of MOC-IHC synapse has proven to be heterogeneous within the multiple efferent contacts of a single IHC.

Key Words: GABA, ACh, MOC, IHCs, development

A Laura y Rubén, quienes,

gracias a su docencia,

despertaron mi interés y

fascinación por la biología.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por la formación de excelencia que he recibido.

A CONICET, por el sustento económico.

A Belén por permitirme formar parte de su laboratorio, desde hace ya muchos años.

A Caro y a Guchi. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Durante este tiempo me guiaron, enseñaron y aconsejaron a cada paso del camino. Caro, gracias por tu compañerismo y tus anécdotas de todos los días. Guchi, gracias por enseñarme a debatir y a hacer ciencia de calidad con tu rigor científico. Además de grandes científicos, ambos son grandes directores.

A toda la gente del labo; los que ya siguieron su camino, los que están siempre y los que recién llegaron. Todos hicieron del INGEBI un lugar de trabajo ameno y divertido para trabajar.

A Sofi y Vale por las eternas charlas, con una birra de por medio, ya sea festejando nuestros logros o haciendo catarsis juntas.

A Vivi y a Pauli por su incansable ayuda con las PCRs y a Clau por mantenerme las colonias de ratones todos estos años.

A Maru, Pao, Eleo, Dani y Lu por contribuir y plantear soluciones en todos los seminarios.

A Marian por sus consejos y su pedagogía. Tomo las palabras de Marce, "sos la bondad hecha gruñido". Siempre me prestaste una oreja, gracias.

A mis amigas de la vida, ya saben todo. Las voy a extrañar.

Gracias a mi familia de siempre, son mi sostén. Gracias a mi nueva familia: Santi con vos para todos lados.

Índice

Resumen 2

Abstract 3

Agradecimientos 5

Índice 6

Abreviaturas 7

1. Introducción 11

1.1. Estructura del sistema auditivo en mamíferos 12

1.2. El órgano de Corti 13

1.3. Transducción del sonido 14

1.4. Transmisión de la información al SNC: inervación aferente 15

1.5. Transmisión de la información desde el SNC: inervación eferente 16

1.6. Importancia del sistema eferente olivococlear durante el desarrollo 17

1.7. Presencia y función de GABA en el sistema olivococlear 20

1.8. Co-transmisión de neurotransmisores 23

2. Objetivos 25

2.1. Objetivo general 26

2.2 Objetivos particulares 26

3. Materiales y Métodos 27

3.1. Animales y Líneas transgénicas 28

3.2. Disección del órgano de Corti 29

3.3. Registros electrofisiológicos 30

3.4. Estimulación eléctrica y optogenética de las fibras MOC 31

3.5. Protocolo de los experimentos de farmacología 33

3.6. Análisis de las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (eIPSCs) 34

3.7. Adquisición de imágenes de calcio 34

3.8. Soluciones, drogas y reactivos 36

3.9. Inmunohistoquímica 36

3.10. Análisis estadístico de los datos 37

4. Resultados 39

4.1. Estimulación optogenética de las fibras MOC 40

4.1.1. Introducción 40

4.1.2. Validación del patrón de expresión en el modelo animal transgénico ChAT;TdTomato 40

4.1.3. Estimulación optogenética de las fibras colinérgicas 43

4.1.4. Caracterización de las corrientes evocadas por estimulación eferente 45

4.1.5. Liberación de ACh y activación del receptor α9α10 a partir de la estimulación optogenética de los terminales MOC 46

4.1.6. Conclusiones parciales de la estimulación optogenética en los ratones ChAT;ChR2-eYPF... 48

4.2. Co-transmisión de GABA y ACh de los terminales MOC 48

4.2.1. Introducción 48

4.2.2. Liberación de GABA de los terminales colinérgicos 49

4.2.3. Validación del patrón de expresión en el modelo animal transgénico GAD;ChR2-eYFP 51

4.2.4. Estimulación optogenética de las fibras GABAérgicas 53

4.2.5. Liberación de ACh de las fibras GABAérgicas 54

4.2.6. Comparación de las *o*eIPSCs entre los animales ChAT;ChR2-eYFP y GAD;ChR2-eYFP 55

4.2.7. Conclusiones parciales de la estimulación optogenética en los ratones GADcre;ChR2-eYPF 56

4.3. Co-localización de los marcadores colinérgicos y GABAérgicos 57

4.3.1. Introducción 57

4.3.2. Co-localización de la inmunomarcación colinérgica y GABAérgica en el órgano de Corti ... 57

4.3.3. Co-localización de neuronas colinérgicas y GABAérgicas en el VNTB 58

4.3.4. Conclusiones parciales de la co-localización de GAD y ChAT en el sistema olivococlear 60

4.4. Modulación diferencial de los sitios de liberación de ACh mediada por GABA 60

4.4.1. Introducción 60

4.4.2. Aproximación mediante registros de señales de calcio a la modulación GABAérgica de la sinapsis MOC-CCI 61

4.4.3. Modulación GABAérgica de la sinapsis MOC-CCI en una subpoblación de terminales colinérgicos 65

4.4.4. Conclusiones parciales de la heterogeneidad de la modulación GABAérgica sobre la sinapsis MOC-CCI 70

5. Discusión 71

5.1. Liberación de ACh de las fibras MOC a partir de la estimulación optogenética 73

5.2. Co-transmisión de GABA y ACh de las fibras MOC en la cóclea de ratones en desarrollo 74

5.3. Heterogeneidad en la modulación de GABA y ACh en la sinapsis MOC-CCI 76

5.4. Implicancias fisiológicas de la co-transmisión de GABA y ACh 78

6. Conclusiones 81

7. Bibliografía 83

Abreviaturas

ΔF: variación de fluorescencia

A: amperios

ACh: acetilcolina

Ca^{2+}: ion calcio

CCDV: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

CCEs: células ciliadas externas

CCIs: células ciliadas internas

DIC: contraste de interferencia diferencial

Erev: potencial de reversión

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

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

$GABA_B$-R: receptores de GABA de tipo B

I: corriente

IPSCs: corrientes sinápticas inhibitorias (prefijo e: evocadas)

*o*eIPSCs: corrientes sinápticas inhibitorias evocadas optogenéticamente

*e*eIPSCs: corrientes sinápticas inhibitorias evocadas eléctricamente

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico

Hz: hertz

K^+: ión potasio

Kd: constante de equilibrio

l : litro

LSO: oliva lateral superior

LOC: lateral olivococlear

m: metro

M: molar (moles/litro)

min: minutos

MNTB: núcleo medial del cuerpo trapezoidal

MOC: medial olivococlear

μX : micro (X *10 -6)

mX: mili (X *10 -3)

MX: mega (X *10 6)

nX: nano (X *10 -9)

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

NGE: neurona del ganglio espiral

Ω: ohm

PX: X días postnatal

px: pixel

s: segundos

SD: desvío estándar

SEM: error estándar de la media

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña

SNC: sistema nervioso central

SOC: complejo de la oliva superior

UA.: unidad arbitraria

V: voltaje

Vm: potencial de membrana

VNTB: núcleo ventral del cuerpo trapezoidal

Vs: potencial de sostén

W: Watt

INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura del sistema auditivo en mamíferos.

En los mamíferos, la periferia auditiva puede dividirse anatómica y funcionalmente en 3 partes: el oído externo, que comprende al pabellón auditivo, la concha y el conducto auditivo externo; el oído medio, que consta de la membrana timpánica o tímpano, una cadena de huesecillos u osículos y los músculos del oído medio; y el oído interno. Cuando una onda sonora llega al pabellón auditivo es conducida hasta el canal auditivo, por donde va a viajar hasta impactar contra la membrana timpánica haciéndola vibrar. A su vez, esa vibración desplaza a los huesecillos del oído medio: el martillo, yunque y el estribo. El estribo contacta a la ventana oval que es parte del oído interno, el cual está compuesto por dos estructuras óseas: el vestíbulo y la cóclea (Figura 1.A).

La cóclea es una estructura con forma de caracol que en su interior contiene fluido extracelular y que se divide en tres compartimientos, formando así tres conductos que siguen el enrollamiento de la estructura coclear (Raphael & Altschuler, 2003) (Figura 1B). Estos conductos se denominan escala vestibular, escala media y escala timpánica y son separados por la membrana tectorial y por la membrana basilar, sobre la cual se emplaza el órgano de Corti (Figura 1.C). 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 cerebroespinal, 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. Por otro lado, la escala media contiene en su interior una solución denominada endolinfa. Contrariamente a lo que sucede en la perilinfa, esta presenta una alta concentración de K^+ (~150 mM), y una baja concentración de Na^+ (~1 mM) y Ca^{2+} (~0.2 mM).

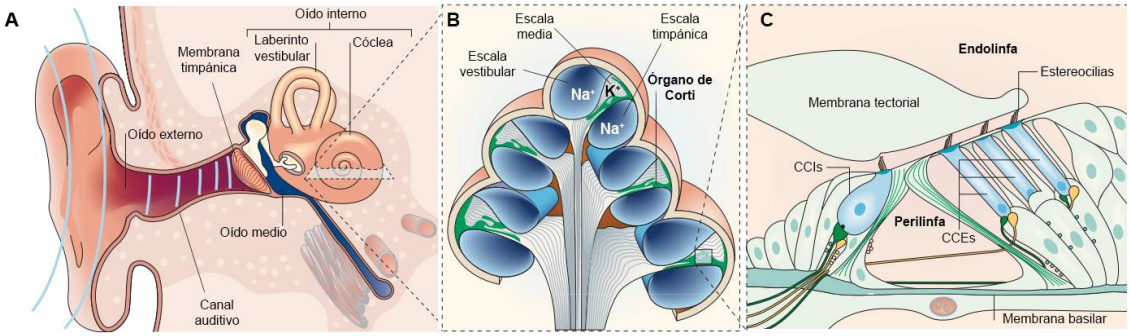

Figura 1| Estructura del sistema auditivo de mamíferos. A. El oído tiene tres componentes: el pabellón y canal auditivo (oído externo); el martillo, yunque y estribo (oído medio); y la cóclea y los tres canales semicirculares del sistema vestibular (oído interno). **B.** Corte transversal de la cóclea donde se pueden observar los tres compartimentos presentes en su interior: la escala timpani y vestibuli rellenas de perilinfa, y la escala media rellena de endolinfa. **C.** Esquema ilustrativo del órgano de Corti. Se puede apreciar la disposición de las células ciliadas internas (CCIs), de las células ciliadas externas (CCEs) y de las células de soporte las cuales yacen sobre la membrana basilar. La membrana tectorial se apoya en las estereocilias de las CCIs y de las CCEs, y cuando la membrana basilar vibra el desplazamiento relativo entre ellas hace que las esterocilias se deflecionen. Imágenes modificadas a partir de www.cochlea.eu y Purves, 2004.

1.2. El órgano de Corti

Como ya hemos mencionado, emplazado sobre la membrana basilar yace el órgano de Corti, el epitelio sensorial propiamente dicho. Este epitelio está conformado por las células ciliadas internas (CCIs), las células ciliadas externas (CCEs) y las células de soporte. Las células ciliadas son células mecanosensoriales encargadas de la transducción del sonido y llevan ese nombre debido a que presentan esterocilias en su porción apical (Figura 2.A), estructuras compuestas por filamentos de actina que se insertan en la membrana plasmática de las mismas (Goutman et al., 2015; Hudspeth, 2014). Como su nombre lo indica, se las puede diferenciar en dos grupos dependiendo de su localización. Por un lado, las células ciliadas internas están más cerca del modiolo -una estructura ósea que contiene al ganglio espiral y constituye el eje central de la cóclea-, tienen una forma globular y están dispuestas en una sola hilera. Por otro lado, las células ciliadas externas están más lejos del modiolo, tienen una forma más alargada y se distribuyen en tres hileras. Las diferencias entre las células ciliadas internas y las externas no son sólo morfológicas, sino que ambas son parte de dos procesos biológicos diferentes. Las CCIs son los fonoreceptores propiamente dichos, y son capaces de transducir los estímulos con una gran fidelidad incluso a frecuencias e intensidades de sonido muy elevadas (LoGiudice & Matthews, 2009; Marcotti, 2012). Son piezas fundamentales del proceso de transducción del sonido en el órgano de Corti, junto con la membrana tectorial y la basilar. Estas células poseen en la zona basal una maquinaria de liberación sináptica muy desarrollada y como consecuencia de la despolarización producida por el movimiento de los estereocilios liberan glutamato, activando así a los receptores para este neurotransmisor presentes en las dendritas de las neuronas aferentes que las inervan. Estas son las neuronas cuyos axones conforman el nervio auditivo, el cual lleva las señales hacia el sistema nervioso central (SNC) (Wichmann & Moser, 2015).

Las CCEs, en cambio, participan en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina de la membrana basilar. 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 es capaz de cambiar su conformación en función del potencial de membrana y así modificar la geometría de las CCEs (Ashmore, 2008; Dallos, 2008; Liberman et al., 2002; Oghalai et al., 1998; N. Yu et al., 2006; Zheng et al., 2000). Al alargarse y encogerse sincronizadamente, las CCEs generan que las esterocilias de las CCIs se desplacen más y de esta manera se logra una amplificación de la señal que es enviada al SNC. De hecho, el descubrimiento de la función amplificadora de las CCEs fue esencial para explicar la elevada sensibilidad y capacidad de sintonización fina del sistema auditivo de los mamíferos, puesto que el mecanismo pasivo dependiente de las oscilaciones de la membrana basilar era insuficiente para explicar dicho fenómeno (Hudspeth, 2008; Robles & Ruggero, 2001).

Los somas de ambos tipos de células ciliadas están embebidos en perilinfa. Las esterocilias, por su parte, se encuentran bañadas por endolinfa y están en contacto con la membrana tectorial, que recubre el órgano de Corti. Debido a las concentraciones diferenciales de los fluidos que las rodean, se genera un

potencial electroquímico de alrededor de +80 mV, conocido como potencial endococlear, el cual es una parte indispensable para la transducción del estímulo sonoro como veremos más adelante.

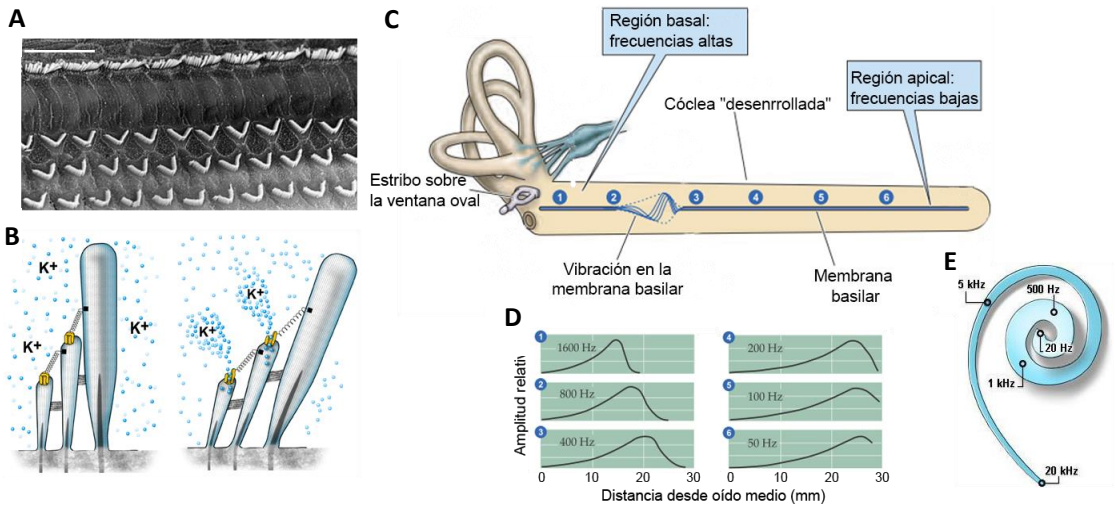

Figura 2| El órgano de Corti y la decodificación del sonido. A. Imagen de una microscopía electrónica de barrido en la que se observan las esterocilias pertenecientes a las CCIs y CCEs. Barra de escala, 15 µm. **B.** Representación del proceso de mecanotransducción en las células ciliadas, en el que 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^+. **C,D**. Representación de una cóclea "desenrrollada" 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. **E.** Esquematización del gradiente de frecuencias para el rango de frecuencias correspondiente a humanos. Imágenes modificadas a partir de www.cochlea.eu y Purves, 2004.

1.3. Transducción del sonido

Habiendo atravesado el oído externo y medio, las ondas de sonido alcanzan el medio acuoso en el interior de la cóclea y se propagan a través de este, generando así oscilaciones en la membrana basilar. Dado que la membrana basilar tiene un grosor y una rigidez diferencial a lo largo de la cóclea, dependiendo de la composición espectral del estímulo será el sitio donde la membrana tenga la mayor amplitud de movimiento (von Békésy, 1960). La región apical de la membrana basilar es delgada (~0.7 µm) y flexible en comparación con la región basal, de mayor grosor (~3 µm) y rigidez, presentado un gradiente entre ambos extremos (Nam & Fettiplace, 2010). Esto determina que, si bien los estímulos entrantes generan vibraciones en 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 2C-E). Se trata de un fenómeno pasivo, conocido como sintonización macromecánica y le confiere una propiedad tonotópica a la cóclea. De esta manera, el movimiento oscilatorio de la membrana en una

región en particular hará que el epitelio sensorial que está apoyado sobre ella oscile, provocando deflexiones en las estereocilias de las células ciliadas al impactar éstas contra la membrana tectorial que las recubre (Figura 2.B).

Las esterocilias están unidas entre sí por filamentos denominados "tip links" los cuales a su vez están anclados a un complejo mecanotransductor localizado en la membrana de las células ciliadas. La apertura de estos canales a causa del movimiento cíclico de las estereocilias permite la entrada de K^+ al citoplasma y gatilla en última instancia la apertura de canales de calcio voltaje dependientes (CCVDs) y la liberación de glutamato (Fettiplace, 2017; Vollrath et al., 2007; Zhao & Müller, 2015). 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 CCIs y CCEs están sometidas a ciclos de despolarizaciones e hiperpolarizaciones (Dallos, 1985, 1992; Dallos et al., 1982; Russell & Kossl, 1991; Russell & Sellick, 1978). 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 CCIs y CCEs. Es así como las células ciliadas llevan a cabo la compleja tarea de convertir un estímulo mecánico en un estímulo eléctrico, el cual será enviado hacía el SNC por medio de las neuronas aferentes.

1.4. Transmisión de la información al SNC: inervación aferente

La sinapsis aferente entre las CCIs y las neuronas del ganglio espiral (NGEs) 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(Fuchs, 2005; Fuchs et al., 2003; Goutman et al., 2015; Hudspeth, 1997). En el animal adulto, las CCIs presentan únicamente inervación de tipo aferente. Existen dos tipos de NGEs, las de tipo I y las de tipo II. Las NGEs de tipo I constituyen el 95% de las neuronas aferentes y proyectan radialmente una única dendrita que contacta una única CCI (Spoendlin & Schrott, 1988). A su vez, cada CCI es contactada por aproximadamente 20-30 dendritas de las NGEs, cuyos axones constituyen las fibras mielinizadas de tipo I que forman el nervio auditivo (Moser et al., 2006). Por otro lado, las NGEs de tipo II envían una dendrita que luego se ramifica para contactar numerosas CCEs. Los axones de estas neuronas conforman las fibras no mielinizadas del nervio auditivo y algunos estudios han demostrado que responden solamente a estímulos muy intensos, potencialmente traumáticos (Brown, 1994; Robertson et al., 1999).

La presinapsis entre las CCIs y las NGEs tipo I, es conocida como sinapsis en cinta por la estructura que tiene al visualizarse bajo el microscopio electrónico. La característica de dicha sinapsis es su capacidad para liberar glutamato de una manera muy rápida y casi sin llegar a la depleción de vesículas incluso ante

estímulos sonoros mantenidos en el tiempo. En la postsinapsis se encuentran receptores del tipo AMPA que permiten la entrada de Na^+, K^+ y Ca^{2+}, despolarizando la dendrita y dirigiendo la señal al primer relevo en el SNC, el núcleo coclear (NC). La mayoría de las fibras del núcleo coclear cruzan la línea media del tronco encefálico para hacer sinapsis con el complejo de la oliva superior, sobre el cual nos referiremos en más detalle en la próxima sección, conformando el segundo relevo de la vía auditiva primaria. El tercer relevo está situado a nivel del mesencéfalo y contiene al colículo inferior. El último relevo ocurre en el cuerpo geniculado medial dentro del tálamo, donde luego las señales son transmitidas a la corteza auditiva (Elgoyhen et al., 2015) (Figura 3.A). Muchos de los relevos del sistema auditivo tienen una organización tonotópica, es decir que responden a una frecuencia de sonido en particular. Así, la información acústica tiene un primer procesamiento en la cóclea, pero es luego decodificada en los distintos relevos neuronales hasta llegar a la corteza auditiva.

1.5. Transmisión de la información desde el SNC: inervación eferente

La inervación eferente que llega al órgano de Corti proviene de dos núcleos colinérgicos localizados en el complejo de la oliva superior (SOC): la Oliva Lateral Superior (LSO por sus siglas en inglés) y el Núcleo Ventral de Cuerpo Trapezoidal (VNTB por sus siglas en inglés) (Figura 3.B). El LSO es un núcleo bien definido que es fácilmente reconocible por su forma de "S" apaisada, y contiene a las neuronas laterales olivococleares (LOC) las cuales son pequeñas y redondeadas (12-14 µm de diámetro). El VNTB es un núcleo más difuso, localizado ventral al LSO, y contiene a las neuronas mediales olivococleares (MOC) las cuales son más grandes y típicamente multipolares, aunque varían en su forma (20 µm o más) (Guinan et al., 1983; Vetter et al., 1991). Las neuronas LOC tienen fibras amielínicas e inervan principalmente la cóclea ipsilateral, estableciendo contactos axodendríticos con las NGEs de tipo I. Por el contrario, las neuronas MOC tienen fibras mielinizadas e inervan principalmente la cóclea contralateral estableciendo contactos axosomáticos con las CCEs (Liberman & Brown, 1986), aunque también envían proyecciones a la cóclea ipsilateral, al núcleo coclear (NC), al LSO y al colículo inferior (CI) (Warr & Beck, 1996). Las neuronas MOC reciben *inputs* ascendentes del NC, además de otros *inputs* descendentes de colículo inferior, corteza auditiva primaria, así como del núcleo medial del cuerpo trapezoidal (MNTB) y otros centros no auditivos (Cadenas et al., 2020; Terreros & Delano, 2015) Al igual que muchos de los núcleos ascendentes, el sistema eferente MOC también está organizado tonotópicamente (Brown, 2014).

Cuando se percibe un sonido, se excitan las neuronas del núcleo coclear, excitando a su vez a las neuronas MOC las cuales inhiben mayormente la ganancia de la cóclea contralateral. Esto es un acto reflejo conocido como reflejo acústico medial olivococlear, e involucra al VNTB, el NC y a la cóclea. Se ha determinado que la actividad inhibitoria MOC aumenta con la intensidad del estímulo y que produce una reducción en el tamaño de la población de neuronas aferentes activadas por estímulos sonoros, lo que se traduce en una disminución de la sensibilidad auditiva global (Brown, 1989; Galambos, 1956; Gifford & Guinan, 1987; Wiederhold & Kiang, 1970). De esta manera, las neuronas MOC están involucradas en

importantes procesos como el ajuste de la ganancia coclear, la detección de sonidos en ambientes ruidosos o la protección ante el trauma acústico (Boero et al., 2018; Delano et al., 2007; Guinan & Gifford, 1988; Kawase et al., 1993; Maison et al., 2013; Reiter & Liberman, 1995; Taranda et al., 2009).

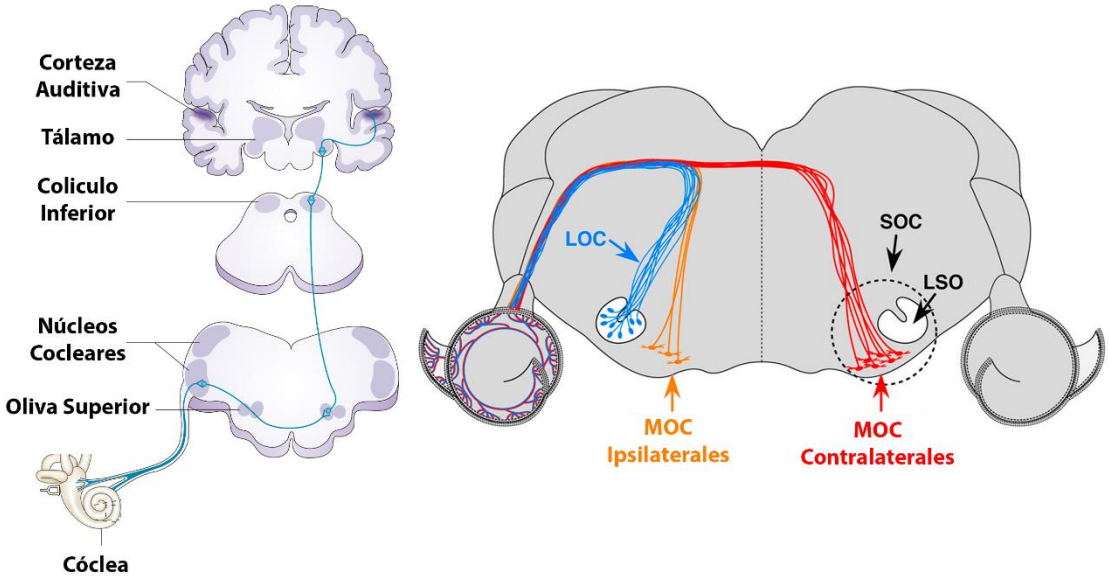

Figura 3| Vías auditivas aferentes y eferentes. A. Esquema de la vía auditiva aferente o ascendente. La sinapsis en cinta entre las CCIs y NGEs es la primera sinapsis de la vía ascendente. Luego siguen varios núcleos que son instancias de relevo dentro del SNC. Figura modificada a partir de Elgoyhen et al., 2015. **B.** Esquema de la vía auditiva eferente o descendente. El complejo de la oliva superior (SOC) contiene a los núcleos auditivos a nivel del tallo cerebral, donde se originan las proyecciones eferentes que inervan la cóclea. Dentro del SOC se ubica el LSO, en el cual se encuentran los somas de las neuronas LOC que inervan principalmente la cóclea ipsilateral. En una posición más medio-ventral del SOC se encuentra el VNTB donde se encuentran los somas de las neuronas MOC que inervan principalmente la cóclea contralateral y en un menor número la cóclea ipsilateral. Adaptado de Maison et al., 2013.

1.6. Importancia del sistema eferente olivococlear durante el desarrollo

El sistema eferente olivococlear también tiene un importante rol durante el desarrollo. Previo al inicio de la audición, durante un breve período, las neuronas MOC establecen múltiples contactos axosomáticos de manera transitoria con las CCIs (Bruce et al., 2000; Moglie et al., 2018; Roux et al., 2011). Los mamíferos altriciales nacen sordos, sin embargo, a pesar de que las células ciliadas no reciben ningún tipo de *input* sonoro, disparan potenciales de acción espontáneos. Esta tasa de disparos es controlada por las neuronas MOC (Figura 4). Esta sinapsis, si bien es de carácter colinérgico, tiene un rol inhibitorio sobre las CCIs. La liberación de ACh de los terminales MOC, actúa postsinápticamente activando los receptores α9α10 expresados en las CCIs (Elgoyhen et al., 2001) (Figura 4.A). Este tipo 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+} (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Gómez-Casati et al., 2005a). Acoplado al receptor α9α10 se encuentran los canales de potasio dependientes de calcio

SK2, los cuales al activarse permiten el eflujo de potasio fuera de la CCI, dando como resultado neto la hiperpolarización de la misma (Elgoyhen & Katz, 2012; Fuchs, 2014; Oliver et al., 2000) (Figura 4.B). Además, se ha propuesto que cisternas sinaptoplásmicas cercanas a la membrana basolateral de las CCIs podrían aportar más Ca^{2+} para la activación de los SK2 a partir de mecanismos de liberación de Ca^{2+} inducidos por Ca^{2+}, y a la vez que podrían contribuir a la restricción espacial de este catión (Fuchs, 2014; Fuchs et al., 2014; Lioudyno et al., 2004; Moglie et al., 2018).

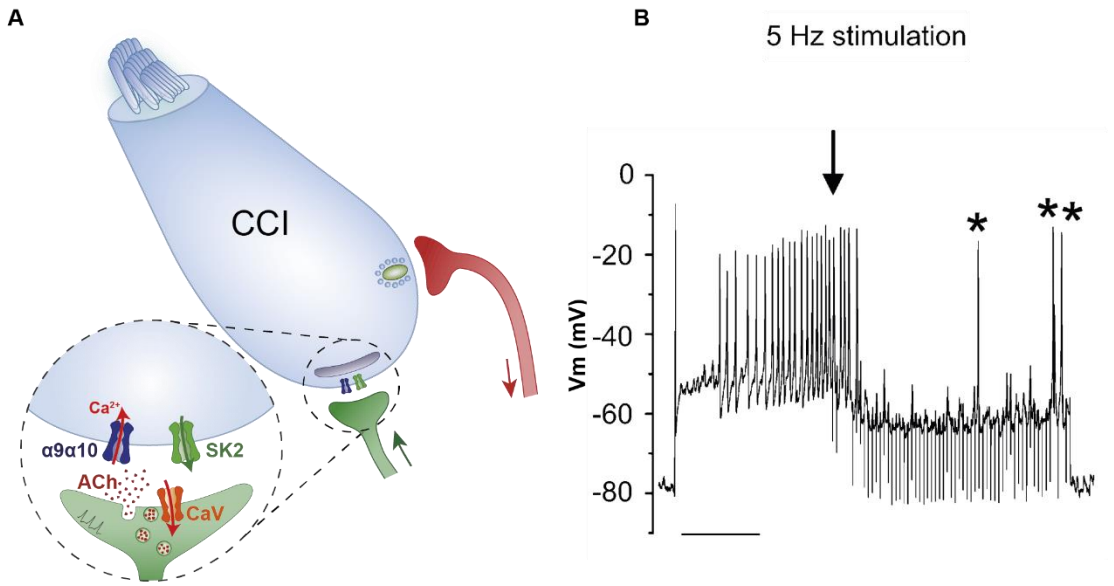

Figura 4| Establecimiento de los contactos sinápticos con las CCIs durante el desarrollo postnatal. A. Durante el desarrollo postnatal los terminales MOC establecen contactos axo-somáticos con las CCIs. Ante la llegada de un potencial de acción, los terminales MOC (verdes) se despolarizan y permiten el ingreso de calcio por medio de los canales de calcio voltaje dependientes (CCVDs). Esto genera la liberación de acetilcolina (ACh) y la activación del receptor α9α10, el cual permite el ingreso de calcio a la CCI. Subsecuentemente, el calcio activa los canales de potasio dependientes de calcio (SK2), permitiendo el eflujo de este ión fuera de la CCI e hiperpolarizando la membrana. Durante esta misma ventana temporal se están estableciendo los contactos sinápticos entre las CCIs y las NGSs (rojo). **B.** La tasa de disparos espontánea de las CCIs previo al inicio de la audición es silenciada por la actividad de las MOC (estimuladas eléctricamente a una frecuencia de 5 Hz a partir de momento indicado con una flecha). Algunos potenciales de acción igualmente ocurrieron bajo ese estado más hiperpolarizado (indicados con asteriscos). La barra de escala equivale a 2 s. Adaptado de Goutman et al., 2005.

Las CCIs reciben múltiples contactos eferentes durante el desarrollo, aunque su número absoluto es aún hoy materia de controversia. Mientras que algunas marcaciones dan un promedio de 16 contactos por CCI (Osman et al., 2008; Roux et al., 2011), otras aproximan ese número a 25 (Roux et al., 2011). Sin embargo, es probable que no todos los contactos sean sinapsis funcionales. A partir de experimentos de imágenes de calcio en ratones de 9 a 11 días de edad, se halló un promedio de 4.4 ± 0.7 terminales eferentes contactando una misma CCI (Moglie et al., 2018). Independientemente del número absoluto de

terminales que contactan una CCI, es claro que son numerosos y que todos en su conjunto permiten lograr una delicada regulación efectiva de la tasa y el patrón de disparos espontánea de las CCIs.

La disfunción del sistema eferente olivococlear genera una maduración incorrecta de las vías auditivas aferentes. Por un lado, mediante experimentos realizados en ratones que carecen la subunidad α9 del receptor α9α10 (α9KO), se demostró que la inhibición colinérgica eferente regula la maduración las sinapsis en cinta entre las células ciliadas internas y las NGEs, ya que las mismas muestran una dependencia de calcio anormal, similar a la de una sinapsis inmadura (Johnson et al., 2013). Además, morfológicamente estos ratones tienen un patrón anormal de inervación eferente, ya que están inervados por un terminal de gran tamaño en vez de múltiples terminales más pequeños, y funcionalmente tienen deficiencias en la supresión de las respuestas cocleares durante la activación eferente (Vetter et al., 1999). Por otro lado, estos mismos ratones tienen una organización tonotópica del LSO alterada, dificultando la tarea de la localización del sonido y de las frecuencias (Clause et al., 2017), así como en el MNTB, donde se encontraron déficits en la fuerza sináptica y la ausencia de un refinamiento axonal de este mismo núcleo (Clause et al., 2014). Por otro lado, en ratones con una ganancia de función en la subunidad α9α10, es decir que poseen un sistema eferente con una actividad exacerbada, también se observó una pérdida de la tonotopía en el MNTB, junto con alteraciones sinápticas y morfológicas (Di Guilmi et al., 2019). En estos mismos ratones, también se ha reportado una mayor resistencia al trauma acústico y ante la pérdida de audición oculta (o *hidden hearing loss* en inglés) (Boero et al., 2018; Taranda et al., 2009).

Cercano al momento en el cual comienza la audición, las fibras MOC dejan de establecer contactos sinápticos con las CCIs y cruzan el túnel de Corti para dirigirse al haz olivococlear externo, donde finalmente establecen contactos axosomáticos con las CCEs que van a persistir durante toda la vida del animal adulto (Simmons et al., 1998a) (Figura 5). La sinapsis MOC-CCE opera también a través de los receptores α9α10 y los canales SK2, inhibiendo a las CCE y controlando su actividad electromotil. Existe también, una modulación eferente mediada por las neuronas LOC, las cuales establecen contactos sinápticos con las dendritas de las NGEs. Esta sinapsis axodendrítica también tiene carácter inhibitorio, aunque los mecanismos mediante los cuales opera son aún hoy desconocidos y materia de debate (Fuchs & Lauer, 2019).

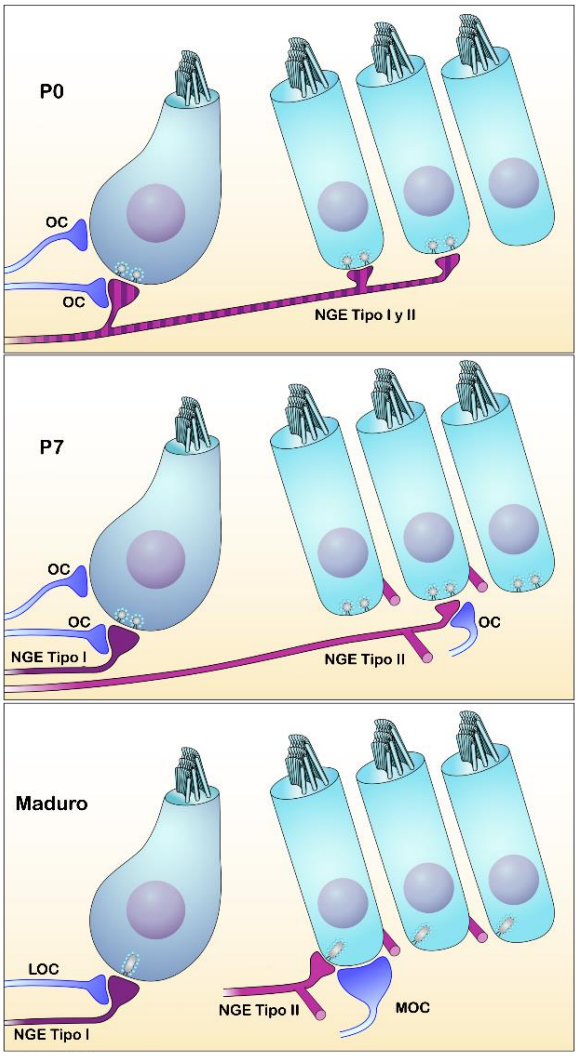

Figura 5 | Desarrollo postnatal de la inervación coclear en mamíferos altriciales. *Panel superior*: al momento del nacimiento, el polo basal de la CCI presenta 3 tipos de sinapsis: 1) aferentes inmaduros axosomáticos; 2) eferentes transitorios axosomáticos; 3) eferentes axodendríticos. Las CCIs y las CCEs pueden ser inervadas por la misma NGE. Las CCEs no presentan inervación eferente. *Panel medio*: al finalizar la primera semana, las CCIs son inervadas por NGE de tipo I y las CCEs por las tipo II. Se observan fibras eferentes en proximidad con las CCE. *Panel inferior*: en la cóclea madura, las CCIs solo presentan sinapsis aferentes. Las neuronas olivococleares laterales contactan los botones sinápticos de las NGE de tipo I mientras que los eferentes mediales olivococleares hacen sinapsis directa sobre las CCEs. Adaptado de Bulankina y Moser, 2012.

1.7. Presencia y función de GABA en el sistema olivococlear

El ácido γ-aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor típicamente de carácter inhibitorio, ampliamente presente en el sistema nervioso central. Es sintetizado a partir de ácido glutámico por la enzima ácido glutámico decarboxilasa o GAD. Si bien la inervación eferente es de carácter colinérgica, existen reportes de una profusa inervación GABAérgica en la cóclea de mamíferos. Mayormente mediante técnicas de inmunohistoquímica, se ha visto la presencia de una marcación GABAérgica tanto en el haz olivococlear interno (donde se establecen los contactos sinápticos con las CCIs) como en el externo (donde se establecen los contactos sinápticos con las CCEs) en cobayos (Helfert et al., 1989), monos (Thompson et al., 1986), humanos (Schrott-Fischer et al., 2007), ratas (Vetter et al., 1991) y ratones (Maison et al., 2003). Más aún, hay reportes de experimentos de microscopía inmunoelectrónica en cócleas de cobayos en los que se evidencia la existencia de contactos sinápticos axodendríticos GABAérgicos con las neuronas aferentes que contactan las CCI, y contactos axosomales entre estos terminales GABAérgicos y las CCE (Eybalin et al., 1988). Por otro lado, un trabajo realizado en el órgano de Corti de ratas adultas mostró que la incubación con suero anti-GAD marca una población de terminales diferente a la observada con un marcador de terminales colinérgicos, siendo ambas marcaciones similares en número. A excepción de estos

trabajos que fueron realizados en animales adultos, en un trabajo realizado por Whitlon y Sobkowicz, se analizó la inmunoreactividad de GABA en la cóclea de ratones en desarrollo (Whitlon & Sobkowicz, 1989). Los resultados hallados en este trabajo muestran un patrón de inervación sorprendentemente similar a lo descripto para la inervación colinérgica de las fibras MOC: se establecen primero contactos con las CCIs conformando el haz olivococlear interno, y luego del inicio de la audición se establecen contactos con las tres filas de CCEs (Figura 6).

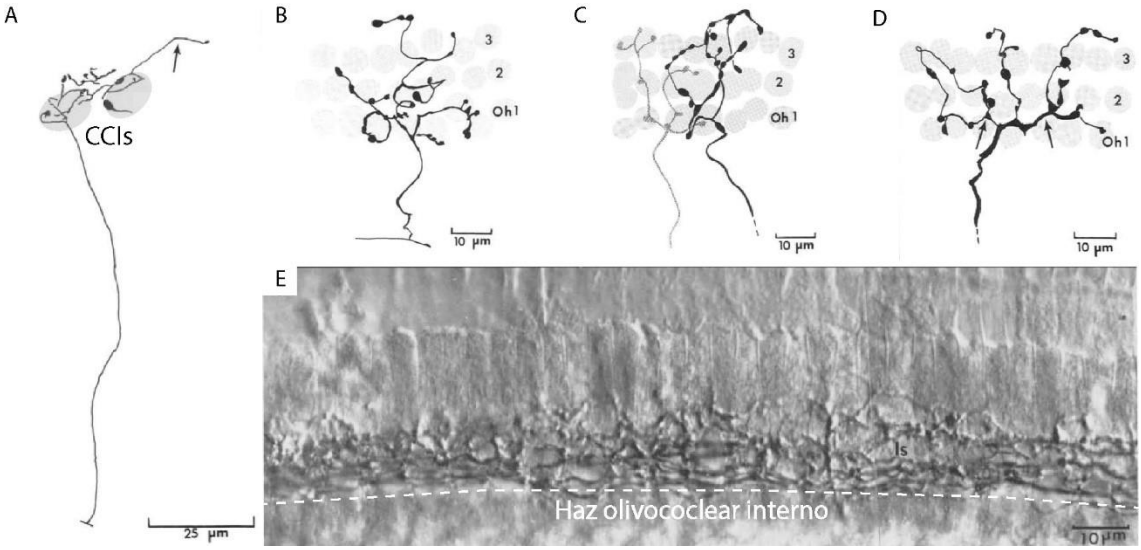

Figura 6| Inmunoreactividad GABAérgica en la cóclea en desarrollo. A. Representación de una fibra GABAérgica inervado a dos CCIs a P2. La flecha indica el curso espiral que algunas fibras toman y que luego generan el haz olivococlear interno. **B,C y D.** Representación de fibras GABAérgicas inervando múltiples CCEs de las tres filas (Oh 1, 2 y 3) a P12. **E.** Marcación GABAérgica en el haz olivococlear interno a P8. Adaptado de Whitlon & Sobkowicz, 1989.

Como ya hemos introducido, la inervación eferente de la cóclea proviene de dos núcleos colinérgicos localizados en el tronco encefálico: el LSO y el VNTB. Interesantemente, además de neuronas colinérgicas, estos núcleos contienen también poblaciones de neuronas glicinérgicas, CGRP positivas y GABAérgicas (Helfert et al., 1989; Vetter et al., 1991). Experimentos realizados en ratas adultas demostraron que las neuronas LOC que proyectan hacia la cóclea son aproximadamente 50% GAD positivas (GAD+) y 50% ChAT positivas (ChAT+), y que las neuronas ChAT+ son todas CGRP positivas. Según los mismos autores, el sistema eferente medial olivococlear es mayormente colinérgico, aunque se observaron neuronas GAD+ que proyectan a la cóclea ipsilateral (Vetter et al., 1991). Otro estudio realizado en cobayos demostró que la mayoría de las neuronas del LSO son GABAérgicas, así como la mayoría de las neuronas del VNTB (Helfert et al., 1989). Sumado a estas evidencias, inyecciones intracocleares con un marcador retrógrado análogo al GABA, demostraron que las neuronas del VNTB proyectan al haz olivococlear interno y externo (Ryan et al., 1986). De este modo, el sistema olivococlear es la única fuente conocida de input GABAérgico en la cóclea de mamíferos (Maison et al., 2009).

A pesar de los numerosos reportes de la presencia de GABA en el órgano de Corti así como en el SOC, el rol fisiológico del mismo en el sistema olivococlear no está completamente dilucidado aún. Por un lado, se ha demostrado que la aplicación de GABA exógeno inhibe de actividad de las NGEs tipo I, probablemente mediante receptores $GABA_A$ (Arnold et al., 1998; Felix & Ehrenberger, 1992). Por otro lado, los ratones que carecen el gen que codifica para las subunidades α5, β2, β3 del receptor $GABA_A$ (Maison et al., 2006) o la subunidad B1 del receptor $GABA_B$ (Maison et al., 2009), presentan una elevación en los umbrales de los productos de distorsión otoacústicos (DPOAEs) y en los potenciales evocados del tronco cerebral (ABRs). Ambas mediciones son indicativas de que el funcionamiento de las CCEs como amplificadores cocleares está parcialmente impedido. En concordancia con tales resultados, se ha reportado un aumento en la motilidad de las CCEs mediado por GABA (Batta et al., 2004), así como la hiperpolarización de su membrana al aplicar agonistas de los GABA-Rs, sugiriendo la existencia de receptores GABAérgicos postsinápticos (Gitter & Zenner, 1992). El rol GABAérgico durante el desarrollo no fue dilucidado hasta recientemente. Registros electrofisiológicos realizados en un modelo animal de ratón en desarrollo demostraron un importante rol modulatorio de GABA sobre la sinapsis MOC-CCI (Wedemeyer et al., 2013). A partir de experimentos de farmacología realizados en este trabajo, se demostró que la aplicación GABA exógeno no genera ninguna corriente postsináptica, indicando la ausencia de receptores ionotrópicos de GABA en las CCIs. Sin embargo, la aplicación de antagonistas (CGP) o de agonistas (Baclofen) de los receptores metabotrópicos $GABA_B$ modificaron la probabilidad de liberación de ACh de la sinapsis MOC-CCI. GABA activa receptores $GABA_B$ presinápticos, los cuales en su estado activo inhiben a los CCDVs del tipo P/Q, disminuyendo así la probabilidad de liberación de ACh de los terminales MOC (Figura 7).

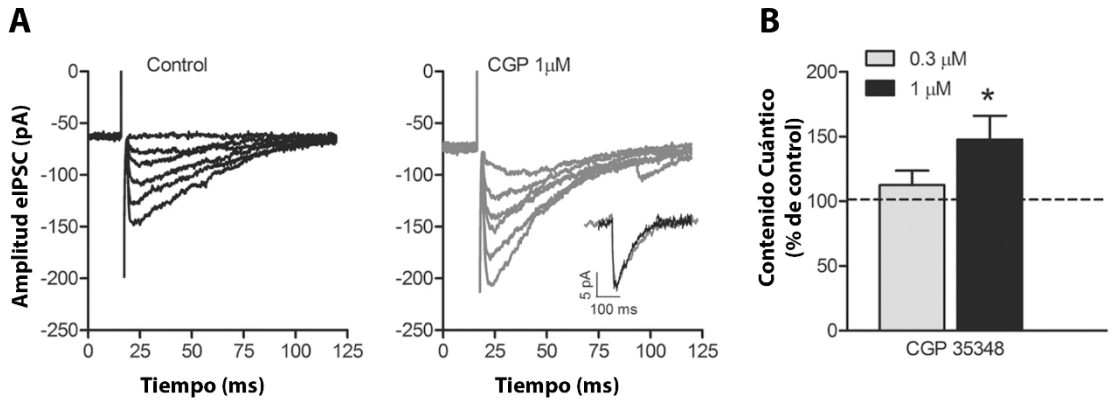

Figura 7| CGP, un antagonista de los receptores $GABA_B$ aumenta la probabilidad de liberación de ACh en la sinapsis MOC-CCI. A. Trazos representativos de los eIPSCs en una situación control (trazos negros) o bajo la aplicación de CGP 1μM (trazos grises). La amplitud de los mIPSCs no cambia (*inset*). **B.** CGP 35348 1μM aumenta el contenido cuántico de manera significativa. Figura adaptada de Wedemeyer et al., 2013.

A pesar de que ACh es el principal neurotransmisor del sistema eferente MOC, GABA tiene un importante rol en la vía eferente olivococlear. Las múltiples evidencias aquí recapituladas dan un indicio de

su relevancia en el sistema auditivo periférico, particularmente, durante el desarrollo en la sinapsis MOC-CCI.

1.8. Co-transmisión de Neurotransmisores

La co-transmisión se define ampliamente como la liberación de múltiples neurotransmisores desde una misma neurona (Vaaga et al., 2014). A diferencia de la co-liberación, en la cual los neurotransmisores son liberados en la misma vesícula, en el fenómeno de co-transmisión el empaquetado de los neurotransmisores se hace en vesículas diferentes (Vaaga et al., 2014). La existencia de numerosos ejemplos de neurotransmisores coexistiendo en el mismo tipo neuronal provocó que la comunidad científica revisara el principio de Dale, el cual establecía que una neurona era capaz liberar un solo tipo de neurotransmisor de todos sus terminales (Strata & Harvey, 1999). Si bien algunos autores ya habían demostrado de una manera muy elegante con técnicas de electrofisiología que la co-liberación de neurotransmisores es un evento que existe en la naturaleza (Jonas et al., 1999; Seddik et al., 2007), el descubrimiento de la optogenética hizo que se diera un salto sustancial en esta materia.

El fenómeno de co-liberación o co-transmisión en el sistema nervioso central ha dejado de ser la excepción a la regla. En particular, actualmente hay evidencias de que GABA es liberado con una plétora de otros neurotransmisores (Tritsch et al., 2016). En el sistema auditivo de mamíferos se ha reportado la co-liberación de GABA y glicina de las neuronas del núcleo ventral del lemniscus lateral (Moore & Trussell, 2017). Además, imágenes de microscopía electrónica y marcaciones con anticuerpos conjugados a partículas de oro demostraron la presencia de vesículas conteniendo GABA o glutamato junto con glicina en el LSO de cobayos (Helfert et al., 1992). De la misma manera, se ha reportado la presencia de GABA y glicina empaquetados en las mismas vesículas de terminales que contactan las neuronas del núcleo coclear dorsal de rata (Rubio, 2004). Además, si bien en animales adultos las sinapsis entre el MNTB y el LSO son de carácter glicinérgico, durante el desarrollo esta sinapsis tiene un carácter dual GABAérgico/glutamatérgico (Albrecht et al., 2014). Si bien estos últimos neurotransmisores tienen comúnmente efectos antagónicos, durante el desarrollo. Por el contrario, la idea de que dos neurotransmisores con signos opuestos sean liberados de la misma sinapsis era un concepto menos parsimonioso. Sin embargo, se demostró que en la retina, las células amácrinas establecen sinapsis con las células ganglionares y co-transmiten GABA y ACh, lo cual es importante para la codificación en la sensibilidad y la selectividad de la dirección del movimiento de las claves visuales (Lee et al., 2010). De una manera muy interesante, este estudio reveló que la liberación de GABA y ACh está diferencialmente modulada por la concentración de calcio extracelular y que la población de vesículas no se solapa en los terminales, o bien tiene un solapamiento parcial. Posteriormente, se halló que las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal también eran capaces de liberar GABA (Saunders et al., 2015). Mediante técnicas de inmunohistoquímica, microscopía de ultraresolución y optogenética se demostró que GABA y ACh no son co-liberados sino que son co-transmitidos de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Takács et al., 2018). Las observaciones realizadas sobre la co-transmisión de GABA y ACh en la retina y en el

prosencéfalo basal, junto con los antecedentes de la inervación GABAérgica en la cóclea, nos llevaron a hipotetizar sobre una posible co-tranmisión de estos dos neurotransmisores en la sinapsis eferente olivococlear MOC-CCI.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

La presente tesis doctoral tiene por objetivo profundizar en el entendimiento del mecanismo regulatorio mediado por GABA sobre la liberación de ACh en la inervación eferente olivococlear durante un período crítico del desarrollo del sistema auditivo, previo al comienzo de la audición

2.2. Objetivos Particulares

- Determinar si las neuronas mediales olivococleares que contactan las CCIs durante en desarrollo co-transmiten GABA junto con ACh.

- Analizar la modulación GABAérgica sobre la liberación de ACh sobre los múltiples terminales de las neuronas mediales olivococleares que establecen contactos sinápticos con una misma CCI.

Materiales y Métodos

3.1. Animales y líneas transgénicas

Todos los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo con la Guía de Eutanasia de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, por sus siglas en inglés), Edición 2020, y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INGEBI. En todos los experimentos se utilizaron ratones de ambos sexos indistintamente entre los 9 a 11 días postnatales (P9-11). Para los experimentos de registros de calcio se utilizaron ratones de la cepa *Balb-c*. Para los experimentos de estimulación optogenética se utilizaron 3 líneas de ratones transgénicas para activar únicamente las neuronas colinérgicas o las neuronas GABAérgicas tal como se describe en la Figura 8.A,C: B6;129S6-Chat$^{tm2(cre)Lowl}$/J (stock # 006410) el cual expresa la recombinasa *cre* bajo el promotor de la enzima que sintetiza ACh (de ahora en adelante denominado ChAT*cre*), Gad2tm1$^{(cre/ERT2)Zjh}$/J (stock # 010702) que expresa *creER^{T2}* bajo el promotor de la enzima que sintetiza GABA (de ahora en adelante denominado GAD*cre*), B6;129S-Gt(ROSA)$^{26Sortm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze}$/J (stock # 012569) que contiene el gen que codifica para una canalrodopsina (ChR2) fusionada a una proteína fluorescente amarilla (eYFP) con un codón STOP río arriba flanqueado por dos sitios *loxP* (de ahora en adelante denominado ChR2-eYFP). Al cruzar la línea ChAT*cre* con la línea de ChR2-eYPF obtenemos una expresión de la ChR2 limitada a las neuronas colinérgicas (Figura 8.A). Dada la naturaleza del cruzamiento realizado, la F1 contiene a ambos transgenes en hemicigocis, es decir solo tienen una copia de cada transgén (ChAT$^{+/cre}$;ChR2-eYFP$^{+/fl}$). En el caso de que el experimento haya requerido la homocigosis del transgén de la ChR2, se realizaron retrocruzas de los ratones ChAT$^{+/cre}$;ChR2-eYFP$^{+/fl}$. Dado que la hemicigosis de la recombinasa *cre* no es un factor limitante, se utilizaron ratones de los genotipos ChAT$^{cre/cre}$;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ o ChAT$^{+/cre}$;ChR2-eYFP$^{+/fl}$ (referidos como ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$). Por otro lado, al cruzar la línea GAD*cre* con la línea de ChR2-eYFP, obtenemos una expresión de la ChR2 limitada a las neuronas GABAérgicas (Figura 8.C). Esta línea de ratones transgénica es inducible, lo cual significa que la recombinación no es constitutiva, sino que puede ser activada en una ventana de tiempo que sea conveniente para el experimentador. Para conferirle la capacidad de inducción, la recombinasa *cre* está fusionada a un dominio mutado de la proteína que codifica para el receptor de estrógeno (*ER^{T2}*) (Feil et al., 1997). En condiciones normales, la recombinasa *creER^{T2}* está en el citoplasma y es incapaz de translocar al núcleo celular. Al unirse con 4-hidroxitamoxifeno (OHT), la recombinasa es capaz de ingresar al núcleo y situarse sobre los sitios *loxP* para realizar la recombinación. Para lograr la inducción de *creER^{T2}* en los ratones GAD;ChR2-eYFP, se inyectaron ratones neonatos con Tamoxifeno (T5648-1G, Sigma-Aldrich) el cual es metabolizado en OHT (100 mg/g de masa corporal, 4 días consecutivos de inyección intraestomacal comenzando a P3). Dado que la colonia de ratones GAD*cre* no se puede mantener en homocigosis, se dificultó la obtención de animales homocigotas para ChR2-eYFP al momento de realizar experimentos. Por dicho motivo se utilizaron animales con todas las combinaciones de transgenes posibles, siempre y cuando tuvieran la recombinasa *cre*: GAD$^{+/cre}$;ChR2-eYFP$^{+/fl}$, GAD$^{cre/cre}$;ChR2$^{+/fl}$, GAD$^{+/cre}$;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$, GAD$^{cre/cre}$;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$. Dado que se utilizaron indiscriminadamente, nos referiremos a estos ratones como GAD;ChR2-eYFP. Finalmente, para los experimentos de inmunohistoquímica se utilizaron las líneas transgénicas ChAT*cre* y GAD*cre* cruzadas con la línea B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}$/J (stock #007914) que contiene al gen que codifica para una

proteína fluorescente roja (TdTomato) con un codón STOP río arriba flanqueado por dos sitios *loxP* (Figura 8.B,D). Estos experimentos fueron realizados siempre con los transgenes en hemicigosis: ChAT$^{+/cre}$;TdTomato$^{+/fl}$ o GAD$^{+/cre}$;TdTomato$^{+/fl}$ (referidos como ChAT;TdTomato o GAD;TdTomato).

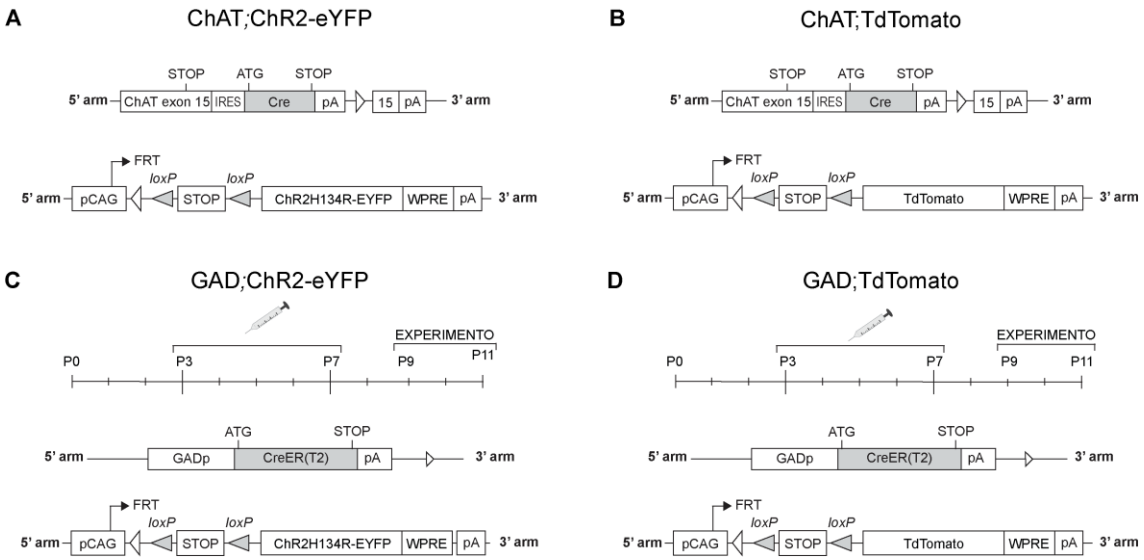

Figura 8| Representación esquemática de los transgenes de cada línea. A. *Arriba.* El vector de la línea de ratones ChAT*cre*. *Cre* está bajo el promotor ChAT, el cual expresa la proteína endógena y además la recombinasa *cre* gracias a la adición de un sitio IRES. *Abajo.* Vector de la línea de ratones ChR2-eYFP. El transgén de la ChR2 (ChR2H134R-EYFP) está localizado en el *locus* ROSA. La recombinación mediada por *cre* en los sitios *loxP* escinde un codón STOP que permite la expresión de la ChR2. **B.** Ídem A, pero esta vez el transgén TdTomato está en el *locus* ROSA. **C.** *Arriba.* Protocolo de inyección de tamoxifeno (TX) de los ratones neonatos. *Medio.* Vector de la línea de ratones GAD*cre*. En este caso, la recombinasa *cre* está directamente río debajo del promotor de GAD, con lo cual suprime la expresión de la proteína endógena e imposibilita criar dicha cepa en homocigosis. *Cre* se va a expresar tan pronto como el gen de GAD se active en el desarrollo, pero solo podrá translocar al núcleo y ejercer su función de recombinasa cuando reciba la inyección de tamoxifeno (TX). *Abajo.* Vector de la línea de ratones ChR2-eYFP. Dicho transgén está localizado en el *locus* ROSA. La recombinación mediada por *cre* en los sitios *loxP* escinde un codón STOP que permite la expresión de la ChR2. **D.** Ídem C, pero esta vez el transgén TdTomato está en el *locus* ROSA.

3.2. Disección del Órgano de Corti

Los animales fueron sacrificados por decapitación y las disecciones del órgano de Corti se realizaron bajo lupa (Leica S8AP0, Wetzlar, Alemania). Luego de extraer la cóclea, se colocó en una capsula 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. Se escindió luego la porción apical y posteriormente se removió cuidadosamente la estría vascularis, el modiolo y la membrana tectorial. La preparación se colocó sobre un cubreobjetos con un pin metálico para inmovilizarla de modo tal de que las células ciliadas queden posicionadas de frente (Figura 9). Para los experimentos de optogenética, las preparaciones se montaron en una cámara para registros electrofisiológicos y luego se colocaron bajo el

microscopio (Zeiss Axioscope, Alemania). El seguimiento visual de las preparaciones se realizó con contraste de interferencia (DIC) utilizando un objetivo de inmersión 40X y una cámara sCMOS Zyla (Andor Technology Ltd., Belfast, Reino Unido). Para los experimentos de adquisición de imágenes de calcio se utilizó un microscopio Olympus BX51WI (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), con un objetivo de inmersión de 60X y una cámara EM-CCD Andor iXon 885 (Andor Technology Ltd., Belfast, Reino Unido). En ambos casos los registros electrofisiológicos se realizaron inmediatamente luego de la disección y los mismos se prolongaron hasta un máximo de 1.5 horas.

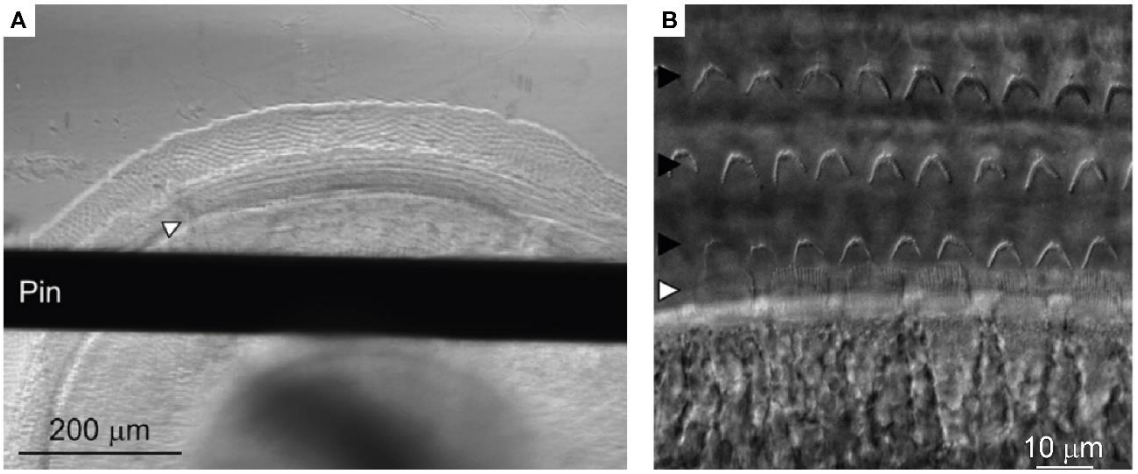

Figura 9| Montaje del órgano de Corti sobre la cámara de registro para los experimentos de electrofisiología. A. Luego de la disección, la región apical el órgano de Corti se coloca en una cámara de registro con un pin metálico que lo sujeta. La punta de flecha blanca indica la posición de la fila de CCIs. **B.** Las células ciliadas internas (flecha blanca) se reconocen fácilmente por su posición modiolar a las tres filas de CCEs (flechas negras). Adaptado de Goutman y Pyott, 2016.

3.3. Registros electrofisiológicos

Una vez montada la preparación en el microscopio correspondiente, la misma fue constantemente bañada con solución extracelular fresca (arriba descripta) a través de una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3, Bioesanco, Argentina) o mediante un sistema de perfusión por gravedad. Las CCIs fueron identificadas por su ordenamiento típico en el órgano de Corti, debajo de las tres filas concéntricas de las CCEs. Para realizar los registros intracelulares en la configuración *whole-cell patch clamp*, se utilizó un electrodo de plata adentro de pipetas de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments, Estados Unidos) con un diámetro externo de aproximadamente 1.0 mm, estirados con calor hasta obtener resistencias de ~7.5 MΩ, mediante el uso de un estirador de pipetas vertical (PC-10, Narishige, Japón). Para los experimentos de optogenética, 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 5, HEPES 5, Na2ATP 2.5; pH 7.2; 283–290 mOsm. En el caso de los experimentos de adquisición de imágenes de calcio, a esta solución se le agregó el indicador de calcio (fluo-4) quedando una solución con la siguiente composición

(en mM): KCl 95, K-ascorbato 40, HEPES 5, piruvato 2, MgCl2 6, Na2ATP 5, fosfocreatina-Na2 10, EGTA 0.5, Fluo-4 0.4. En los experimentos de optogenética, las corrientes registradas fueron amplificadas con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Estados Unidos), filtradas a 2-10 kHz y digitalizadas a 10-50 kHz mediante una placa conversora analógico-digital Digidata 1440A (Molecular Devices, Estados Unidos). Para la adquisición de las señales de corriente en modo de fijación de voltaje, se utilizó el programa pClamp 9.2 (Molecular Devices, Estados Unidos). En el caso de los experimentos de imágenes de calcio, las corrientes fueron amplificadas con un Multiclamp 700B (Molecular Devices, Estados Unidos) y filtradas y digitalizadas con una placa NI BNC2120 (National Instruments). Para la adquisición de las señales de corriente se utilizó el WinWCP v5.2.7 (desarrollado por John Dempster, University of Strathclyde, Escocia). Una vez dentro de las CCIs, se fijó un potencial de sostén (Vs) de -80 mV y se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes que permite observar las típicas corrientes iónicas descriptas previamente en las CCIs (Fuchs et al., 1990).

3.4. Estimulación eléctrica y optogenética de las fibras MOC

La estimulación eléctrica de las fibras MOC ya ha sido descripta por Goutman et al., 2005. Brevemente, con el fin de producir la liberación de ACh desde los terminales eferentes MOC, se utilizó un electrodo monopolar ubicado hacia el lado modiolar, a 20-60 µm de la CCI (Figura 10.A). 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 MΩ. El electrodo de estimulación fue llenado con solución extracelular y conectado a una fuente de voltaje constante eléctricamente aislada (estimulador Digitimer Ltd, modelo DS3), a partir de la cual se administraron estímulos de 100-500 µA con una duración de 0.2-2 ms, gatillados desde el sistema de adquisición. Previamente a la colocación del electrodo de estimulación, se removieron algunas de las células de soporte con una pipeta de limpieza a fin de facilitar la estimulación de los axones eferentes. La posición del electrodo de estimulación fue ajustada hasta obtener corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas eléctricamente (*e*eIPSCs) de manera consistente, a una frecuencia de estimulación de 1 Hz. Para los experimentos de imágenes de calcio se aplicó un protocolo de 30 estímulos eléctricos a una frecuencia de 0.2 Hz para minimizar la exposición a la luz del LED y por tanto el "fotoblanqueo". Durante el breve período en el cual se estimuló, se fijó el potencial de membrana a -120 mV con el fin de aumentar la fuerza electromotriz del Ca^{2+}.

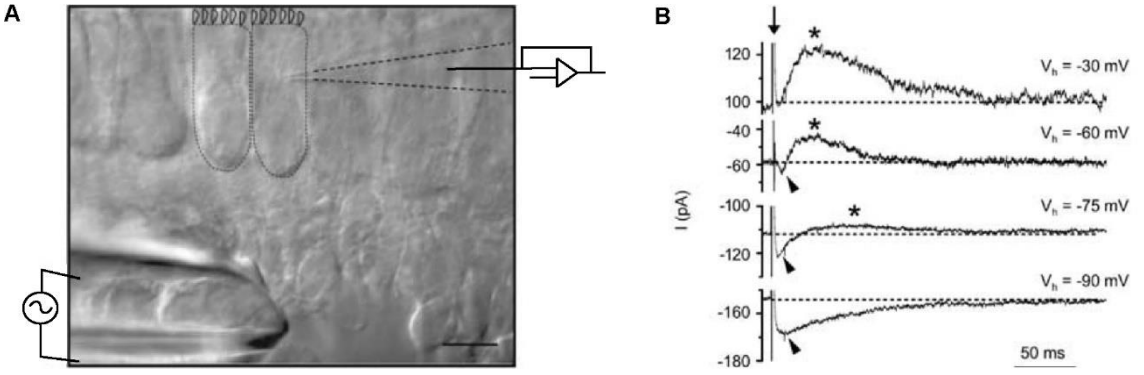

Figura 10|Estimulación eléctrica de los axones MOC. A. Ubicación de la pipeta de estimulación debajo de las CCIs. **B.** Componentes de las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas eléctricamente (*e*eIPSCs) según el potencial de membrana (Vs). A potenciales más hiperpolarizados tanto la corriente de Ca^{2+} y Na^{+} (punta de flecha negra), como la corriente de K^{+} (asterisco) es entrante. A medida que el potencial de membrana se va haciendo más positivo, el K^{+} sobrepasa su potencial de reversión (Erev ∼-82mV) y cambia su dirección generando una corriente saliente. A -60 mV puede observarse la característica respuesta bifásica que se compone de una corriente rápida entrante mediada por el nAChR α9α10 (principalmente de Ca^{2+} y Na^{+}), y la subsecuente corriente saliente y más lenta de K^{+} mediada por el canal SK2. Adaptado de (Goutman et al., 2005).

Para algunos experimentos de estimulación optogenética también se estimuló eléctricamente los terminales eferentes (estimulador Grass S48), mientras se registraba la misma CCI (*whole-cell patch clamp,* Vs = -80 mV). Para los experimentos en los cuales se solapó el estímulo eléctrico con el estímulo optogenético, el primer protocolo consistió en aplicar 60 estímulos eléctricos a una frecuencia de 1Hz. Luego se aplicaron 10 pulsos de luz de 10 ms de duración a 1 Hz (478 nm, 10.9 mW; Thorlabs, Estados Unidos) para activar la ChR2. Finalmente se solapó el estímulo eléctrico con el estímulo optogenético. Este último protocolo consistió en aplicar 60 estímulos eléctricos a una frecuencia de 1 Hz, y entre el estímulo número 20 y el estímulo número 40 prender el LED de manera continua. Para los experimentos en los cuales se contrastaron las corrientes evocadas por los diferentes métodos de estimulación, primero se aplicó un protocolo de 50 estímulos eléctricos a 1Hz y seguidamente se aplicó un protocolo de estimulación de 10 pulsos de luz a 0.03 Hz que se explicará a continuación.

Para la estimulación optogenética de las fibras ChAT*cre*-dependientes (colinérgicas) o GAD*cre*-dependientes (GABAérgicas) se utilizó un LED azul siempre en su máxima potencia. Además, con el fin de mejorar la intensidad de luz que llega a la preparación al momento de la estimulación, se removió el módulo analizador del DIC y se procuró minimizar la iluminación de luz blanca para evitar la inactivación de la ChR2. Se utilizaron cruzas de ratones ChAT*cre*xChR2-eYFP para estimular las fibras colinérgicas o GAD*cre*xChR2-eYFP para estimular las fibras GABAérgicas. Se realizó una iluminación del campo entero con pulsos de 2 ms de luz azul a una frecuencia de 0.03 Hz mientras que se registraban las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas optogenéticamente (*o*eIPSCs) a -80 mV. En las condiciones de trabajo empleadas para la mayoría de los experimentos, el Erev del K^{+} (EK) fue cercano al potencial de membrana (Vs=-80mV, EK ∼-82 mV) y el Erev de los receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs) fue cercano a cero,

lo cual generó una corriente entrante cationes como el Ca^{2+} y Na^{+} principalmente y una corriente casi nula de K^{+}, similar a lo que se observa en la Figura 10.B a -90 mV. Por el contrario, en algunos experimentos se fijó el potencial de membrana a valores más despolarizados, donde el EK es más negativo que el potencial de membrana (Vs = -40 mV, EK ∼-82 mV), y por ende las corrientes tienen un componente entrante rápido principalmente de Ca^{2+} y Na^{+} y luego un componente saliente más lento correspondiente al K^{+}, similar a lo que se observa en la Figura 10.B a -60 mV. Este tipo de corriente bifásica se debe al acople de los nAChRs α9α10 con los canales SK2 (Goutman et al., 2015; Oliver et al., 2000). Cabe destacar, que la corriente a través del nAChR no siempre se hace evidente en estas condiciones; en parte porque es muy rápida, y también porque el Vs de trabajo se encuentra relativamente cerca del potencial de reversión del nAChR (EnAChR ∼-15 mV) (Gómez-Casati et al., 2005).

3.5. Protocolo de los experimentos de farmacología

Para los experimentos de farmacología e imágenes de calcio se aplicó el protocolo de estimulación mencionado en la sección anterior, mientras se registraban las *e*eIPSCs, primero bajo la perfusión de solución extracelular (30 estímulos eléctricos). Luego se perfundió CGP 35348 ó 36216 100-200 µM indistintamente y se esperaron 2 minutos para aplicar nuevamente el protocolo de estimulación (60 ó 90 estímulos eléctricos). En el caso de que fuera posible, se lavó la droga con solución extracelular (30-90 estímulos eléctricos). Luego se compararon los *e*eIPSCs obtenidos en una situación control, con los valores obtenidos al pico del efecto de CGP.

Previamente a realizar los experimentos de farmacología bajo la estimulación optogenética, se hicieron experimentos control para evaluar si había una disminución en la amplitud de las corrientes evocadas a lo largo del tiempo en los ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ (*rundown*). Para ello se estimuló repetidamente a las neuronas colinérgicas con luz sin la aplicación de ninguna droga (0.03 Hz, 10 pulsos, 478 nm). Se registraron las amplitudes de las *o*eIPSCs a lo largo del tiempo durante un máximo de 30 minutos, luego se normalizaron los datos punto a punto y finalmente se realizó un ajuste de regresión lineal para calcular el decaimiento de la amplitud de la respuesta a lo largo del tiempo (Ver Resultados, sección 4.2.2, Figura 17.B). Para los experimentos en los cuales se bloquearon los $GABA_B$-R mientras se estimulaba optogenéticamente, en primera instancia, se aplicó protocolo de estimulación optogenética recién mencionado (10-20 pulsos) bajo la perfusión de solución extracelular. Luego se aplicó CGP 36216 200 µM y se esperaron 2 minutos para volver a estimular (10-50 pulsos). A partir de la pendiente obtenida de la regresión lineal de los experimentos control, se corrigieron todos los valores de amplitud de las *o*eIPSCs punto a punto de los experimentos en los que se aplicó CGP 36216 200 µM. Luego, se compararon las amplitudes de las *o*eIPSCs previo a la perfusión de CGP con los valores tomados al momento del pico durante la perfusión de la droga. Para los experimentos en los cuales se bloquearon los receptores α9α10, previo a la perfusión de la droga, se estimularon las fibras colinérgicas o gabaérgicas optogenéticamente (10 pulsos) bajo la perfusión de solución extracelular. Luego, dependiendo del caso, se perfundió α-Bungarotoxina 300 nM o 1-1.5 µM y se esperaron 5 minutos para volver a estimular (10 pulsos). Solo en

los casos en los que se bloqueó con α-Bungarotoxina 300 nM se volvió a perfundir solución extracelular para "lavar" el efecto de la droga (10-30 pulsos). Finalmente se compararon las amplitudes de las *o*eIPSCs obtenidas en las tres condiciones: control, α-Bungarotoxina 300 nM y "lavado".

3.6. Análisis de las corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (eIPSCs)

Las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs), ya sea *e*eIPSCs u *o*eIPSCs, fueron analizadas mediante una rutina de IgorPro (WaveMetrics Inc., Portland, Estados Unidos). Se estableció un criterio de amplitud sobre un factor umbral de tres a cinco veces el nivel de ruido (SD, desvío estándar) y de un área debajo de curva de corriente mayor a 0.3-0.8 pC para considerar respuestas exitosas. Cuando los registros no superaban los criterios mencionados eran considerados y cuantificados como fallas sinápticas. La probabilidad de liberación fue calculada como:

$$Pr(eIPSC) = 1 - \frac{\#fallas}{\#total\ de\ estímulos}$$

Se midieron los tiempos de latencia desde que se aplica el estímulo, hasta el inicio de la corriente (calculado como instante en el cual la Amplitud > Factor umbral x SD), así como el tiempo de decaimiento ($t_{decaimiento}$) de la respuesta. Este último es calculado con un ajuste exponencial del 10% al 90% de la respuesta a partir de su pico máximo hasta el retorno a su línea de base, siempre y cuando la respuesta fuera distinguible del artefacto de estimulación (eléctrica) y no presentara superposición con eventos espontáneos. En todos los casos, los experimentos fueron conducidos a temperatura ambiente (22-25º C).

3.7. Adquisición de imágenes de Calcio

Para realizar los registros de imágenes de calcio el interior de las CCIs fue dializado a través de la pipeta de registro cargada con una solución intracelular conteniendo el indicador de Ca^{2+} fluo-4 0.4 mM (Kd = 0.35 µM) y EGTA 0.5 mM. La adquisición de imágenes fue iniciada 5 min luego de la ruptura del sello para garantizar la diálisis apropiada de todo el contenido celular. El registro se prolongó por hasta 40 min. Antes de iniciar los experimentos de adquisición de imágenes de calcio, se aplicó un tren de estimulación eléctrica de 50 Hz para activar la mayor parte de terminales eferentes y determinar el plano focal donde se observaron la mayor cantidad de hotspots de Ca^{2+}. Normalmente, el plano seleccionado fue en la zona basal de las CCIs. Con el fin de obtener una mejoría en la relación señal-ruido y en la frecuencia de adquisición, realizamos una integración en el chip de áreas de 4x4 píxeles de la imagen, obteniendo una resolución final de 0.533 µm por píxel al usar un objetivo de inmersión en agua 60X. Además, el módulo analizador del DIC del microscopio fue removido para evitar el filtrado de la señal fluorescente. El tamaño de la imagen fue fijado en 100x100 píxel permitiendo una tasa de adquisición de 140 imágenes/s, con un tiempo de exposición de 5 ms por imagen. La preparación fue iluminada con un sistema LED azul (Tolket, Argentina) y las imágenes adquiridas utilizando una cámara EM-CCD Andor iXon 885 (Andor Technology

Ltd., Belfast, Reino Unido). El sistema de adquisición fue controlado a través de una interfaz creada por Till Photonics (Munich, Germany), utilizando el software de adquisición Live Acquisition (Till Photonics).

Las imágenes fueron analizadas con rutinas escritas en IgorPro 6.37 (WaveMetrics Inc., Portland, EE. UU.). El análisis consistió en la generación de una imagen promedio de todas las capturas a partir de la cual se diseñó una máscara cubriendo la periferia celular (centro: máxima intensidad de fluorescencia - radio: 0.4 a 0.9 fluorescencia relativa de la célula) (Figura 11.A,B). Luego, la máscara creada fue dividida en "porciones de torta" concéntricas que ocupaban ángulos de 15° para conformar 24 regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés - "Region Of Interest") radiales (Figura 11.C).

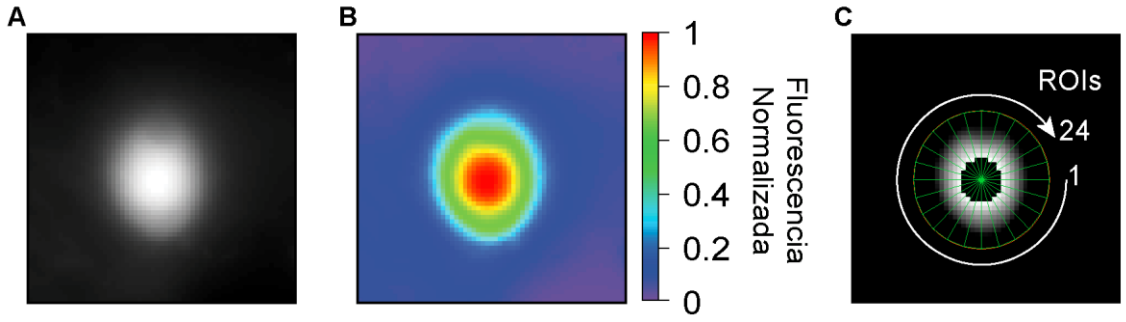

Figura 11| Análisis de la señal de fluorescencia en las imágenes de Ca^{2+}. A. Imagen promedio de todas las imágenes adquiridas. **B.** Máscara obtenida considerando la intensidad de fluorescencia entre el 0.4 y 0.9%. **C.** Superposición de la imagen promedio y la máscara sobre la cual se trazaron los ROIs radiales con centro en el punto de máxima intensidad de fluorescencia. Adaptado de la tesis doctoral de Marcelo Moglie.

Finalmente, se aplicó un filtro gaussiano sobre todas las imágenes y se calculó la variación de la señal de fluorescencia [ΔF] en cada ROI demarcado previamente. Para corregir el fotoblanqueo, una vez calculada la señal de fluorescencia en cada ROI, se ajustó una recta desde la línea de base previa a la aplicación del estímulo hasta los puntos finales adquirido (excluyendo los puntos correspondientes a la señal de Ca^{2+} evocada). Se consideró significativo el incremento en la señal de fluorescencia solo en aquellos ROIs donde la amplitud de la señal alcanzada, luego del pulso eléctrico, fue 3 veces superior a la desviación estándar (S.D.) de la señal de fluorescencia pre-estímulo y el área debajo del pico presentó un valor mayor a 0.3 (u.a.*seg). Aquellos ROIs que exhibieron un patrón consistente de activación fueron seleccionados como *hotspots* y seguidos a lo largo del tiempo. Cuando la señal de fluorescencia no superaba los criterios establecidos, se consideraba a la señal transitoria de Ca^{2+} como una falla sináptica. A partir del número de fallas es posible calcular la probabilidad de registrar un evento de calcio en un *hotspot* de la siguiente manera:

$$Pr(evento\ Ca2+) = 1 - \frac{\#fallas}{\#total\ de\ estímulos}$$

3.8. Soluciones, Drogas y Reactivos

Los reactivos utilizados para las soluciones intracelulares y extracelulares fueron comprados a Sigma-Aldrich (Estados Unidos) al igual que la 4-Aminopiridina (4-AP). El CGP 36216 y 35348 (CGP) fueron obtenidos de Tocris Bioscience (Reino Unido), en tanto que la α-Bungarotoxina (α-Btx) fue obtenida de Alomone Labs (Israel). El indicador de calcio fluo-4, fue adquirido en Invitrogen (Thermofisher, Estados Unidos). Para su preparación fueron diluidas en agua bidestilada, alicuotadas y guardadas a -20ºC hasta el momento de uso, en donde se descongelaron y diluyeron en la solución extracelular para su perfusión.

3.9. Inmunohistoquímica

Algunos de los experimentos de inmunohistoquímica fueron realizados en conjunto con la Dra. María Eugenia Gomez Casati, el Dr. Mariano di Guilmi y la Lic. Valeria Castagna. Para la marcación en el tronco encefálico se utilizaron ratones P9-11 ChAT;TdTomato o GAD;Tdtomato, los cuales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (120mg/kg) y xilazina (25 mg/kg). Luego, los animales fueron perfundidos intracardíacamente con PBS 1X, seguido de paraformaldehído 4% (PFA) en buffer fosfato salino 1X (PBS). Los cerebros fueron disecados y fijados durante toda la noche a 4ºC en PFA 4%. Durante los tres días posteriores se hicieron lavados con cantidades crecientes de sacarosa en PBS (25%, 50% y 75%). Una vez hecho esto, los cerebros fueron congelados con isopropanol a -70ºC para luego hacer cortes transversales a la atura del tronco encefálico con un crióstato (30µM, CM1850, Leica). Las secciones se bloquearon en 10% de suero de burro (NDS, S30-100ML, Millipore) para la marcación de ChAT/TdTomato o 5% NDS + 5% de suero de cabra (NGS, S26-100ML, Millipore) para la marcación de GAD/TdTomato con 1% Triton X-100 en PBS 1X por 2 h a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo primario anti-ChAT para revelar las neuronas colinérgicas; anti-RFP para revelar las neuronas que expresan TdTomato; y/o anti-GAD para revelar las células GABAérgicas. Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios mencionados, diluidos en la solución de bloqueo, por ∼48 h a 4°C. En aquellas secciones en donde se utilizó el anticuerpo anti-GAD se aplicó una segunda solución de bloqueo, previo a la incubación con el anticuerpo primario. Este paso consistió en la incubación del tejido durante aproximadamente 2 h a temperatura ambiente en una solución de Reactivo Bloqueante de Ratón (2-3 gotas en 2.5 ml de PBS 1X; MOM reagent, MKB-2213-1, Vector Laboratories). Las secciones fueron luego lavadas en PBS e incubadas durante 2 h con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente. Finalmente, las rodajas fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories).

Para las marcaciones en el órgano de Corti se extrajeron las cócleas de los mismos ratones utilizados para la marcación en el tronco encefálico, sumado a cócleas de ratones ChAT;ChR2-eYFP y GAD;ChR2-eYFP en el mismo rango de edad. Las cócleas fueron perfundidas intralaberínticamente con PFA 4% en PBS 1X durante toda la noche, y luego decalcificadas en EDTA 0.12 M. El órgano de Corti fue microdisecado y permeabilizado con sacarosa al 30%. Para las cócleas disecadas de los ratones ChAT;TdTomato y GAD;TdTomato el procedimiento fue el mismo que lo indicado anteriormente para el tallo cerebral, con la

diferencia que la incubación con el anticuerpo primario fue durante toda la noche. Por otro lado, las cócleas de los ratones ChAT;ChR2-eYFP y GAD;ChR2-eYFP fueron bloqueadas con NGS 5% y Triton X-100 1% en PBS 1X durante 2 h. Dada la similitud de secuencia entre la proteína fluorescente amarilla (eYFP) con la proteína fluorescente verde (GFP), el anticuerpo anti-eGFP reconoce a la eYFP y sirve para revelar la localización de la ChR2. Se realizó una incubación con el anticuerpo primario anti-eGFP a 4ºC durante toda la noche o durante 16 h. Luego los tejidos fueron lavados en PBS 1X e incubados con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 h a temperatura ambiente. Por último, los tejidos fueron montados en un portaobjetos con medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories). Los anticuerpos utilizados para los experimentos de inmunohistoquímica se encuentran detallados en la siguiente tabla:

Reactivo	Hecho en (especie)	Marca	Código	Concentración de uso
Anti-eGFP (1)	Conejo	Life Tech	A6455	1:2000
Anti-ChAT (1)	Cabra	Millipore	AB144P	1:300
Anti-RFP (1)	Rata	Chromotek	5F8	1:500
Anti-GAD (1)	Ratón	Millipore	MAB351R	1:500
Alexa Fluor 488, anti-Cabra IgG (2)	Burro	Invitrogen	A11055	1:800
Alexa Fluor 555, anti-Rata IgG (2)	Burro	Invitrogen	A48270	1:800
Alexa Fluor 488, anti-Ratón IgG2a (2)	Cabra	Invitrogen	A21131	1:800
Alexa Fluor 488, anti-Conejo	Cabra	Invitrogen	A11034	1:1000

Tabla 1| Lista de anticuerpos primarios (1) o secundarios (2) utilizados para la realización de los experimentos de inmunohistoquímica.

Las imágenes confocales fueron adquiridas con un microscopio Leica TCS SPE equipado con un lente de inmersión en aceite 63X. Las proyecciones por máxima intensidad fueron creadas a partir de *z-stacks*. Para analizar el número de células en tronco encefálico, las imágenes fueron recortadas abarcando solo el VNTB con el fin de excluir el LSO. La cuantificación del número de células se realizó con imágenes monocromo en una escala de grises en ambos canales.

3.10. Análisis estadístico de los datos

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 y D'Agostino-Pearson, a partir de lo cual se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas, según correspondiese. En el caso de que el grupo de datos cumpliera con la normalidad se utilizaron test de t de dos colas, pareadas o no pareadas. En caso contrario, el análisis se hizo a través de pruebas de rangos de Wilcoxon para comparar entre dos

condiciones, test de Friedman para comparar entre 3 o más condiciones, o Kolmogorov-Smirnov para analizar distintas frecuencias poblacionales. En todos los casos, se consideró una diferencia significativa si el $p_{valor}<0.05$. Todos los datos fueron expresados como su valor promedio ± SEM (error estándar). Excepto que se indique lo contrario, el N reportado se refiere al número de CCIs registradas, habiéndose registrado siempre una célula por ratón.

Resultados

4.1. Estimulación optogenética de las fibras MOC

4.1.1. Introducción

La sinapsis MOC-CCI ha sido muy bien caracterizada a lo largo de los años, sin embargo, la manera de evocar la liberación de neurotransmisor ha sido históricamente mediante la estimulación eléctrica de los axones que llegan al haz olivococlear (Gómez-Casati et al., 2005; Goutman et al., 2005; Zorrilla De San Martín et al., 2010). Este tipo de estimulación tiene la desventaja de que activa indiscriminadamente a cualquier tipo de fibra que esté cercana al campo de estimulación. Con el avance de la biotecnología y el descubrimiento de la ChR2, en la actualidad es posible dirigir genéticamente la expresión de esta proteína de manera tal de estimular un único tipo neuronal la vez (ver Materiales y Métodos, sección 3.1).

La canalrodopsina 2 (ChR2) es una proteína sensible a la luz encontrada en el alga *Chlamydomonas reinhardtii sp*. Se trata de un canal catiónico conformado por 7 pasos transmembrana, con una alta permeabilidad al Na^{2+}, Ca^{2+} y H^{+} (Nagel et al., 2003). Su expresión heteróloga en *Xenopus laevis sp.* en primera instancia, y luego en cultivos neuronales de hipocampo demostraron que es posible despolarizar la membrana con un estímulo lumínico (Boyden et al., 2005; Nagel et al., 2003). A pesar de que la proteína tiene una cinética más lenta que los canales dependientes de voltaje y de que además tiene un estado desensibilizado, es posible tener respuestas evocadas con mucha robustez utilizando una baja frecuencia de estimulación (Herman et al., 2014). Para poder demostrar nuestra hipótesis de co-transmisión era de vital importancia utilizar una herramienta que permitiera estimular selectivamente fibras con identidades genéticas o bioquímicas bien definidas.

4.1.2. Validación del patrón de expresión en el modelo de animal transgénico ChAT;TdTomato

El ratón transgénico ChAT*cre* ha sido utilizado por múltiples autores y sus patrones de expresión han sido descriptos a nivel del sistema nervioso central y periférico (Cadenas et al., 2020; Jeong et al., 2015; Rossi et al., 2011; Saunders et al., 2015; Wu et al., 2020; Z. Yu et al., 2020). Sin embargo, la utilización de esta línea transgénica como modelo animal para estimular optogenéticamente las neuronas MOC, requería demostrar su especificidad en la cóclea de un animal en desarrollo (P9-11). Para tal fin, se realizaron experimentos con el animal reportero ChAT;TdTomato, el cual expresa una proteína fluorescente roja en las neuronas colinérgicas. Se realizó una inmunomarcación con un anticuerpo anti-ChAT y con el anticuerpo anti-TdTomato el cual se utilizó para amplificar la señal endógena (Figura 12). Tal como se puede observar en la Figura 12, la marcación del anticuerpo anti-ChAT co-localiza con la proteína reportera TdTomato, indicando que efectivamente se logró la expresión de *Cre* en las neuronas colinérgicas de la cóclea, cuyo patrón coincide con lo descripto anteriormente (Simmons et al., 1998; Whitlon & Sobkowicz, 1989).

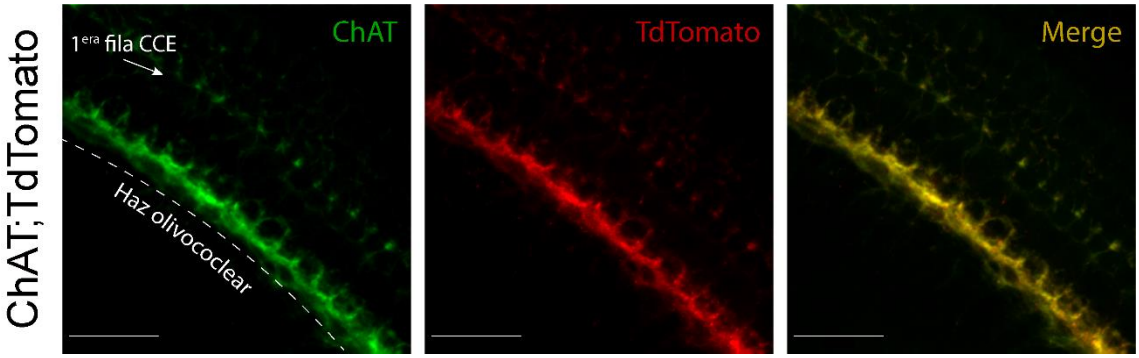

Figura 12| Co-localización del marcador colinérgico con la expresión de TdTomato en la cóclea de ratones ChAT;TdTomato (P9-11). *Panel izquierdo*: Inmunohistoquímica anti-ChAT con una fuerte marcación (verde) en el haz olivococlear que contacta a las CCIs y en los terminales eferentes que contactan las CCEs de la primera fila. *Panel medio*: Inmunohistoquímica anti-TdTomato expresado en las neuronas colinérgicas con una fuerte marcación en el haz olivococlear y así como en la primera fila de CCEs. *Panel derecho*: Co-localización de las marcaciones anti-ChAT y anti-TdTomato. En todos los casos la barra de escala representa 30 µm.

Realizar cuantificaciones a partir de inmunomarcaciones a nivel del haz olivococlear presenta muchos desafíos, ya que se trata de una región en la cual hay una gran densidad de fibras y de terminales que dificultan la obtención de una imagen nítida. Sumado a este hecho, debemos recordar que los terminales MOC no son los únicos que están estableciendo contactos sinápticos en esta zona, sino que además se encuentran los terminales de las neuronas olivoclocleares laterales (LOC) las cuales también tienen carácter colinérgico (Bulankina & Moser, 2012). Al ser imposible diferenciar entre los terminales colinérgicos MOC y LOC en el haz olivococlear interno, decidimos dirigirnos al tronco encefálico en donde se encuentran los somas de las neuronas MOC. Al igual que lo realizado anteriormente, se cruzó la línea de ratones transgénicos ChAT*cre* con la línea reportera TdTomato. Luego se disecó del cerebro, y se realizaron cortes transversales a la altura del tronco cerebral en donde se encuentran los núcleos eferentes laterales (LSO, núcleo olivococlear lateral) y mediales (VNTB, núcleo ventral del cuerpo trapezoidal). Posteriormente, se realizó una inmunomarcación con un anticuerpo anti-ChAT y anti-TdTomato, que, como ya se indicó, este último se utiliza para amplificar la señal endógena. Las neuronas MOC se identificaron en primera instancia por su localización dentro del núcleo ventral de cuerpo trapezoidal o VNTB -localizado ventral al LSO- y en segunda instancia por su morfología multipolar con 2 a 3 dendritas principales en promedio (Figura 13) (Brown & Levine, 2008; Cadenas et al., 2020; Simmons et al., 1998b; Vetter et al., 1991; Vicencio-Jimenez et al., 2021). De manera similar a los resultados hallados en la cóclea, en el tronco encefálico también se observó una fuerte co-localización de los dos marcadores. Vale la pena mencionar que hay un porcentaje de neuronas que son ChAT+ pero no son TdTomato+, lo cual es indicativo de que la tasa de recombinación no es del 100% sino 56.6%, aunque desconocemos el motivo por el cual la recombinación no es total (Figura 13.B). No obstante, es posible afirmar que el modelo animal utilizado es específico para las neuronas colinérgicas, ya que no hay neuronas TdTomato+ que no sean ChAT+.

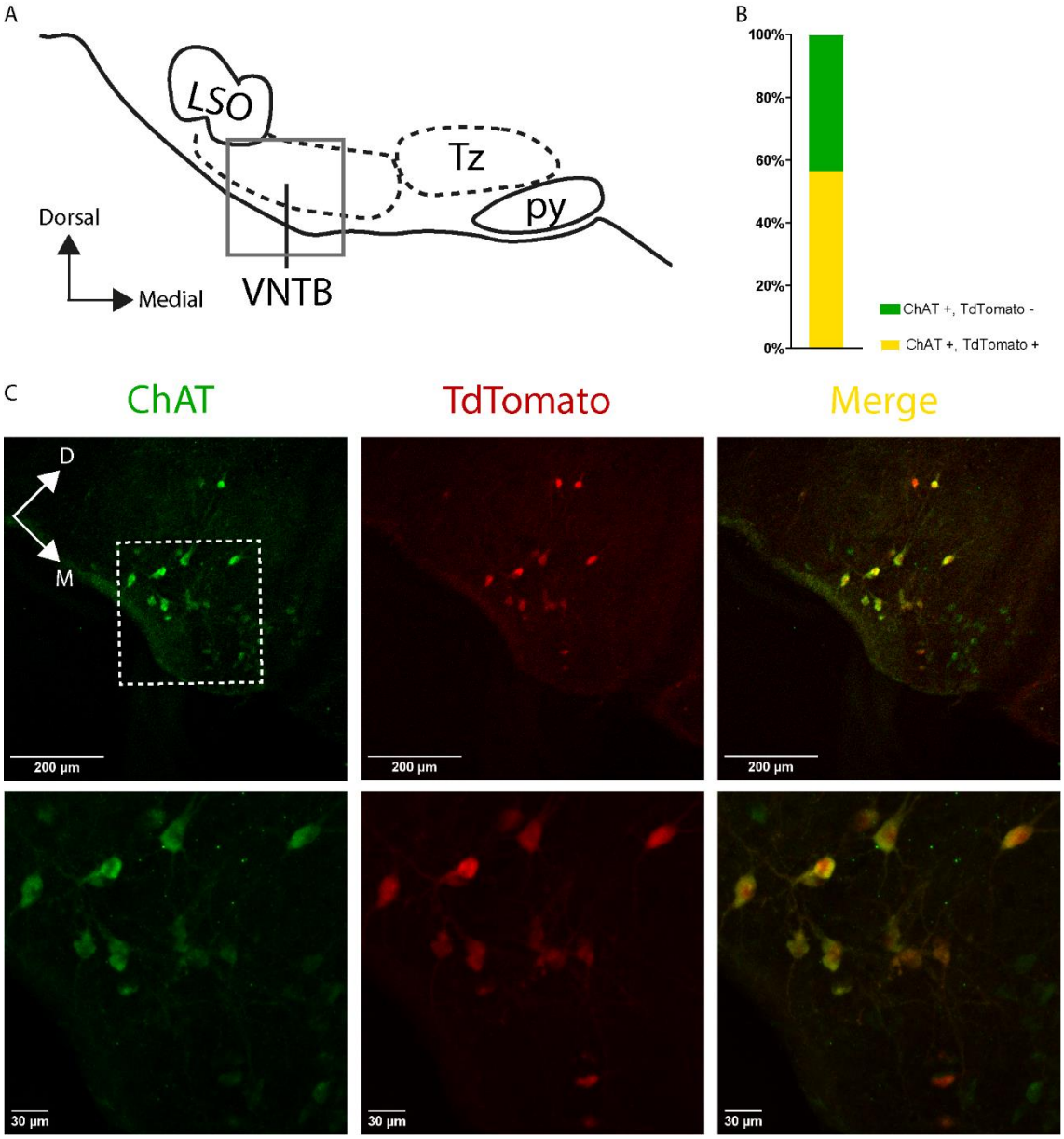

Figura 13| Co-localización del marcador colinérgico con la expresión de TdTomato en el VNTB de ratones ChAT;TdTomato. A. Diagrama ilustrativo de los principales núcleos auditivos en el tronco encefálico de ratón. LSO: Oliva Superior Lateral; VNTB: Núcleo Ventral del Cuerpo Trapezoidal; Tz: Cuerpo Trapezoidal; py: Tracto piramidal. Adaptado de Paxinos, George, and Keith B.J. Franklin. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.* Access Online via Elsevier, 2001. **B.** Cuantificación del porcentaje de células que son ChAT+;TdTomato- (total de células colinérgicas, 100%) y las que son ChAT+;TdTomato+ (células que co-localizan ambos marcadores, 56.6%). **C.** *Arriba de izquierda a derecha.* Inmunomarcación de las neuronas colinérgicas con un anticuerpo anti-ChAT; inmunomarcación de las neuronas que expresan TdTomato con un anticuerpo anti-TdTomato; co-localización de ambos marcadores (merge) en el VNTB. El cuadrado de línea punteada indica la región en la que se hizo "zoom". *Abajo de izquierda a derecha.* Ídem arriba, pero con un mayor aumento de la zona recuadrada. D: Dorsal, M: Medial.

4.1.3. Estimulación optogenética de las fibras colinérgicas

Una vez corroborado el patrón de expresión en los ratones ChAT*cre*, se realizaron las cruzas pertinentes para obtener una expresión de la ChR2 en las neuronas colinérgicas utilizando los ratones $ChAT^{+/cre}$;ChR2-$eYFP^{+/fl}$, es decir ratones hemicigotas tanto para el transgén de la recombinasa (*cre*) como para el transgén de la ChR2. El hecho de que la ChR2 tenga fusionada una proteína fluorescente (eYFP) permite visualizar su expresión al momento de realizar el experimento (Figura 14.A). Acorde a lo esperado, la expresión de ChR2 recapituló el patrón de expresión de las fibras MOC a esta edad del desarrollo: en el haz olivococlear interno y cruzando el túnel de Corti para contactar a las CCEs. Dado que la ChR2 es una opsina sensible a la luz azul, si la misma se expresa solo en las neuronas ChAT*cre*+, al iluminar la preparación aquellas fibras que se despolarizarán serán solo las colinérgicas y se podrán obtener corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas optogenéticamente (*o*eIPSCs). Si bien su expresión estaba localizada correctamente, al realizarse los primeros registros en las CCI en configuración de *whole-cell patch clamp* y en las condiciones de registro empleadas (Vs=-80 mV, EK∼-82 mV), se debería ver una corriente entrante (negativa) producto de la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} principalmente por los nAChRs α9α10. Sin embargo, al prender el LED durante 10 ms no se observó ninguna corriente. Por el contrario, al estimular eléctricamente las mismas fibras, se obtuvieron corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas eléctricamente (*e*eIPSCs), evidenciando una falla en la estimulación optogenética (Figura 14.B,C). Debido a que la activación del LED por si sola fue insuficiente para evocar la liberación de neurotransmisor, se diseñaron una serie de experimentos combinando ambos tipos de estimulación de manera simultánea. En la estimulación eléctrica, el experimentador puede variar la intensidad del estímulo de manera tal de ir reclutando una mayor o una menor cantidad de fibras. Hay un punto en el que, si se disminuye lo suficiente la intensidad del mismo, no se podrá estimular ninguna fibra y por ende no se observará ninguna respuesta electrofisiológica. Sin embargo, si la intensidad del estímulo se aumenta levemente es posible obtener respuestas muy pequeñas, probablemente correspondientes a la estimulación de una sola fibra. A este tipo de estimulación se la conoce como "estimulación mínima". Para esta serie de experimentos, se utilizó en una primera instancia una estimulación eléctrica mínima a 1Hz que evocara una pequeña respuesta. Luego, sobre ella se solapó el estímulo lumínico de una manera continua durante 30 segundos. La Figura 14.D muestra un aumento en la amplitud de la respuesta evocada al solapar ambos tipos de estimulación (9/13 células). Finalmente, se apagó la luz y se dejó solo la estimulación eléctrica mínima nuevamente, observándose que las amplitudes de las corrientes volvían a su estado basal. Estos experimentos, dieron la pauta de que la estimulación optogenética en las condiciones experimentales utilizadas no era suficiente para evocar la liberación del neurotransmisor. Frente a esto, se decidió incrementar la concentración de calcio de la solución extracelular de 1.3 mM a 1.8 mM con el objetivo de aumentar la probabilidad de liberación de neurotransmisor y de este modo mejorar la fuerza de la estimulación optogenética. Este cambio en la concentración de $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ fue suficiente para lograr evocar por primera vez la liberación de ACh de los terminales MOC, únicamente utilizando estimulación optogenética. A pesar de la importancia de este resultado, la tasa de éxito del porcentaje de células que era posible estimular solo con luz era menor al 50%. Además, no era posible con la aplicación de un único pulso, sino que eran necesarios trenes de

estimulación (10 pulsos de 2 ms de duración, 100 Hz) (Figura 14.E,G). Dado que en trabajos previos ya había sido reportado que la homocigosis del transgén de la ChR2 aumenta la excitabilidad de las neuronas y por ende la probabilidad de disparos (Meng et al., 2019; O'Neill et al., 2017), decidimos realizar la retrocruza de la colonia de ratones ChAT*cre*xChR2-eYFP para obtener ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ (ver Materiales y Métodos, sección 3.1). En dichos ratones homocigotas para el transgén de la ChR2, se logró obtener una estimulación robusta bajo 1.8 mM de calcio extracelular, con una tasa de éxito del 70%, aplicando un protocolo de estimulación con un único pulso de luz (2 ms de duración,0.03Hz) (Figura 14.F,G). Por tal motivo, el resto de los experimentos realizados fueron realizados en ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ y $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ igual a 1.8 mM.

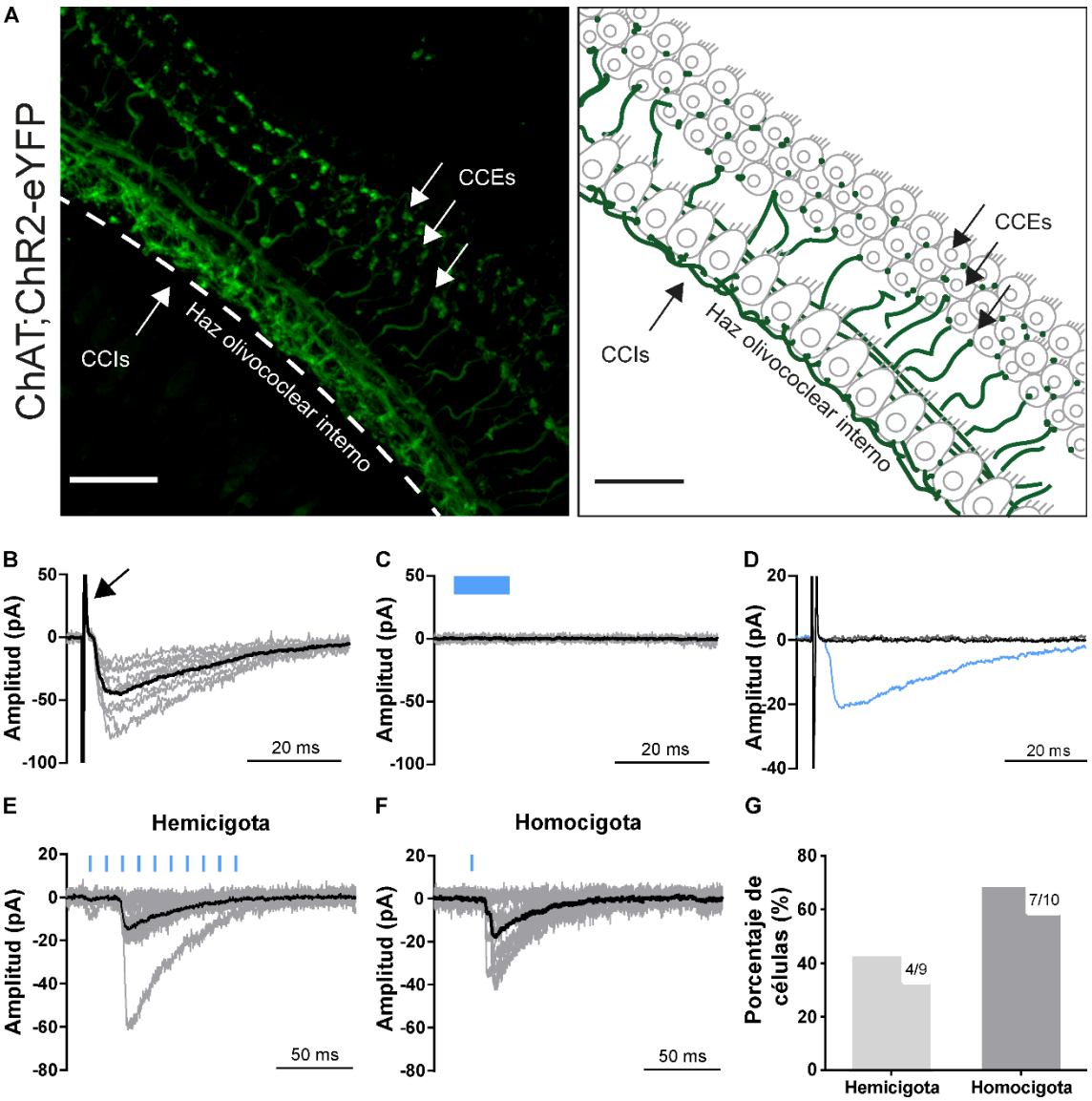

Figura 14|Estimulación optogenética en ratones ChAT;ChR2-eYFP. A. *Izquierda.* Inmunohistoquímica anti-eYFP en los animales ChAT;ChR2-eYFP. Se pueden observar las fibras colinérgicas que componen el haz olivococlear interno dentro del cual están los terminales MOC que contactan a la CCIs, así como las fibras MOC que cruzan el túnel de Corti para contactar las CCEs. *Derecha.* Esquema ilustrativo de la localización de las CCIs y de las CCEs. Barra de escala igual a

30µm. **B.** Trazos representativos de *e*eIPSCs (trazos grises) y su trazo promedio (trazo negro). La flecha indica el artefacto de la estimulación eléctrica. **C.** Trazos representativos de *o*eIPSCs (trazos grises) y trazo promedio (trazo negro) demostrando la ausencia de corriente frente a un pulso de luz (barra celeste, 10 ms). **D.** Trazos representativos promedio de los eIPSCs estimulando solo eléctricamente (antes de la iluminación: trazo gris oscuro, luego de la iluminación: trazo negro) y con una estimulación eléctrica montada a la iluminación del LED (trazo azul claro). **E.** Trazos representativos de los *o*eIPSCs (trazos grises) y su trazo promedio (trazo negro) en un ratón hemicigota para el transgén de la ChR2 ($ChAT^{+/cre}$;ChR2-$eYFP^{+/fl}$). Los rectángulos celestes indican el momento en el que se aplicó el tren de estimulación optogenética (10 pulsos, 2 ms de duración, 100 Hz). **F.** Trazos representativos de los *o*eIPSCs (trazos grises) y su trazo promedio (trazo negro) en un ratón homocigota para el transgén de la ChR2 (ChAT;ChR2-$eYFP^{fl/fl}$). El rectángulo celeste indica el momento en el que se aplicó el pulso de estimulación optogenética (2 ms, 0.03 Hz). **G.** Porcentaje de células que responden a la estimulación optogenética en un ratón hemicigota para la ChR2 ($ChAT^{+/cre}$;ChR2-$eYFP^{+/fl}$) u homocigota (ChAT;ChR2-$eYFP^{fl/fl}$). En cada barra se indica el número de células que respondieron/total de células.

4.1.4. Caracterización de las corrientes evocadas por estimulación eferente

Considerando que gran parte de los experimentos de esta tesis se realizaron utilizando estimulación optogenética de las fibras eferentes, nos pareció de particular importancia caracterizar las corrientes obtenidas por este tipo de estimulación y compararlas con las corrientes evocadas por estimulación eléctrica que han sido exhaustivamente estudiadas en nuestro laboratorio (Ballestero et al., 2011; Goutman et al., 2005; Zorrilla De San Martín et al., 2010). Para esta serie de experimentos se utilizaron las preparaciones de cóclea de ratones ChAT;ChR2-$eYFP^{fl/fl}$ (P9-11) y se registraron las CCI en la configuración *whole-cell patch clamp* (Vs=-80 mV, EK∼-82 mV). En una primera instancia, se evocaron corrientes por estimulación eléctrica (50 estímulos, 100-500µA, 0.2-2ms, 1Hz). Seguidamente, en la misma célula registrada, se evocaron corrientes por estimulación con luz (LED 478 nm, 10 estímulos, 2ms, 0.03Hz). Las corrientes evocadas obtenidas por los diferentes métodos de estimulación eferente fueron analizadas y comparadas (Figura 15). En primer lugar, se comparó la probabilidad de liberación, calculada como la inversa del número de fallas sinápticas sobre el total estímulos (10 pulsos de luz o 50 estímulos eléctricos). La misma es significativamente mayor al estimular optogenéticamente (0.98 ± 0.02) que al estimular eléctricamente (0.8 ± 0.05) (Figura 15.A, p_{valor} = 0.002, pruebas de rangos de Wilcoxon, N=13). Por otro lado, la amplitud de las corrientes evocadas, considerando las fallas, fue medida como la diferencia entre el pico de la respuesta y la línea de base anterior al artefacto de la estimulación (eléctrica) o al prendido del LED. Tal como se puede observar en la Figura 15.B, la amplitud de las *o*eIPSCs (139.80 ± 25.41 pA) es mayor a las *e*eIPSCs (40.20 ± 8.68 pA) (p_{valor} = 0.0002, prueba de rangos de Wilcoxon, N=13). Además, se estimó el tiempo de decaimiento a partir del ajuste exponencial de las respuestas realizado entre el 10-90% entre el pico y el retorno a la línea de base. Como se muestra en la Figura 15.C, no hubo diferencias significativas en el parámetro del $t_{decaimiento}$ entre los distintos tipos de estimulación ($t_{decaimiento\ eléctrica}$ 33.13 ± 2.65 ms, $t_{decaimiento\ optogenética}$ (39.57 ± 3.29 ms), α=0.05, test de t pareado). Esto es indicativo de que no hay cambios en la dinámica temporal de las corrientes postsinápticas mediadas por la activación del receptor

α9α10 y la posterior apertura del canal de potasio SK2. Finalmente, se midió la latencia de la respuesta como el tiempo que transcurre entre que se aplica el estímulo (ya sea lumínico o eléctrico) y el inicio del incremento de la corriente. Se halló una latencia significativamente mayor al estimular optogenéticamente (6.94 ± 0.45 ms) que al estimular eléctricamente (4.26 ± 0.28 ms) (p_{valor}=0.0024, prueba de rangos de Wilcoxon, N=13). Los resultados hallados al medir los parámetros de la probabilidad de liberación, la amplitud de la respuesta y la latencia, permiten concluir que el mecanismo subyacente mediante el cual se evoca la liberación de neurotransmisor es diferente dependiendo de si se estimula eléctricamente u optogenéticamente. Mientras que la estimulación eléctrica genera un potencial de acción, es probable que la estimulación optogenética genere sea más bien una despolarización del terminal a causa de la entrada de cationes por la ChR2. Sin embargo, independientemente de cómo se evoque la liberación de neurotransmisor, tal como veremos en la próxima sección, lo importante es que la estimulación optogenética sea un método confiable para evocar la liberación de ACh de los terminales MOC.

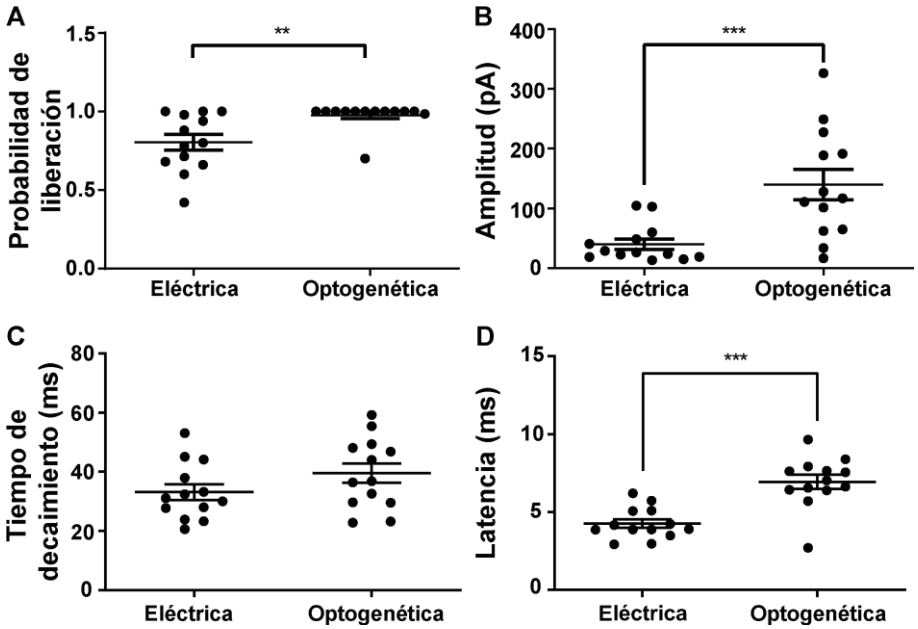

Figura 15| Estimulación optogenética *vs* estimulación eléctrica. A. Promedio de la probabilidad de liberación ± SEM en la estimulación eléctrica u optogenética. **B.** Promedio de la amplitud ± SEM de la respuesta en la estimulación eléctrica u optogenética. **C.** Promedio del tiempo de decaimiento de la respuesta en la estimulación eléctrica u optogenética. **D.** Promedio de la latencia ± SEM al estimular eléctricamente u optogenéticamente. En todos los casos el asterisco representa la magnitud de la significancia: **<0.005, ***<0.001, N=13. En todos los casos los puntos se corresponden con los valores de células individuales.

4.1.5. Liberación de ACh y activación del receptor α9α10 a partir de la estimulación optogenética de los terminales MOC

La α-Bungarotoxina (α-Btx) ha sido descripta como un potente bloqueante de los receptores nAChRs α9α10 (Elgoyhen et al., 1994). A concentraciones nanomolares es capaz de bloquear de manera reversible

las corrientes evocadas por estimulación eléctrica de las fibras MOC (Elgoyhen et al., 2001; Goutman et al., 2005). Para reconfirmar que las respuestas evocadas por luz son también mediadas por el receptor α9α10, se evocaron corrientes por estimulación optogenética (pulso 2ms, 0.03 Hz, Vs=-80 mV, EK∼-82 mV) y se agregó 300nM de α-Bungarotoxina en el baño de perfusión. A esa concentración la toxina provocó una disminución del 60.71 ± 4.44% de la amplitud de las *o*eIPSCs (Figura 16.A,C, p_{valor} = 0.0394, Friedman test, N=5). Dado que el bloqueo generado por esta toxina es dosis dependiente, en una segunda serie de experimentos se aumentó la concentración de la droga a 1 µM y se observó un bloqueo total de la respuesta entre los 5 a 10 minutos luego de la adición de la toxina al baño (Figura 16.B). Tal como se describió en la introducción, la activación de los receptores α9α10 provoca la entrada de cationes (principalmente Ca^{2+} y Na^{+}) a la célula ciliada, y la consiguiente activación de los canales de potasio dependientes de calcio (SK2). De manera análoga a lo descripto en la bibliografía, utilizando potenciales de sostén más despolarizados (-40mV), lejanos del potencial de reversión del potasio (EK∼-82 mV), este acople de ambos receptores generó una respuesta bifásica consecuencia de un Vs intermedio entre los potenciales de reversión de los iones involucrados (Figura 16.D). Por un lado, se observa una pequeña corriente entrante correspondiente al calcio y al sodio, y, por el otro una amplia corriente saliente correspondiente al potasio. De este modo, estos resultados presentan una evidencia adicional que demuestra que la estimulación optogenética en los ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ evoca un evento sináptico que involucra el nAChR α9α10 y al canal SK2 de manera similar a lo descripto previamente mediante la estimulación eléctrica o la aplicación exógena de ACh (Glowatzki & Fuchs, 2000; Goutman et al., 2005).

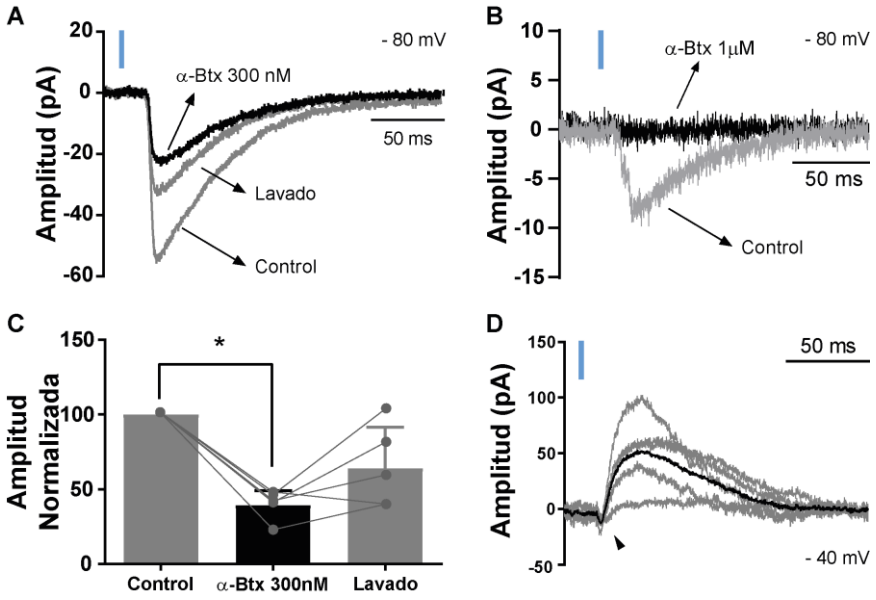

Figura 16| Activación por ACh de los receptores α9α10 mediante estimulación optogenética. A. Trazos representativos promedio del bloqueo parcial de las *o*eIPSCs con α-Btx 300nM (trazo negro). Los trazos grises corresponden al trazo promedio previo a aplicar la droga (control) y posteriormente (lavado). **B.** Trazos representativos promedio del bloqueo total con α-Btx 1µM (trazo negro). El trazo gris corresponde al trazo promedio previo a aplicar la droga (control). **C.** Amplitud normalizada de la corriente en una situación control (100%), al aplicar α-Btx 300 nM (39.29 ± 4.44) y luego

su recuperación al momento del lavado (64.01 ± 12.32). El asterisco indica la magnitud de la significancia: *<0.05. D. Trazos representativos mostrando la reversión de la corriente de K^+ a -40mV. Se puede observar una pequeña corriente entrante de calcio y sodio (cabeza de flecha) que activa los canales SK2 permitiendo la subsecuente salida de K^+ fuera de la CCI.

4.1.6. Conclusiones parciales de la estimulación optogenética en los ratones ChAT;ChR2-eYFP

La activación de las fibras colinérgicas MOC mediante optogenética descripta en este capítulo brinda una nueva opción de estimulación de las neuronas eferentes. A diferencia de la estimulación eléctrica utilizada canónicamente, este tipo de estimulación tiene una mejora sustancial en cuanto a la especificidad de estimulación de un único tipo neuronal. Gracias a esto, esta herramienta biotecnológica podría ser funcional para la realización de más experimentos que permitan dilucidar mejor los circuitos neuronales dentro del órgano de Corti. Por otro lado, de nuestros experimentos se desprende que probablemente el mecanismo de liberación de neurotransmisor difiere del evocado con estimulación eléctrica. Este punto, que para los fines de esta tesis no tiene mayor importancia, puede ser un factor limitante para otros experimentadores. Dicho eso, la estimulación por luz en los ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ logró generar una respuesta postsináptica con la misma cinética que las corrientes típicamente descriptas en la bibliografía, tanto a -80mV como a -40mV (Ballestero et al., 2011; Gómez-Casati et al., 2005; Goutman et al., 2005; Zorrilla De San Martín et al., 2010). No solo eso, sino que de igual manera las *o*eIPSCs son también parcialmente bloqueadas por α-Btx 300nM y totalmente bloqueadas por α-Btx 1µM, indicando que este tipo de estimulación también activa los receptores postsinápticos α9α10 (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Goutman et al., 2005; Verbitsky et al., 2000). De este modo, demostramos que este modelo animal puede ser utilizado para evocar específicamente la liberación de ACh de las fibras MOC que inervan a las CCIs transitoriamente antes del comienzo de la audición, activando los receptores postsinápticos α9α10 y subsecuentemente los canales SK2 acoplados.

4.2. Co-transmisión de GABA y ACh de los terminales MOC

4.2.1. Introducción

Durante la década del 80 el principal candidato como neurotransmisor para la mediación de la sinapsis eferente olivococlear era el GABA, hecho basado mayormente en los reportes de una profusa marcación de este neurotransmisor en la cóclea de diversas especies (Eybalin et al., 1988; Helfert et al., 1989; Maison et al., 2003; Vetter et al., 1991; Whitlon & Sobkowicz, 1989b). Ante el descubrimiento de la ACh como principal neurotransmisor eferente en la cóclea y del receptor α9α10 y su acople con el canal SK2 (Elgoyhen et al., 1994b, 2001; Housley & Ashmore, 1991; Oliver et al., 2000), la búsqueda de la implicancia de GABA en este sistema quedó relegada. No fue hasta la publicación de un trabajo científico por parte de Wedemeyer y colaboradores, que por primera vez se le pudo adjudicar un rol fisiológico a GABA (Wedemeyer et al., 2013). Experimentos realizados con agonistas (Baclofen) y antagonistas (CGP) de los receptores metabotópicos $GABA_B$ demostraron que GABA actúa presinápticamente sobre este tipo de

receptor disminuyendo la probabilidad de liberación de ACh de los terminales MOC a través del bloqueo de los canales de calcio de tipo P/Q (Wedemeyer et al., 2013). En este contexto, la multiplicidad de evidencias que se han reportado sobre la presencia de GABA en el órgano de Corti, en conjunto con la existencia de una población de neuronas con identidad GABAérgica en el VNTB, y la función modulatoria del GABA en la presinapsis de los terminales MOC durante el desarrollo nos llevó a hipotetizar que la identidad de la inervación GABAérgica podía provenir de las mismas neuronas MOC. En este escenario, las neuronas MOC tendrían la capacidad para liberar no solo ACh, sino también de co-transmitir GABA.

4.2.2. Liberación de GABA de los terminales colinérgicos

En un supuesto escenario de co-transmisión, la estimulación de las fibras colinérgicas no solo liberaría ACh, sino que además estaría liberando GABA (Figura 17.A). Dado que no hay receptores para GABA en las CCIs (Wedemeyer et al., 2013), es imposible medir una corriente GABAérgica postsináptica. Sin embargo, en el escenario de que esté siendo liberado, GABA actuaría sobre la propia presinapsis, activando los receptores $GABA_B$ e inhibiendo la liberación de ACh. En tal caso, su efecto podría ser potencialmente bloqueado al aplicar el antagonista de los receptores $GABA_B$ (CGP). Bajo la premisa de una posible co-transmisión de ACh y GABA, y haciendo uso de la capacidad de estimular únicamente las fibras colinérgicas gracias a la optogenética, se realizaron experimentos en los ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ perfundiendo un antagonista del receptor de $GABA_B$ (CGP 36216 200 µM) en la solución extracelular.

Los siguientes experimentos apuntan a demostrar que al estimular optogenéticamente solo las fibras colinérgicas, también hay liberación de GABA. En primer lugar, tal como fue descripto previamente en otros sistemas (O'Neill et al., 2017), al activar repetidamente la ChR2 se produjo una inactivación de la corriente activada por luz que se evidenció como una disminución progresiva de la fuerza sináptica eferente (Figura 17.B). Para determinar el nivel de caída de la respuesta en función del tiempo, se realizaron experimentos control en los que se registraron las CCIs mientras se estimulaban optogenéticamente las fibras colinérgicas (sin la perfusión de droga) durante un máximo de 30 minutos (pulso 2ms, 0.03 Hz, Vs=-80 mV, EK∼-82 mV). Se promediaron los valores obtenidos de todas las células punto a punto, y luego se ajustaron los valores a una recta de la cual se obtuvo un valor de pendiente (m=-0.01406 pA/s). A partir de ese dato de pendiente se corrigieron los valores de amplitud registrados en las células a las que se les perfundió CGP 200 µM, de modo que, por ejemplo, a los 10 minutos se corrigieron las respuestas obtenidas con un factor del 30% más. Acorde a lo esperado, la aplicación de CGP 200 µM generó un aumento significativo en la amplitud de las *o*eIPSCs, de 19.70 ± 4.52 pA en una situación control (previo a la aplicación de la droga) a 26.98 ± 4.71 pA luego del agregado de CGP 200 µM (Figura 17.C).

Estos experimentos indican que la estimulación optogenética de las fibras colinérgicas MOC, no solo generó que se libere ACh sino también GABA, ya que el efecto de este último sobre la probabilidad de liberación de ACh pudo revertirse con la aplicación del bloqueante de los $GABA_B$-Rs (CGP 36216 200 µM). En segundo lugar, al realizar los experimentos de farmacología fue evidente la presencia de una gran

variabilidad en el efecto de CGP 200 µM entre las células registradas, habiendo algunas en las que la amplitud de las *o*eIPSCs aumentaba hasta en un 300% y otras que no tenían ningún cambio o incluso donde el efecto era negativo (Figura 17.D). Considerando que una CCI es contactada por múltiples terminales MOC, es posible que dicha variabilidad tenga que ver con el número de terminales colinérgicos dentro de una CCI que sean modulables por CGP. En la sección 4.4 se abordará la cuestión sobre la variabilidad aquí descripta mediante técnicas de imágenes de calcio, que nos permiten visualizar la modulación GABAérgica en sinapsis únicas.

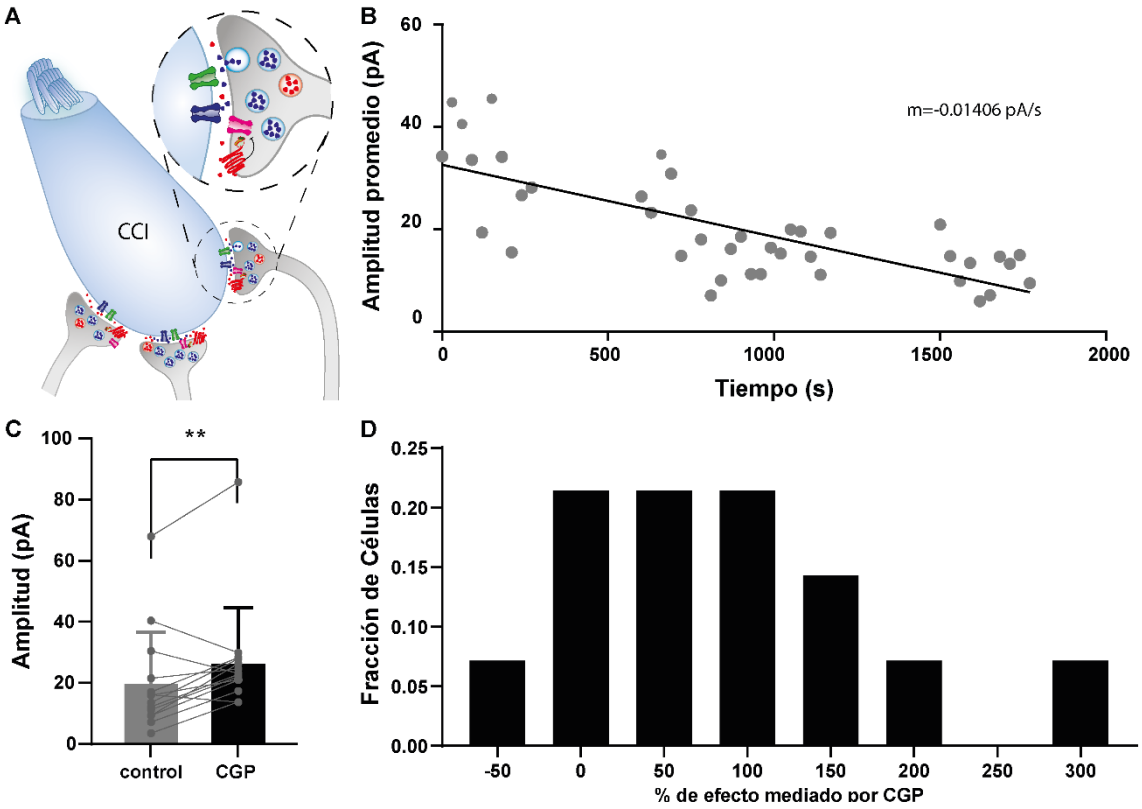

Figura 17| Efecto del antagonista de $GABA_B$-R en la sinapsis MOC-CCI al estimular optogenéticamente las fibras colinérgicas. A. Diagrama ilustrativo de los terminales MOC liberando ACh (vesículas azules) presuntamente con GABA (vesículas rojas). Al estimular las neuronas colinérgicas con optogenética se liberaría ACh en conjunto con GABA de los terminales MOC. Mientras que ACh activa los receptores postsinápticos α9α10 (en color azul) generando las *o*eIPSCs que se registran en las CCIs, GABA actuaría presinápticamente en los receptores $GABA_B$ (en color rojo) inhibiendo la probabilidad de liberación de ACh por medio del bloqueo de los canales CCDV tipo P/Q (en color rosa). Al aplicar un antagonista de los receptores $GABA_B$, bloquearíamos el efecto inhibitorio del GABA y veríamos un aumento en la respuesta colinérgica. **B.** Disminución de la amplitud de las *o*eIPSCs durante la estimulación optogenética a lo largo del tiempo como producto del *rundown* de la ChR2. **C.** Amplitud promedio de las *o*eIPSCs en una condición control (19.70 ± 4.52) o luego de la aplicación de CGP 36216 200 µM (26.98 ± 4.71) (test de t pareado, p_{valor} = 0.0079, N=14). **D.** Histograma de la frecuencia de células en función del porcentaje de efecto que generó el CGP 36216 200 µM (N=14).

4.2.3. Validación del patrón de expresión en el modelo de animal transgénico GAD;ChR2-eYFP

Si es cierto que los terminales MOC que contactan las CCIs co-transmiten GABA y ACh, la estimulación optogenética de las fibras que expresan ChR2 bajo el promotor de GAD (es decir GABAérgicas) debería generar respuestas colinérgicas. Para lograr este objetivo se cruzó la línea transgénica GAD*cre* con la línea ChR2-eYFP de manera de lograr una expresión específica de esta canalrodopsina en las fibras GABAérgicas. La línea transgénica GAD*cre* ha sido utilizado ampliamente en la corteza cerebral desde su generación (Cabral et al., 2017; Herz et al., 2021; Taniguchi et al., 2011; Trotta et al., 2020), pero nunca en la cóclea de mamíferos. Por este motivo, y dada la importancia de la interpretación de estos resultados, se corroboró la especificidad de la expresión de la ChR2 en las fibras que luego iban a ser estimuladas optogenéticamente. Los resultados obtenidos a partir de la marcación con anticuerpos anti-ChR2 y anti-GAD, arrojaron que hay una gran co-localización de ambos marcadores y un patrón de expresión acorde a lo reportado para esta edad en el desarrollo (Figura 18) (Whitlon and Sobkowicz, 1989). Vale la pena recordar que no es posible obtener una cuantificación confiable del porcentaje de co-localización en las marcaciones realizadas en el haz olivococlear interno.

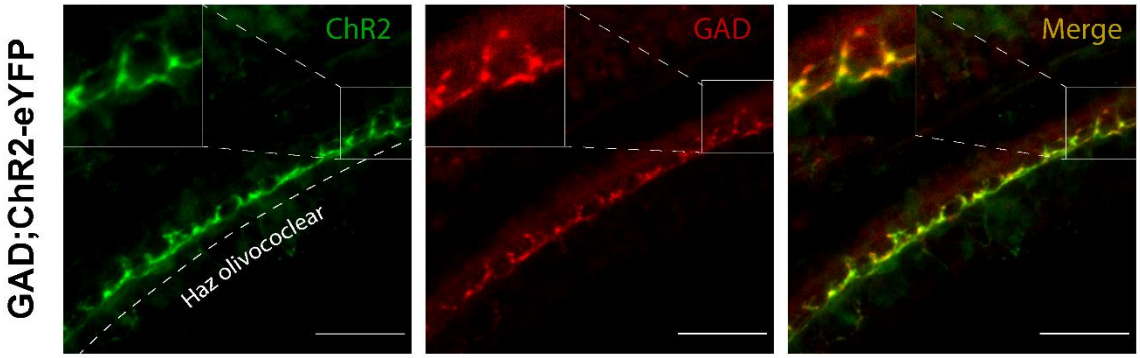

Figura 18| Co-localización del marcador GABAérgico con la expresión de ChR2 en los ratones GAD;ChR2-eYFP. *Panel izquierdo*: Inmunohistoquímica anti-eYFP con marcación (verde) en el haz olivococlear que contacta a las CCIs. *Panel medio*: Inmunohistoquímica anti-GAD expresado en los terminales de las neuronas GABAérgicas con marcación en el haz olivococlear. *Panel derecho*: Co-localización de las marcaciones anti-ChR2 y anti-GAD (Merge). En todos los casos la barra de escala representa 30 µm.

Por los motivos antes mencionados de la dificultad que representa realizar marcaciones en el haz olivococlear interno, se diseñaron experimentos para hacer inmunomarcaciones en el tronco encefálico y poder visualizar los somas de las neuronas GABAérgicas y determinar el grado de co-localización con marcadores colinérgicos. A pesar de los esfuerzos realizados, no se logró poner a punto el protocolo del anticuerpo anti-GAD en el tronco encefálico. Como alternativa para estimar el nivel de co-localización, se realizaron cruzas de ratones GAD*cre* con ratones de la línea reportera TdTomato y se realizaron cortes transversales a la altura del tronco encefálico en donde están los núcleos olivococleares eferentes (LSO y VNTB) y se realizó una inmunomarcación anti-TdTomato para reforzar la marca endógena de la proteína reportera (Figura 19). Se observó la presencia de neuronas TdTomato+ en el VNTB (en donde se encuentran

los somas de las MOC) cuya morfología es compatible con lo reportado: algunas pequeñas y redondeadas (12-14 µm de diámetro) y otras más grandes y fusiformes (20 µm de diámetro) (Helfert et al., 1989; Vetter et al., 1991). Se observó también células TdTomato+ en el LSO, lo cual también es coincidente con los reportes de una población de neuronas GABAérgicas en este núcleo auditivo (Helfert et al., 1989; Vetter et al., 1991). Aunque no es posible contar con un porcentaje de recombinación en el VNTB, se pudo observar que hay una gran variabilidad en el número de células TdTomato+ entre animales, con un mínimo de 7 células, un máximo de 17 células marcadas y un promedio 11.9 ± 1.5 (Figura 19.B). Es posible que parte de esta variabilidad se deba al proceso de inducción propio de esta línea transgénica que depende de la inyección intraestomacal de Tamoxifeno.

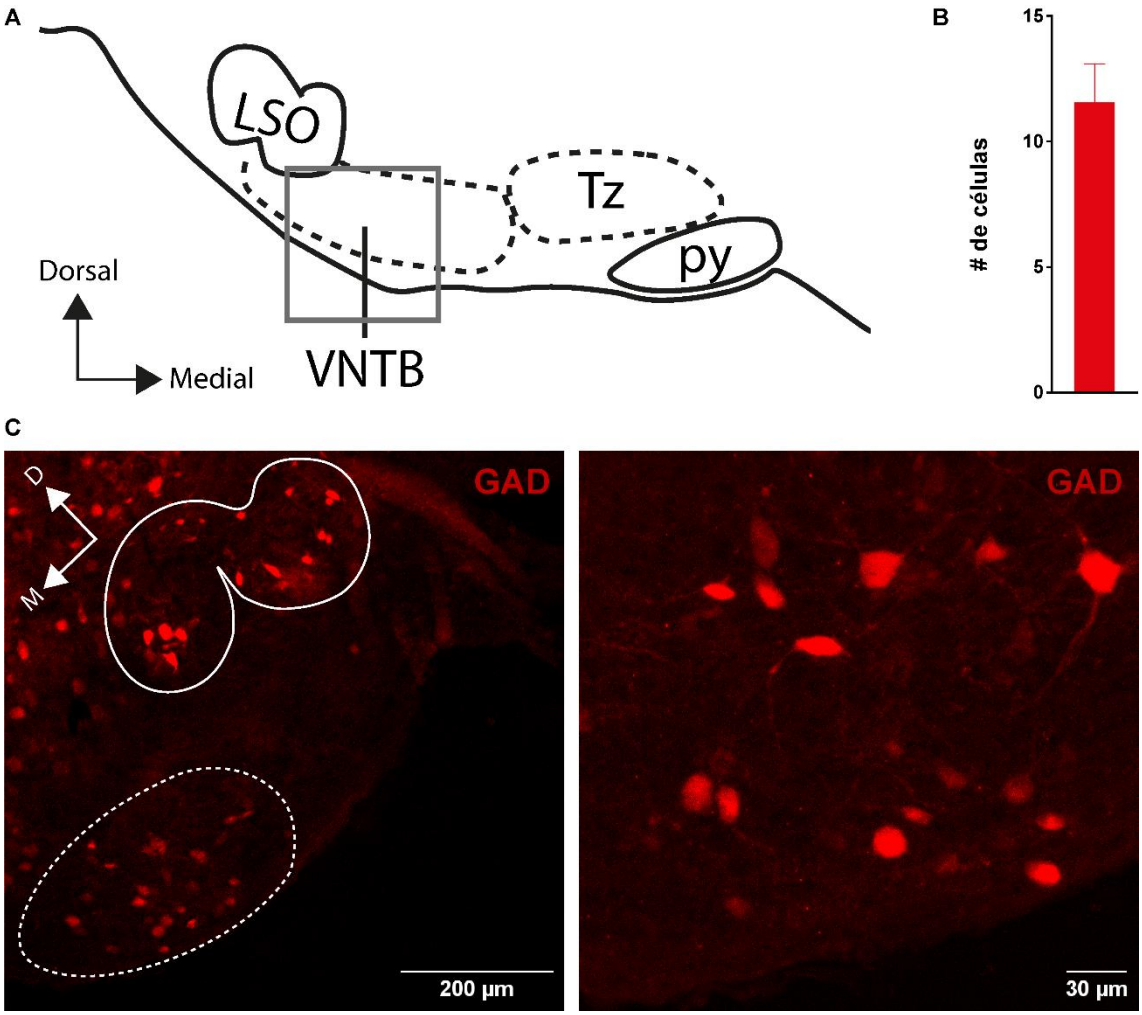

Figura 19| Expresión de TdTomato en el VNTB de ratones GAD;TdTomato. A. Diagrama ilustrativo de los principales núcleos auditivos en el tallo de ratón. LSO: Oliva Superior Lateral; VNTB: Núcleo Ventral del Cuerpo Trapezoidal; Tz: Cuerpo Trapezoidal; py: Tracto piramidal. Adaptado de Paxinos, George, and Keith B.J. Franklin. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.* Access Online via Elsevier, 2001. **B.** Cuantificación del número de células que expresan TdTomato en el VNTB ± SEM (11.9 ± 1.5, N=6). **C.** *Izquierda.* Inmunomarcación de las neuronas GAD dependientes con un anticuerpo anti-TdTomato. La región delimitada con una línea continua marca la posición del LSO,

mientras que la región delimitada con línea punteada marca el VNTB. *Derecha.* Mayor aumento mostrando la morfología de las neuronas TdTomato+. D: Dorsal, M: Medial.

4.2.4. Estimulación optogenética de las fibras GABAérgicas

Una vez que se corroboró que la expresión de la ChR2 era específica para las neuronas GABAérgicas, se prosiguió con la realización de experimentos de estimulación optogenética en la cóclea. Como mencionamos anteriormente, si la hipótesis de co-transmisión fuera correcta, las fibras GABAérgicas no solo liberarían GABA sino que también ACh. Por tal motivo, se realizaron cruzas para obtener ratones GAD;ChR2-eYFP (P9-11) y se diseñaron experimentos para estimular optogenéticamente las fibras GABAérgicas. Al igual que con los ratones ChAT;ChR2-eYFP, con los ratones GAD;ChR2-eYFP se contó con la posibilidad de corroborar que el patrón de expresión sea coincidente para lo reportado a esta edad del desarrollo una vez concluido el experimento (Whitlon & Sobkowicz, 1989). La localización de la expresión de la ChR2 siempre estuvo restringida al haz olivococlear interno, y en algunas ocasiones en los terminales que contactan las CCEs, tal como se puede observar en la Figura 20.A. Sin embargo, de una forma casi idéntica a lo reportado para la estimulación de las fibras MOC en el apartado anterior, al realizarse los registros de *whole cell patch clamp* en las CCIs de ratones GAD;ChR2-eYPF no se observó ningún tipo de corriente sináptica entrante al prender el LED (10 ms, Vs=-80 mV, EK∼-82 mV) (Figura 20.B). Una vez más, al estimular eléctricamente las mismas fibras, se obtuvieron corrientes inhibitorias postsinápticas (*e*eIPSCs), evidenciando una falla en la estimulación optogenética (Figura 20.C). Este resultado bien podría deberse a que las fibras GABAérgicas solo están liberando GABA, sin embargo, al solapar la estimulación optogenética sobre una estimulación eléctrica mínima se generó un gran aumento en las amplitudes de las corrientes evocadas en 10/24 células registradas (Figura 20.D). Dado que las únicas neuronas que expresan ChR2 son las neuronas GABAérgicas, este incremento en la amplitud de las corrientes postsinápticas sea el primer indicio de co-transmisión de ACh y GABA de la sinapsis MOC-CCI.

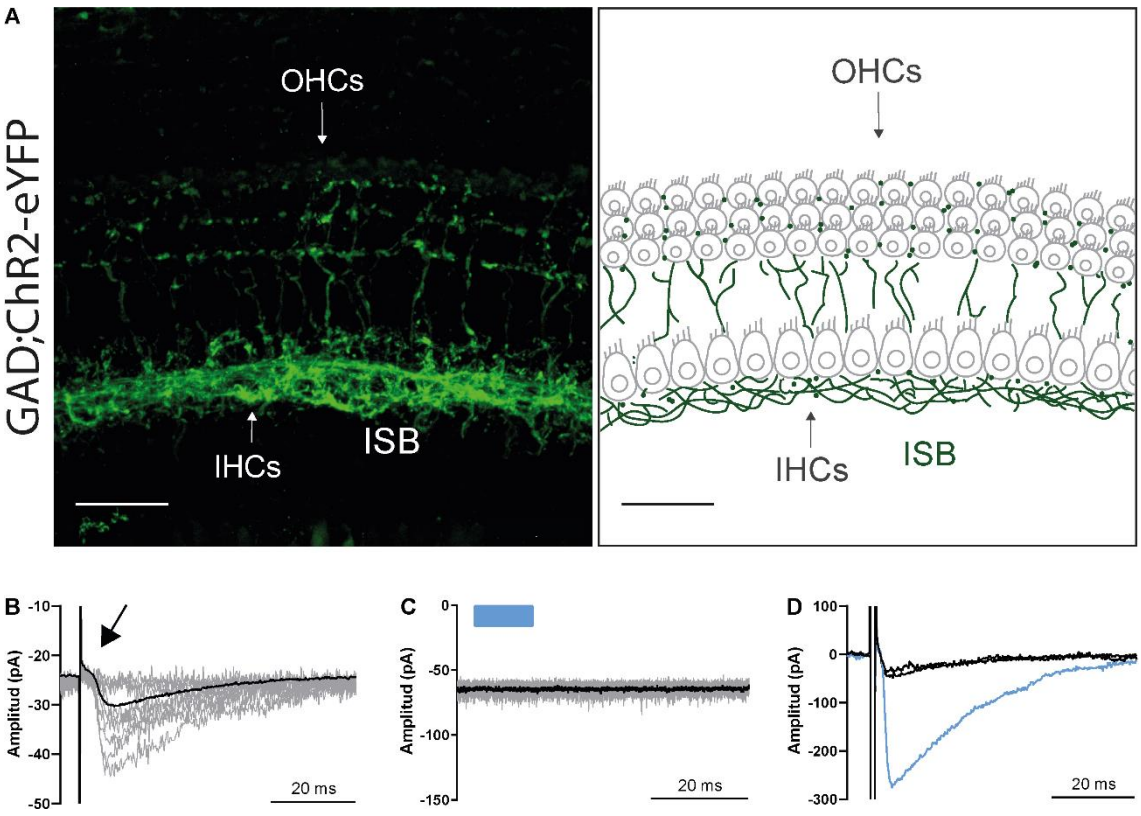

Figura 20| Estimulación optogenética en los ratones GAD;ChR2-eYFP. A. *Izquierda.* Inmunohistoquímica anti-eYFP en los animales GAD;ChR2-eYFP. Se pueden observar una profusa expresión de ChR2 localizada en el haz olivococlear interno, así como en las fibras que cruzan el túnel de Corti para contactar las CCEs. *Derecha.* Esquema ilustrativo de la localización de las CCIs y de las CCEs. Barra de escala igual a 30µm. **B.** Trazos representativos de *e*eIPSCs (trazos grises) y su trazo promedio (trazo negro). La flecha indica el artefacto de la estimulación eléctrica. **C.** Trazos representativos de *o*eIPSCs (trazos grises) y trazo promedio (trazo negro) demostrando la ausencia de corriente frente a un pulso de luz (barra azul claro, 10 ms). **D.** Trazos representativos promedio de las eIPSCs estimulando solo eléctricamente (antes de la iluminación: trazo gris oscuro, luego de la iluminación: trazo negro) y con una estimulación eléctrica montada a la iluminación del LED (trazo azul claro).

4.2.5. Liberación de ACh de las fibras GABAérgicas

El incremento en la amplitud de la respuesta postsináptica al estimular las fibras GABAérgicas solapando el estímulo eléctrico con el estímulo lumínico, nos llevó a razonar que quizás la despolarización generada por la activación de ChR2 era insuficiente para evocar la liberación de los neurotransmisores al igual que lo sucedido con los ratones ChAT;ChR2-eYFP. Al igual que en la Figura 14, se incrementó la probabilidad de liberación farmacológicamente aumentando la concentración de calcio de 1.3 mM a 1.8 mM. Sin embargo, este aumento de $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ no fue suficiente para lograr evocar la liberación de neurotransmisor, incluso en animales homocigotas para la ChR2 (datos no mostrados). Con el fin de aumentar aún más la despolarización de los terminales GABAérgicos, se agregó 4-aminopiridina 2mM (4-AP); un bloqueante de los canales de potasio voltaje dependientes (K_v), a la solución extracelular. En estas condiciones experimentales (Vs=-80 mV, EK∼-82 mV), al estimular optogenéticamente las fibras

GABAérgicas (pulso 2 ms, 0.03 Hz) se registraron corrientes postsinápticas con una amplitud y una cinética similar a las obtenidas en los ratones ChAT;ChR2-eYFP y también a las caracterizadas previamente como mediadas por α9α10 (ver Figura 16.A). Al aplicar α-Bungarotoxina 300 nM (α-Btx), una toxina que bloquea los nAChRs α9α10, las *o*eIPSCs fueron parcialmente bloqueadas en un 82.31 ± 7.24 % (Figura 21.A,C) y fueron bloqueados completamente a una concentración de α-Btx 1-1.5 µM, indicando que el receptor que media las *o*eIPSCs en las CCIs sería el nAChR α9α10 (Figura 21.B). Por último, al fijar el voltaje a -40 mV y estimular optogenéticamente las fibras GABAérgicas se puede observar la reversión de la corriente de K^+ a través del canal SK2 (Figura 21.D).

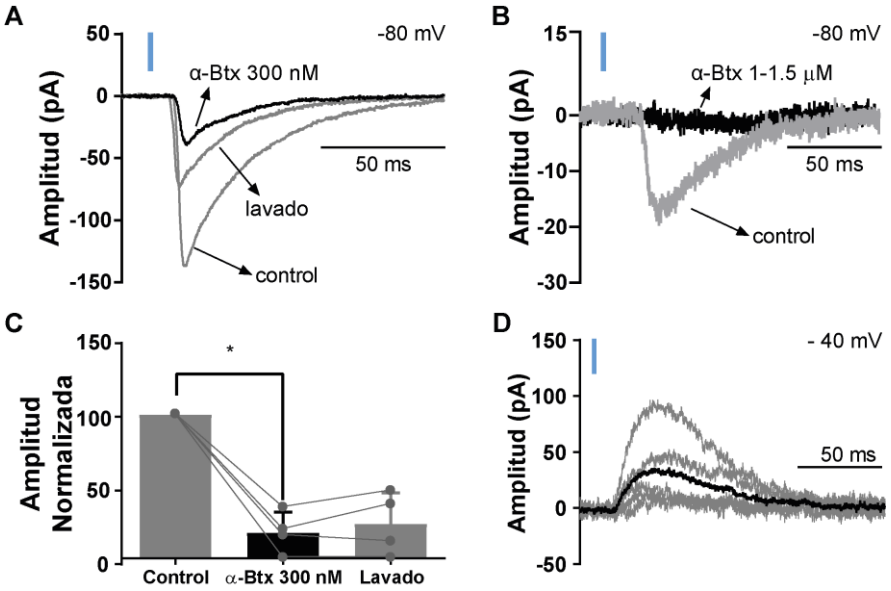

Figura 21| Liberación de ACh de las fibras GABAérgicas. A. Trazos representativos promedio de la respuesta evocada al estimular las fibras GABAérgicas en una situación control (trazo gris), al perfundir α-Bungarotoxina 300 nM (α-Btx, trazo negro) y luego de lavar la droga (trazo gris). **B.** Trazos representativos de la respuesta evocada al estimular las fibras GABAérgicas en una situación control o luego del bloqueo con α-Bungarotoxina 1-1.5 µM (trazo negro). **C.** Cuantificación del bloqueo parcial de la respuesta colinérgica con α-Btx 300 nM (p_{valor} = 0,034, Friedman test, N = 4). Los valores correspondientes a una célula están representados con puntos y, dado que son valores pareados, están unidos por líneas **D.** Trazos representativos de la reversión de la corriente a -40 mV. En todos los casos, el rectángulo azul indica el momento en el que se aplicó el pulso de luz.

4.2.6. Comparación de las *o*eIPSCs entre los animales ChAT;ChR2-eYPF y GAD;ChR2-eYFP

Los resultados descriptos hasta el momento demuestran que al estimular las fibras GABAérgicas, es posible registrar una respuesta colinérgica en las CCIs mediada por el receptor α9α10. A fin de comparar las *o*eIPSCs de los ratones ChAT;ChR2-eYFP y GAD;ChR2-eYFP, se realizó un estudio más exhaustivo de la dinámica temporal de las respuestas evocadas. Al comparar los parámetros de probabilidad de liberación (Pr(*o*eIPSCs)) (ChAT*cre*=0.98 ± 0.02, GAD*cre*=0.91 ± 0.08), la amplitud (ChAT*cre*=139.80 ± 25.41 pA, GAD*cre*=71.37 ± 31.05 pA), el tiempo de decaimiento (ChAT*cre*=40.54 ± 3.63 ms, GAD*cre*=46.55 ± 3.95 ms)

y la latencia (ChAT*cre*=7.62 ± 0.44 ms, GAD*cre*=7.45 ± 1.34 ms) en ambos modelos transgénicos no observamos diferencias significativas entre ellos (Figura 22). Particularmente, el hecho de que la latencia (el tiempo que tarda en registrarse una corriente luego de la aplicación del estímulo) no sea significativamente diferente entre los dos modelos animales indica que no estamos ante un evento disináptico, es decir un evento que involucra la liberación de neurotransmisor de una sinapsis y que activa la liberación de neurotransmisor en una segunda sinapsis. Si la liberación de ACh al estimular las fibras GABAérgicas fuera un evento disináptico, GABA excitaría los terminales MOC, los cuales ante este estímulo liberarían ACh. Más allá de que el efecto de GABA sobre los terminales MOC es inhibitorio y no excitatorio, si se tratase de un evento disináptico, la latencia de la respuesta al estimular en los animales GAD*cre* debería ser mayor. De este modo, el hecho de que las latencias no sean significativamente diferentes entre los genotipos ChAT*cre* y GAD*cre* es otra evidencia importante que se suma en favor a la hipótesis de co-transmisión.

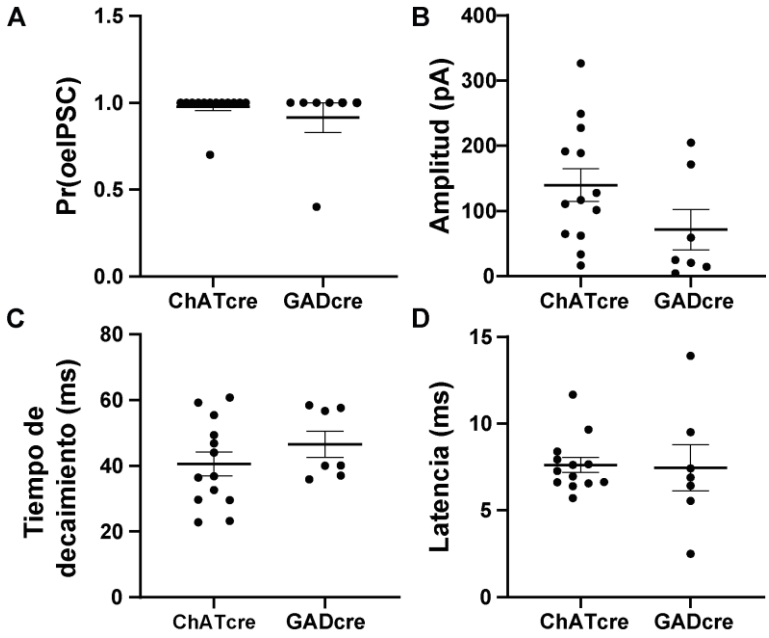

Figura 22| Parámetros sinápticos de las *o*eIPSCs en un modelo transgénico ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ vs GAD;ChR2-eYFP. **A.** Probabilidad de liberación (Pr(*o*eIPSCs)) ± SEM al estimular optogenéticamente en los ratones ChAT*cre* vs GAD*cre*. **B.** Amplitud de los *o*eIPSCs en los ratones ChAT*cre* vs GAD*cre*. **C.** Tiempo de decaimiento de las *o*eIPSCs en los ratones ChAT*cre* vs GAD*cre*. **D.** Latencia de las *o*eIPSCs en los ratones ChAT*cre* vs GAD*cre*. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los dos genotipos (*ns*, test de Mann Whitney, ChAT N=13, GAD N=7). En todos los casos los puntos se corresponden con los valores de células individuales.

4.2.7. Conclusiones parciales de la estimulación optogenética en los ratones GAD;ChR2-eYFP

La especificidad de la línea transgénica demostrada a partir de los experimentos de inmunohistoquímica, nos permitió utilizar la línea de ratones GAD;ChR2-eYFP para estimular inequívocamente las neuronas GABAérgicas. El aumento de la probabilidad de liberación de los terminales, gracias al incremento de $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ y el bloqueo parcial de los canales de potasio Kv con 4-AP, permitió

aumentar la probabilidad de liberación de los terminales para efectivamente obtener corrientes postsinápticas en las CCIs. Se demostró que las *o*eIPSCs en los ratones GAD;ChR2-eYFP tenían el mismo curso temporal que las evocadas en los ratones ChAT;ChR2-eYFP, ya que no se presentaron diferencias significativas en la probabilidad de liberación, la amplitud, el tiempo de decaimiento o la latencia de la respuesta. Por otro lado, se demostró que las corrientes evocadas optogenéticamente en los ratones GAD;ChR2-eYFP provenían únicamente de la activación de los receptores α9α10, tal como fue evidente por el bloqueo parcial y total con α-Bungarotoxina 300nM y 1-1.5 μM respectivamente. A este último punto se le suma el hecho de que al fijar el voltaje de la CCI a -40mV se observó una reversión de la corriente. Este resultado deja en evidencia que al estimular las neuronas GABAérgicas de haz olivococlear interno, se libera también ACh, quien activa los canales α9α10 permitiendo en ingreso de Ca^{2+} y activando así los canales SK2 que al abrirse permiten el eflujo de K^+ fuera de la CCI. En resumen, la multiplicidad de evidencias aquí presentes nos permite sacar la conclusión de que al estimular las fibras GABAérgicas estamos registrando una corriente colinérgica, es decir que GABA está siendo co-transmitido junto con ACh desde los terminales MOC en la sinapsis transitoria MOC-CCI.

4.3. Co-localización de los marcadores colinérgicos y GABAérgicos

4.3.1. Introducción

Los experimentos de electrofisiología presentan una evidencia sólida a favor de la co-transmisión de GABA y ACh de la sinapsis MOC-CCI. Un requisito indispensable para que una neurona sea capaz de liberar dos tipos de neurotransmisores diferentes es contar con la capacidad de sintetizarlos. La enzima responsable de sintetizar ACh es la colina acetiltransferasa o ChAT, mientras que la síntesis de GABA es catalizada por la enzima glutamato decarboxilasa o GAD. Existen dos isoformas de GAD en los vertebrados, GAD67 y GAD65, las cuales son codificadas por dos genes parálogos GAD1 y GAD2, respectivamente (Erlander et al., 1991). Mientras que GAD67 está mayormente localizada en los somas de las neuronas, GAD 65 está principalmente concentrada en los terminales nerviosos (Erlander & Tobin, 1991). Si las neuronas eferentes MOC estuvieran liberando GABA y ACh, entonces deberíamos encontrar neuronas que bioquímicamente tengan la capacidad de sintetizar ambos neurotransmisores a la vez.

4.3.2. Co-localización de la inmunomarcación colinérgica y GABAérgica en el órgano de Corti

A fin de reforzar los resultados de electrofisiología, se realizaron experimentos de inmunomarcación en el órgano de Corti y en el tronco encefálico para revelar los patrones de expresión de las neuronas colinérgicas y GABAérgicas. Se utilizaron ratones ChAT;TdTomato (P9-11) para marcar las fibras colinérgicas, y un anticuerpo anti GAD para marcar las neuronas GABAérgicas. Dado que la florescencia endógena de la proteína TdTomato se perdía en el proceso de fijación, se realizó una incubación con un anticuerpo anti-TdTomato para reforzar su marca. Al realizar una co-inmunomarcación con los anticuerpos anti-GAD y anti-TdTomato, se observó una heterogeneidad en las marcaciones de los terminales que llegan

a haz olivococlear durante el desarrollo. Hay una población de terminales que es exclusivamente colinérgica, y otra es exclusivamente GABAérgica. Sin embargo, hay una proporción de terminales es tanto colinérgica como GABAérgica (Figura 23.C, *zoom*).

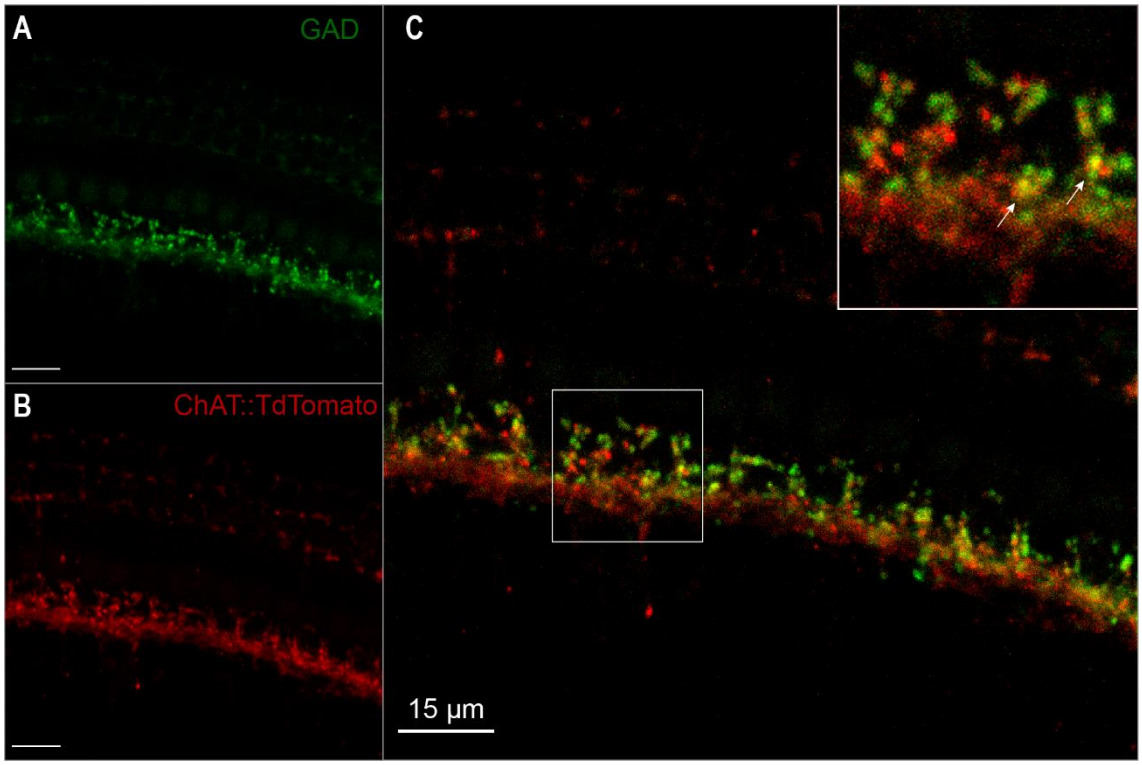

Figura 23| Co-localización de los terminales GABAérgicos y colinérgicos en la porción apical del órgano de Corti. A. Marcación de los terminales GABAérgicos revelados con un anticuerpo anti-GAD. Barra de escala igual a 15µm. **B.** Marcación de los terminales colinérgicos revelados con un anticuerpo anti-TdTomato en un ratón ChAT;TdTomato. Barra de escala igual a 15um. **C.** Co-localización de ambas marcaciones. Arriba a la derecha: *Zoom* de la región recuadrada en la cual se pueden observar punctii puramente colinérgicos (rojos) punctii GABAérgicos (verdes) y punctii que co-localizan ambos marcadores (amarillos, indicados con flechas).

4.3.3. Co-localización de neuronas GABAérgicas y colinérgicas en el VNTB

Considerando la dificultad para obtener una cuantificación en el haz olivococlear interno, sumado al hecho de que no hay marcadores específicos para los terminales MOC, por lo cual es imposible distinguir en la cóclea entre los terminales provenientes de las neuronas MOC y las neuronas LOC, se realizaron experimentos de inmunomarcación en el tallo cerebral en donde las neuronas MOC y LOC están segregadas espacialmente. Tal como se ha mencionado anteriormente (Sección 4.2.3), la inmunomarcación con el anticuerpo anti-GAD en el tronco encefálico no es específica. Para solucionar este problema se utilizaron los ratones GAD;TdTomato para reportar la presencia de neuronas GABAérgicas, las cuales fueron reveladas con un anticuerpo anti-TdTomato. Por su parte, las neuronas colinérgicas fueron marcadas con un anticuerpo anti-ChAT. Luego se cuantificó el número de neuronas de cada tipo halladas en el VNTB (Figura 24). Se observó un patrón muy similar a lo hallado en el órgano de Corti. Hay una población de

neuronas que son colinérgicas (13.06 ± 0.86 células, N=6), una población de neuronas que son GABAérgicas (14 ±1.01 células, N=6) y una población en la cual co-localizan ambos marcadores (5.28 ± 0.45 células, N=6) (Figura 24.B). Vale la pena notar que también hay una población de neuronas en el LSO que también muestran co-localización de ambos neurotransmisores (Figura 24.C). Las implicancias de ello serán discutidas posteriormente.

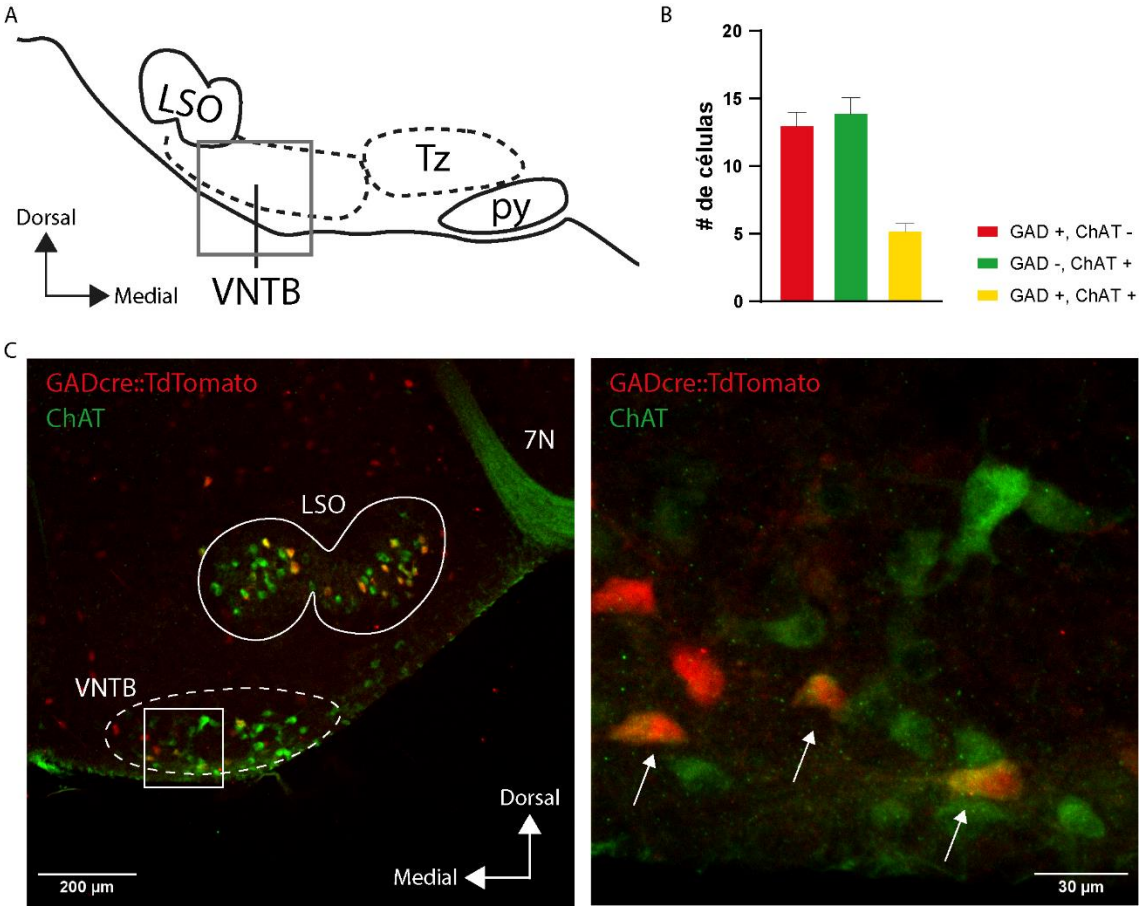

Figura 24| Co-localización de neuronas colinérgicas y GABAérgicas en el VNTB. A. Diagrama ilustrativo de los principales núcleos auditivos en el tronco encefálico de ratón. LSO: Oliva Superior Lateral; VNTB: Núcleo Ventral del Cuerpo Trapezoidal; Tz: Cuerpo Trapezoidal; py: Tracto piramidal. Adaptado de Paxinos, George, and Keith B.J. Franklin. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.* Access Online via Elsevier, 2001. **B.** Número de células promedio ± SEM GABAérgicas (GAD+, ChAT-), colinérgicas (GAD-, ChAT+) o que co-localizan ambos marcadores (GAD+, ChAT+) cuantificadas en el VNTB (N=6). **C.** *Izquierda.* Inmunomarcación de las neuronas colinérgicas (anti-ChAT, verde) y de las neuronas GABAérgicas que expresan TdTomato bajo el promotor de GAD (ant-TdTomato) en el tronco encefálico. Como orientación se puede observar el 7mo par craneal (7N) y el LSO (línea contínua). El VNTB se encuentra medio-ventral al LSO (línea punteada). El cuadrado indica la región en la que se hizo *zoom* en el panel de la derecha. *Derecha.* Mayor aumento de la región recuadrada en el panel izquierdo. Se pueden ver los somas de las neuronas colinérgicas (verdes), GABAérgicas (rojas) y aquellas que co-localizan ambos marcadores (amarillas, indicadas con flechas).

4.3.4. Conclusiones parciales de la co-localicación de GAD y ChAT en el sistema olivococlear

El patrón de marcación GABAérgico y colinérgico hallado y, descripto en esta sección sustenta los resultados obtenidos en los experimentos de electrofisiología, demostrando que hay al menos algunos terminales eferentes con la maquinaria necesaria para co-transmitir GABA y ACh. Se halló una gran heterogeneidad en la marcación GABAérgica y colinérgica en el órgano de Corti de ratones ChAT;TdTomato, sugiriendo que hay tres poblaciones diferentes de terminales en el haz olivococlear interno: una puramente colinérgica; una puramente GABAérgica; y una población colinérgica/GABAérgica. Esta última población en la cual co-localizan ambos marcadores demuestra que efectivamente existen algunos terminales con la capacidad de sintetizar ambos neurotransmisores. Para responder a la pregunta de si esos terminales eran provenientes de las neuronas LOC o MOC, se realizaron inmunomarcaciones anti-ChAT y anti-TdTomato en el tronco encefálico de ratones GAD;TdTomato. Los resultados obtenidos coinciden con el patrón de inmunomarcación hallado en la cóclea, ya que se encontraron somas puramente colinérgicos, puramente GABAérgicos o colinérgicos/GABAérgicos. A diferencia de lo reportado en ratas adultas, en donde hay una población neuronal puramente colinérgica, y por otro hay una población puramente GABAérgica (Vetter et al., 1991), nuestros resultados indican que durante el desarrollo además de estas poblaciones neuronales hay una población de neuronas en el VNTB donde la expresión de GAD y ChAT co-localiza. De esta manera, los resultados obtenidos a partir de la inmunomarcación de marcadores colinérgicos y GABAérgicos, tanto en el haz interno olivococlear como en el VNTB, van a favor de la hipótesis de co-transmisión de GABA y ACh de las neuronas MOC.

4.4. Modulación diferencial de los sitios de liberación de ACh mediada por GABA

4.4.1. Introducción

Los circuitos neuronales tienen múltiples instancias de regulación, las cuales tienen que estar finamente orquestadas para lograr un correcto procesamiento de la información. Como hemos visto, una forma de regulación durante el desarrollo postnatal es la modulación GABAérgica sobre la sinapsis MOC-CCI, la cual altera la probabilidad de liberación de ACh de los terminales MOC. Los experimentos de las secciones anteriores indican que GABA es co-transmitido con ACh. Sin embargo, los experimentos de inmunohistoquímica demostraron la existencia de una segregación espacial de los neurotransmisores en: (1) terminales GABAérgicos; (2) terminales colinérgicos; (3) terminales mixtos GABAérgicos/colinérgicos. Por un lado, dicha segregación nos hizo preguntar si la modulación GABAérgica era o no similar en diferentes terminales MOC. Por otro lado, nos preguntamos si la heterogeneidad hallada a nivel celular en los experimentos de farmacología de CGP en los ratones ChAT;ChR2-eYFP$^{fl/fl}$ podría deberse a diferencias en el grado de modulación de cada sinapsis de manera independiente.

Durante el desarrollo, múltiples fibras eferentes contactan a una misma CCI. En un trabajo previo del laboratorio se observó que cambiando la intensidad del estímulo eléctrico se podían reclutar distinta cantidad de fibras eferentes y generar respuestas sinápticas de diferente amplitud (Moglie et al., 2018).

Cuanto mayor era la intensidad del estímulo extracelular, mayor la amplitud de la *e*eIPSC. En ese mismo trabajo, utilizando técnicas de imágenes de calcio combinado con los registros electrofisiológicos fue posible detectar la entrada de Ca^{2+} por los receptores nAChRs α9α10 en sitios discretos del citoplasma celular, que corresponderían a contactos sinápticos eferentes únicos. Además, Moglie y colaboradores, observaron que al estimular las fibras eferentes era posible detectar múltiples sitios de entrada de calcio en una CCI, entre 2 y 3 por célula, con un promedio de 2.6 ± 0.2 (Moglie et al., 2018). El análisis de la secuencia de imágenes de una CCI durante la estimulación eléctrica permitió estimar la probabilidad de liberación individual y de la magnitud del ingreso de Ca^{2+} en cada sitio (Moglie et al., 2018). Esto hace a la técnica de adquisición de imágenes de Ca^{2+} un recurso invalorable a la hora de investigar cómo es la modulación de GABA en la sinapsis MOC-CCI.

De este modo, con la hipótesis de que el origen de la heterogeneidad observada en los experimentos de farmacología provendría de la modulación diferencial de GABA sobre los terminales MOC, decidimos realizar una serie de experimentos para estudiar la modulación GABAérgica a nivel de sinapsis individuales.

4.4.2. Aproximación mediante registros de señales de calcio a la modulación GABAérgica de la sinapsis MOC-CCI

Los experimentos de Wedemeyer y colaboradores, demostraron que la aplicación de CGP aumenta globalmente la probabilidad de liberación de las sinapsis MOC (Wedemeyer et al., 2013). Sin embargo, mediante este tipo de registros electrofisiológicos es imposible saber cuál es la contribución de cada sinapsis sobre ese aumento global. Haciendo uso de la técnica de imágenes de calcio en las CCIs puesta a punto por Moglie y colaboradores, se realizaron experimentos para registrar el influjo de calcio por el canal α9α10 en presencia o en ausencia del antagonista del receptor de $GABA_B$ (CGP) (Moglie et al., 2018). La Figura 25.A esquematiza la aproximación experimental utilizada, en la cual se estimulan eléctricamente los axones MOC mientras se hacen registros electrofisiológicos y de señales de calcio simultáneamente en una CCI. Brevemente, este tipo de experimentos consiste en realizar *whole-cell patch clamp* con una pipeta de registro cargada con un indicador de calcio de alta afinidad (Fluo-4, 400μM) mientras se estimulan eléctricamente los terminales eferentes para evocar la liberación de ACh. Luego de seleccionar cuidadosamente un plano focal cercano a la parte basal de la CCI, en donde se encuentra la mayor densidad de terminales sinápticos eferentes (Roux et al., 2011), se aplicó un protocolo de estimulación eléctrica para evocar la liberación de ACh y permitir así el ingreso de calcio por los receptores α9α10 (Vs = -120 mV, 30 repeticiones, 0.2 Hz, 100-500 μA, 0.2-2 ms). Mientras se aplicó dicho protocolo, se iluminó al mismo tiempo la preparación con un LED azul para excitar al indicador Fluo-4. Tal como se puede observar en el panel B de la Figura 25, cuando la estimulación eléctrica genera la liberación de ACh (punta de flecha) y la activación de los receptores α9α10, se observa un incremento en la fluorescencia del indicador de calcio que luego retorna levemente a su condición basal acorde transcurre el tiempo. Dado que el incremento de la señal de calcio está restringido en el espacio citoplasmático, es posible asumir que ese sitio de entrada de calcio

es una buena aproximación a una única sinapsis eferente. Se obtuvieron una secuencia de imágenes de la base de cada CCI antes y después del estímulo eléctrico. Para analizar estas imágenes se trazaron 24 regiones de interés concéntricas formando un círculo que cubría toda la sección óptica de la CCI (ver Materiales y Métodos, sección 3.5). En cada una de esas regiones se calculó la diferencia entre la intensidad de la fluorescencia final y la fluorescencia basal previa al estímulo eléctrico ([ΔF]). Aquellos ROIs en los que se detectaron cambios en el ΔF de manera consistente fueron denominados *hotspots*. De esta manera fue posible tener un correlato entre las corrientes postsinápticas evocadas y los cambios en la intensidad de fluorescencia del indicador (Figura 25.C). En el panel superior de la Figura 25.C, se pueden observar tres trazos representativos correspondientes a tres repeticiones de la estimulación eléctrica. En los tres casos se observa una corriente postsináptica global la cual es producto de la contribución de múltiples contactos eferentes. Muchos de esos contactos eferentes están localizados fuera del plano focal, pero algunos de ellos no, y por ende pueden ser identificados y registrados. En el panel inferior de la Figura 25.C, se pueden observar los trazos representativos de correspondientes a tres *hotspots* distribuidos en la sección óptica de la CCI registrada. Así, en el panel inferior C.a, se pude observar que se activaron dos de los tres *hotspots* registrados (trazos verde y naranja) al aplicar un único estímulo eléctrico. El tercer *hotspot* falló en liberar neurotransmisor, lo cual se pude evidenciar por la ausencia en el incremento de la amplitud de la fluorescencia (Figura 25.C.a, trazo magenta). Al repetir una vez más la estimulación, solo se activó uno de los tres, mientras que en los otros dos se registraron fallas (Figura 25.C.b). En una tercera ronda de estimulación, se puede observar que se activaron los tres *hotspots* registrados (Figura 25.C.c). En resumen, al estimular eléctricamente las fibras MOC se puede registrar una corriente global producto de la activación estocástica de uno o más de los terminales que la contactan. Mediante los registros de imágenes de calcio es posible registrar una subpoblación de esos terminales y hacer un seguimiento de ellos en el tiempo. De manera análoga a los registros de electrofisiología, a partir del registro de las señales de calcio es posible obtener valores de la amplitud de la fluorescencia así como la probabilidad de registrar un evento (Pr(evento Ca^{2+})), lo cual es una aproximación a la probabilidad de liberación de una sinapsis única.

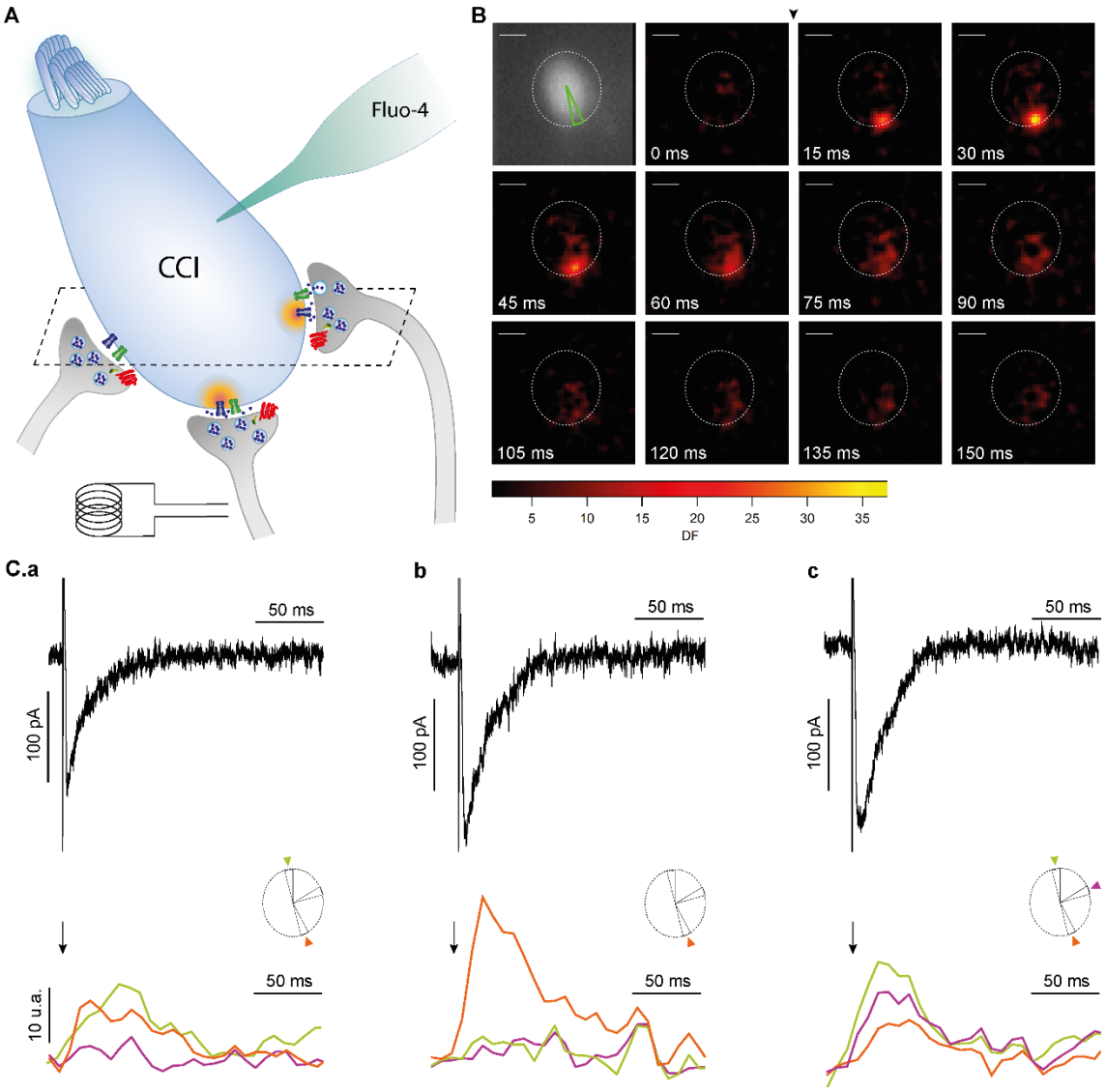

Figura 25| Correlato de las respuestas electrofisiológicas con los registros de las señales de Ca^{2+} en las CCIs. A. Diagrama ilustrativo de la configuración bajo la cual se hacen los experimentos de registros de las señales de calcio. La pipeta de registro no solo permite registrar las corrientes evocadas, sino que también contiene el indicador de calcio (Fluo-4) con el cual se dializará la CCI. Antes de empezar a adquirir las imágenes, se selecciona un plano focal generalmente localizado en la parte basal de la CCI (rectángulo de línea punteada). Las fibras eferentes son estimuladas eléctricamente, algunos de los múltiples terminales que contactan las MOC liberará ACh, lo cual activará el receptor α9α10 dando como resultado un aumento en la fluorescencia del indicador (azul: receptor α9α10; verde canal SK2, rosa: recepto $GABA_B$). **B.** Secuencia temporal de imágenes de una CCI dializada con solución intracelular conteniendo Fluo-4 durante un protocolo de estimulación eferente. La punta de flecha negra indica el momento en el que el pulso eléctrico fue aplicado. La línea punteada en cada imagen representa el borde exterior de la célula ciliada. La región de interés (ROI) analizada está definida por la sección en verde en la primera imagen. **C.a,b,c.** *Panel superior.* Trazos representativos de tres repeticiones del estímulo eléctrico que produjeron la activación de corrientes sinápticas (*ee*IPSCs). *Panel inferior.* Aumento de la señal de fluorescencia en diferentes ROIs (puntas de flecha verdes, violetas y naranjas) producto de la estimulación eléctrica. La ubicación radial de cada ROI se ilustra en el diagrama circular, y las puntas de flecha indican aquellos ROIs en los que se consideró que había un incremento en la fluorescencia (evento de Ca^{2+}).

Con el objetivo de tener una mejor comprensión de la modulación GABAérgica sobre las múltiples sinapsis MOC-CCI, se combinó la técnica de adquisición de imágenes de calcio con experimentos de farmacología. En primera instancia, a fin de evaluar si los registros de imágenes de calcio lograban replicar los resultados electrofisiológicos obtenidos al aplicar CGP, se promediaron los valores de amplitud y de probabilidad de todos los *hotspots* que hubiera dentro de una misma CCI. De manera similar a lo reportado por Moglie y colaboradores., se registraron en promedio 2.38 ± 0.77 *hotspots* por cada CCI (Moglie et al., 2018). Al perfundir el antagonista de los receptores $GABA_B$ (CGP 100-200 µM), se registró un aumento en la amplitud promedio de los *e*eIPSC (incluyendo las fallas) (80.74 ± 14.26 pA) en relación al control (56.02 ± 9.20 pA) (test de t pareado, p_{valor} = 0.0083, Figura 26.A,B), tal como ha sido reportado (Wedemeyer et al. 2013). Tal aumento no se debe a que las corrientes en sí sean más grandes (control = 99.86 ± 7.78 pA, CGP = 107.00 ± 11.24 pA, test de t pareado, *ns*, Figura 26.C), sino a que la probabilidad de liberación aumentó significativamente ($Pr(eeIPSC)_{control}$ = 0.53 ± 0.06; $Pr(eeIPSC)_{CGP}$ = 0.69 ± 0.07; test de t pareado, p_{valor}<0.0001, Figura 26.D). Análogamente, se detectó un aumento en la amplitud promedio por CCI de las señales de calcio calculada con fallas al perfundir CGP 100-200µM (2.66 ± 0.46 UA) con respecto al control (1.47 ± 0.24 UA) (test de t pareado, p_{valor} = 0.0061, Figura 26.E,F). Una vez más, este aumento en la amplitud de fluorescencia promedio de las señales de calcio se debe a un aumento en la probabilidad de liberación de los terminales ($Pr(eventos\ Ca^{2+})_{control}$ = 0.11 ± 0.01; $Pr(eventos\ Ca^{2+})_{CGP}$ = 0.21 ± 0.04, test de t pareado, p_{valor} = 0.0144, Figura 26.H), ya que la amplitud de los eventos calculada sin fallas no presenta diferencias significativas (control = 11.81 ± 1.27 UA, CGP = 11.63 ± 1.55 UA, prueba de rangos de Wilcoxon, *ns,* Figura 26.G). Es importante notar cómo la probabilidad de detectar un evento de calcio en promedio es menor a la probabilidad de liberación hallada en los registros electrofisiológicos. Esto se debe a que individualmente cada sitio tiene una baja probabilidad de liberación, pero dado a que una CCI está inervada por múltiples sitios, la probabilidad de que en el global alguno de ellos responda y se registre un evento, es mayor. De este modo, esta primera serie de resultados nos permite concluir que los registros de señales de calcio son capaces de reproducir de manera fidedigna los resultados obtenidos con los registros electrofisiológicos. Por otro lado, al igual en que los experimentos de farmacología y estimulación eléctrica de las fibras colinérgicas, si bien en promedio el CGP genera un aumento de la amplitud (con fallas) de corriente o de la fluorescencia, se continúa observando una gran heterogeneidad en el efecto que tiene sobre las distintas CCIs (notar que en la Figura 26.B,F hay células que aumentan su amplitud, pero hay otras que no cambian o que incluso disminuyen).

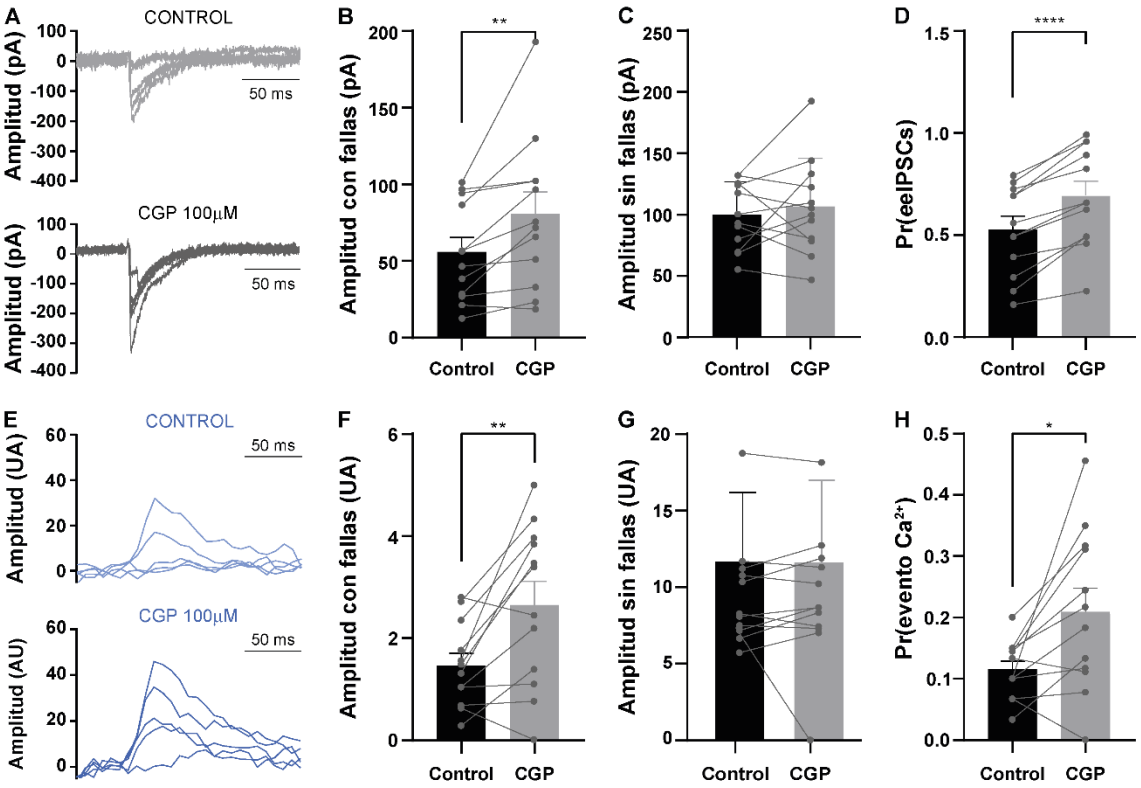

Figura 26. El antagonista de los receptores $GABA_B$ (CGP) genera un aumento global de la probabilidad de liberación de los terminales MOC. A. Trazos representativos de las *ee*IPSCs en el control (panel superior) o luego de la aplicación de CGP 100µM (panel inferior). **B.** Amplitud promedio calculada con fallas ± SEM de los *ee*IPSCs en una situación control o luego de la aplicación de CGP 100-200 µM. En este y en los siguientes gráficos, los puntos representan los valores provenientes de una célula antes o después de la aplicación de CGP. **C.** Amplitud promedio calculada sin fallas ± SEM de los *ee*IPSC en una situación control o luego de la aplicación de CGP 100-200 µM. **D.** Probabilidad de liberación de las corrientes evocadas (Pr(*ee*IPSCs)) ± SEM en una situación control o luego de la aplicación de CGP 100-200 µM. **E.** Trazos representativos de las señales de calcio en un ROI particular en el control (panel superior) o luego de la aplicación de CGP 100 µM (panel inferior). **F.** Amplitud promedio calculada con fallas de las señales de calcio ± SEM dentro de una célula en una situación control o luego de la aplicación de CGP 100-200 µM. **G.** Amplitud promedio calculada sin fallas de las señales de calcio ± SEM dentro de una célula en una situación control o luego de la aplicación de CGP 100-200 µM. **H.** Probabilidad de detección de un evento de Ca^{2+} (Pr(evento Ca^{2+})) ± SEM dentro de una célula en una situación control o luego de aplicación de CGP 100-200 µM . En todos los casos el asterisco indica la magnitud de la diferencia. N=12 células.

4.4.3. Modulación GABAérgica de la sinapsis MOC-CCI en una subpoblación de terminales colinérgicos

El análisis previo confirma el efecto de CGP sobre la actividad sináptica global tal como en el trabajo de Wedemeyer y colaboradores, y además confirma que los registros de imágenes de calcio pueden utilizarse de manera análoga para evidenciar el efecto de la droga a través de la medición de sitios sinápticos únicos (Wedemeyer et al., 2013). No obstante, aún resta responder a la pregunta original acerca de la heterogeneidad en la modulación GABAérgica sobre cada sinapsis. Para ello, se analizaron los datos obtenidos en la sección anterior, pero ahora haciendo foco en hacer un seguimiento de cada *hotspot* antes

o después de la aplicación de CGP 100-200 µM. En la Figura 27.A se pueden observar cinco imágenes representativas del aumento transitorio de calcio al momento del pico (como consecuencia de una estimulación exitosa) en una situación control, o luego de la aplicación de CGP. Si se compara en cada par de imágenes (antes o después de la aplicación de CGP) el ROI indicado con una punta de flecha azul, se puede observar que en ese sitio aumenta la probabilidad de detectar un evento. De este modo, en una misma CCI se pueden registrar múltiples *hotspots* al mismo tiempo, y hacer un seguimiento temporal de ellos tal como se muestra en la Figura 27 (punta de flecha azul; punta de flecha magenta; punta de flecha verde). En la Figura 27.B se muestran registros de las amplitudes de las *e*eIPSCs en una célula representativa (30 repeticiones control, 60 repeticiones CGP 35348 100 µM, 90 repeticiones lavado). También se registraron las amplitudes de ΔF en tres ROIs (*hotspots*) seleccionados de esa misma célula (Figura 27.C-E). Tal como se puede observar, al aplicar CGP 35348 100 µM, aumentó la amplitud de los eIPSCs y disminuyeron las fallas (ceros), efecto que se revirtió al "lavar" el CGP perfundiendo solución extracelular. Esta misma dinámica temporal se replicó al observar las señales de calcio evocadas luego de la estimulación eléctrica, ya que al aplicar CGP 100 µM aumentó la frecuencia de eventos en los tres *hotspots* analizados (Figura 27.C-E). De este modo, la Figura 27 ilustra cómo es posible desglosar el efecto de CGP en sinapsis únicas y evaluar la modulación GABAérgica en cada una de ellas.

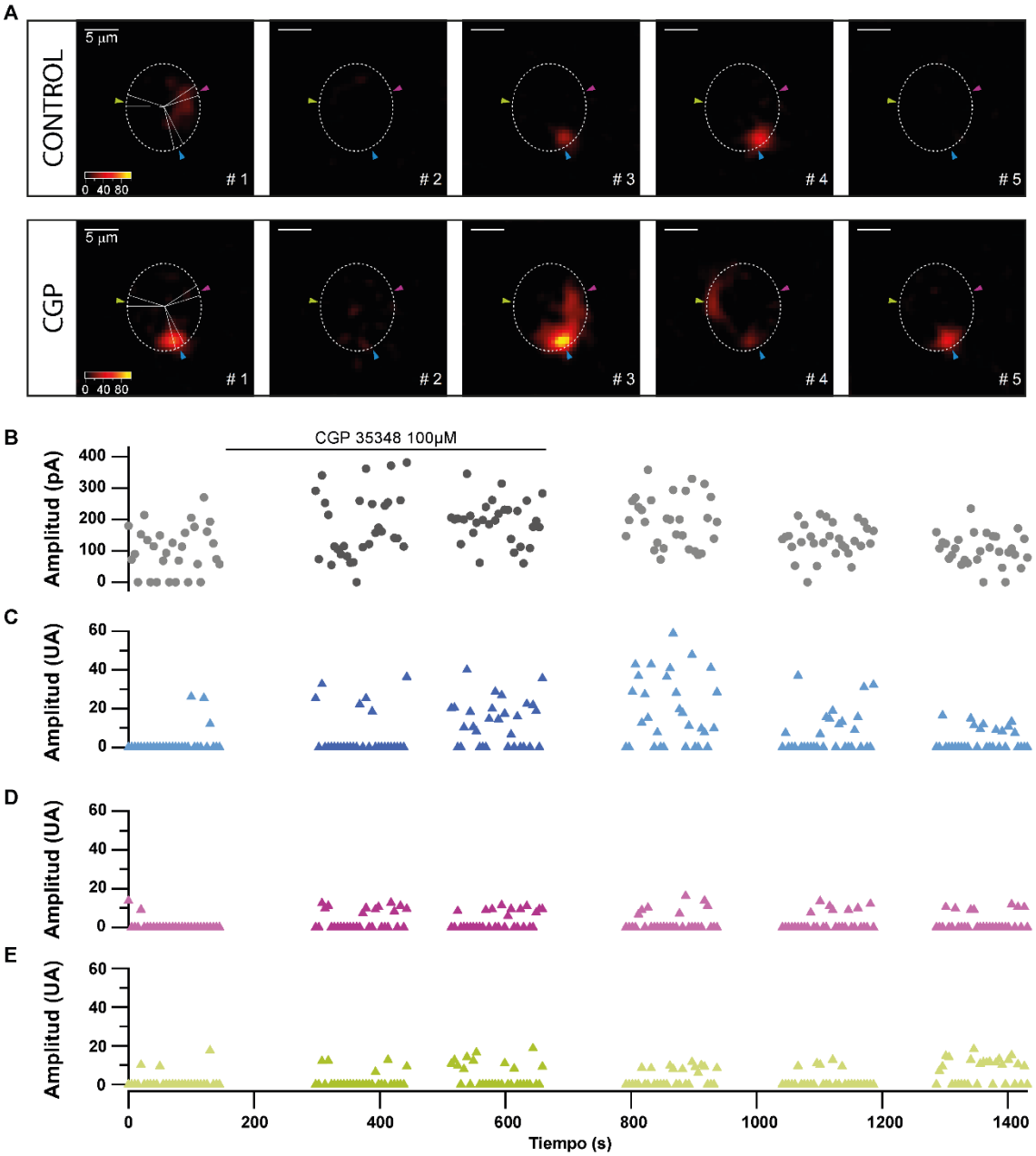

Figura 27| Curso temporal de las señales de calcio tras la aplicación de un antagonista de los receptores $GABA_B$. **A.** Imágenes pseudocoloreadas tomadas al pico de la señal de calcio luego de estimular eléctricamente los terminales MOC en condiciones control (arriba) o luego de la aplicación del antagonista de los receptores $GABA_B$ (abajo, CGP 35348 100 µM). Se muestran 5 casos representativos de un total de 30. La posición de la célula ciliada está delimitada por la línea punteada, y se muestran las regiones de interés (ROIs) analizados para 3 sitios de entrada de calcio indicados con triángulos de color azul, magenta y verde. **B,C,D,E**. Curso temporal de las amplitudes de las corrientes eléctricas (B) y de las señales de calcio en los tres ROIs indicados en A (C,D,E). La barra negra indica el momento durante el cual se aplicó CGP 35348 100 µM.

Al analizar el curso temporal de los distintos *hotspots* dentro de una misma CCI, se hizo evidente que no todos respondían de igual manera ante la aplicación de CGP. La Figura 28.A ejemplifica los resultados hallados en tres células representativas, donde cada par de puntos unidos es un *hotspot* antes o después de la perfusión de CGP. Se puede observar que en una misma CCI se encontraron sitios que no muestran

cambios en la amplitud de fluorescencia (calculada con fallas), o incluso que su amplitud disminuye levemente tras la aplicación de CGP 100-200 µM; mientras que en otros sitios se observó un aumento.

Para poder evaluar la significancia de esta heterogeneidad en la dinámica de las señales de calcio con CGP, se realizaron experimentos control que consistieron en medir repetidamente la amplitud de las señales de calcio y su probabilidad de aparición (Pr(evento Ca2+)) en cada *hotspot* (Vs=-120 mV, 0.2 Hz, 200-500 µA, 0.2-2 ms) (Figura 28). Se aplicó el mismo protocolo de estimulación, primero bajo la perfusión de solución extracelular (Control, 30 estímulos eléctricos), luego se esperaron 2 minutos y se volvió a aplicar el protocolo de estimulación (Control', 60 ó 90 estímulos eléctricos) siempre perfundiendo solución extracelular. Se promediaron los valores de amplitud (con fallas) de todos los *hotspots* presentes dentro de una misma célula. Luego, se compararon dichos valores entre dos ventanas de tiempo análogas a las utilizadas durante el experimento de CGP (Control *versus* Control'). Tal como se puede observar en la Figura 28.B no se observaron diferencias significativas en las amplitudes de las señales de calcio calculadas con fallas de las células control (Control = 0.70 ± 0.17 UA; Control',1.04 ± 0.24 UA, *ns*, test de t pareado, N=12). Los valores máximos de diferencias en la amplitud de fluorescencia observada en los *hotspots* control fue de 1.20 UA por encima de su valor original, y 0.67 UA por debajo de su valor original (Figura 28.D, puntos negros).

En la Figura 28.C, se muestra un histograma de frecuencias de la probabilidad de detectar un evento de Ca^{2+} en todos los *hotspots* registrados en una situación control (Control') o al aplicar CGP 100-200 µM. Acorde a lo esperado, al bloquear los receptores $GABA_B$, se observa un cambio en distribución de frecuencias de las Pr(evento Ca^{2+}) de los diferentes *hotspots* con respecto al control (Kolmogorov-Smirnov, p_{valor} = 0.0348, $N_{Control'}$ = 12 *hotspots*, N_{CGP}= 31 *hotspots*). Al aplicar CGP 100-200 µM, hay una mayor frecuencia de aparición de *hotspots* con una alta Pr(eventos Ca^{2+}). No obstante, en estas condiciones farmacológicas también es frecuente encontrar *hotspots* con probabilidades de liberación similares a los controles. A fin de establecer una línea de corte objetiva y así evaluar cuáles de esos *hotspots* eran modulados positivamente por CGP, se desarrolló el siguiente criterio. Se calculó la variabilidad dentro de cada *hotspot* de los experimentos control como el desvío estándar de la diferencia en la amplitud (Δ Amplitud Control = Amplitud Control' – Amplitud Control) y se estableció un factor umbral como 2 x SD a partir del cual se consideró que un *hotspot* era modulado por CGP solo si superaba dicho valor, y como no modulado a si el cambio era por debajo de ese valor. Es importante aclarar que criterios similares han sido utilizados en nuestro grupo para determinar la presencia de eventos sinápticos o de transientes de calcio en condiciones experimentales similares a las actuales (Ballestero et al., 2011; Kearney et al., 2019; Moglie et al., 2018; Vattino et al., 2020). De las 12 CCIs a las que se les aplicó CGP, se encontraron 5 células en las cuales ninguno de sus *hotspots* superaron el umbral; 2 células en las que todos sus *hotspots* superaron el umbral; y 5 células en las que registraron *hotspots* que superaron el umbral, así como otros que no lo hicieron (Figura 28.D, CGP, la línea punteada indica el factor umbral). Por el contrario, ninguna de las células control (sin CGP) superó el factor umbral (Figura 28.D, Control'), lo cual indica que el criterio utilizado fue efectivo. Este análisis demuestra que existe variabilidad en la sensibilidad al CGP entre los distintos

hotspots, y que incluso dentro de una misma CCI existen sitios de entrada a calcio que muestran un aumento en su probabilidad de activación y otros que no.

Con el objetivo de evaluar si la heterogeneidad en el efecto de CGP sobre los *hotspots* lograba explicar la heterogeneidad a nivel celular que ya hemos descripto, se graficó el grado de efecto de CGP en los registros de electrofisiología versus el grado de efecto en los registros de imágenes de calcio. El efecto de CGP fue calculado como como la variación entre la amplitud de las *e*eIPSCs o de las señales de calcio antes o después de aplicar CGP en la misma célula. Se observó que las células en las que se registraba un mayor efecto de CGP a nivel de corrientes, estaban compuestas por *hotspots* en los cuales CGP también había hecho un gran efecto (Figura 28.E). Por el contrario, en aquellas células en las que no se observó un aumento de la amplitud de las corrientes al aplicar CGP, estaban compuestas por *hotspots* en los cuales CGP tampoco tenía un gran efecto. Aquellas células en las cuales se hallaron sitios que respondían a la aplicación y sitios que no, mostraron tener un efecto intermedio en el aumento de las corrientes ante la aplicación de CGP. Es decir que el grado de modulación GABAérgica neto que sufre una CCI está positivamente correlacionado con el grado de modulación que presenta cada uno de sus contactos sinápticos. De esta manera, tal como había sido hipotetizado, la variabilidad encontrada en porcentaje de efecto del CGP dentro de una CCI en los experimentos de optogenética (ver Resultados, sección 4.2.2) efectivamente se corresponde con una variabilidad en la modulación de los terminales que la contactan.

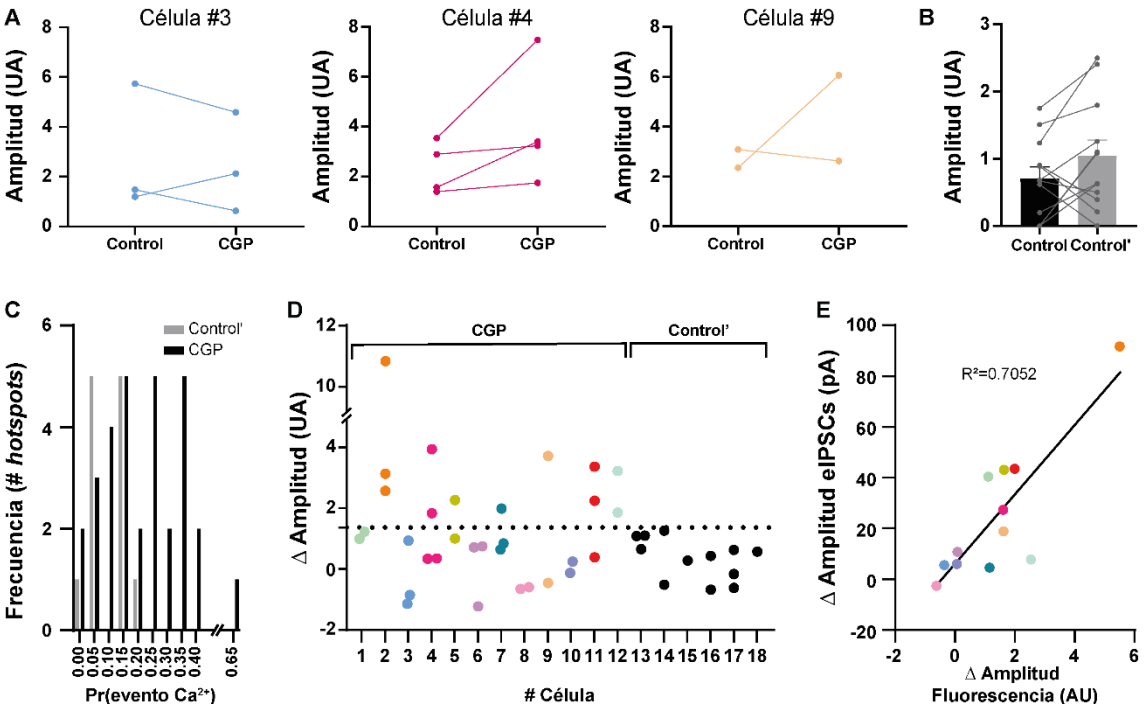

Figura 28| Modulación diferencial por GABA en los múltiples terminales MOC que contactan una CCI. A. Tres células representativas mostrando la amplitud (con fallas) de las señales de calcio por *hotspot* dentro de una CCI en condiciones control o luego de la aplicación de CGP 100-200 µM. Cada punto representa un *hotspot*. **B.** Amplitud promedio (con fallas) ± SEM de eventos de Ca^{2+} en condiciones control (Control) o luego de la perfusión de solución extracelular (Control'). Cada valor es el promedio de todos los *hotspots* registrados en una CCI (N=12 células).

C. Histograma de frecuencia en función de la probabilidad de detectar un evento de Ca^{2+} (por *hotspot*) en una situación control (Control') o bajo el efecto de CGP 100-200 µM (CGP). **D.** Delta de la amplitud de las señales de Ca^{2+} en cada uno de los *hotspots* dentro de una misma CCI a las que se les aplicó CGP (amplitud CGP – amplitud control, cada punto representa un *hotspot*, cada color indica una célula) o de los *hotspots* de las CCIs de los experimentos control (amplitud Control' – amplitud Control, puntos negros). La línea punteada indica la línea de corte (1.37 UA). Bajo este criterio, 5 células no aumentan la amplitud de las señales de calcio luego de la aplicación de CGP 100-200 µM en ninguno de sus *hotspots* (Células #1,3,6,8 y 10); 2 células aumentan la amplitud de las señales de calcio luego de la aplicación de CGP 100-200 µM en todos sus *hotspots* (Células #2 y #12); y 5 células tienen una población de *hotspots* que aumentan la amplitud de sus señales de calcio y una población de células que no lo hace (Células #4,5,7,9 y 11). Ninguna de las células control superó el criterio umbral. **E.** Correlación en la diferencia de la amplitud de los *e*eIPSCs (amplitud CGP – amplitud control) *versus* la diferencia de la amplitud de las señales de Ca^{2+} (amplitud CGP – amplitud control) bajo el efecto de CGP 100-200 µM.

4.4.4. Conclusiones parciales de la heterogeneidad de la modulación GABAérgica sobre la sinapsis MOC-CCI

La combinación de los experimentos de farmacología con los registros de las señales de calcio en las CCI permitió tener un mejor entendimiento de la modulación GABAérgica de los terminales MOC durante el desarrollo. En primer lugar, se demostró que los resultados obtenidos a partir del registro de las señales de calcio al aplicar CGP reprodujeron los resultados obtenidos con los registros electrofisiológicos, tanto en esta tesis como los previamente reportados (Wedemeyer et al., 2013). Tal como ha sido demostrado por Moglie y colaboradores, debido al confinamiento espacial que presentan las señales de calcio es posible discriminar entre los distintos sitios de entrada de calcio de manera tal de realizar una aproximación metodológica en la cual un *hotspot* puede ser considerado como una sinapsis única (Moglie et al., 2018). Al realizar una disección más fina de la modulación mediada por GABA e investigar su mecanismo de acción, se encontró que había un efecto heterogéneo por parte de CGP sobre los distintos terminales. Los mismos fueron seguidos a lo largo del tiempo y se evaluaron los efectos de la perfusión de CGP 100-200 µM en cada uno de ellos. A partir del establecimiento de un factor umbral fue posible separar a los *hotspots* en poblaciones en las cuales aumentaba la probabilidad de detectar un evento de Ca^{2+} al bloquear los $GABA_B$-Rs y poblaciones que no, lo cual demuestra que existen poblaciones de terminales que son diferencialmente moduladas por GABA incluso dentro de una misma CCI. Esta variabilidad recapitula la observación de la heterogeneidad de la marcación en los terminales del haz olivococlear interno, así como la variabilidad en el porcentaje de efecto de CGP en las diferentes CCIs. Finalmente, se pudo observar que las células que en las cuales más efecto genera el CGP correlacionan con la presencia de terminales modulables por CGP, y viceversa en las que menos efecto genera.

Discusión

A lo largo del desarrollo de esta tesis nos hemos adentrado en el rol modulatorio de GABA sobre la sinapsis MOC-CCI. Esta sinapsis transitoria, aunque de corta duración, es crítica para el correcto desarrollo del sistema auditivo de mamíferos. Numerosos trabajos científicos han demostrado la importancia del sistema eferente medial olivococlear durante el desarrollo, para el correcto establecimiento de las vías auditivas (Boero et al., 2018; Clause et al., 2014, 2017; Di Guilmi et al., 2019; Johnson et al., 2013; Taranda et al., 2009; Vetter et al., 1999). Los ratones adultos que carecen de la subunidad α9 del nAChR α9α10, es decir que carecen de un sistema medial olivococlear funcional, fallan en la supresión de las respuestas cocleares durante la estimulación eferente (Vetter et al., 1999), y presentan una inmadurez en el sistema de liberación en la sinapsis en cinta presente entre CCIs y las neuronas aferentes del ganglio espiral (Johnson et al., 2013). Más aún, el refinamiento de la vía inhibitoria aferente que contacta el Núcleo Olivococlear Lateral (LSO) está modificado en estos animales resultando en una organización tonotópica alterada de este núcleo cuya función es localizar la fuente de sonido (Clause et al., 2017). Por el contrario, un sistema olivococlear exacerbado a raíz de una ganancia de función de la subunidad α9 del nAChR α9α10, prolonga la inhibición coclear y aumenta la protección ante el trauma acústico (Boero et al., 2018; Taranda et al., 2009). A su vez, la sobreestimulación del sistema eferente olivococlear también genera la pérdida de la tonotopía del Núcleo Medial del Cuerpo Trapezoidal (MNTB) (Di Guilmi et al., 2019). Es, entonces, de vital importancia que la inhibición producida por el sistema medial olivococlear sobre las CCI esté finamente regulada, ya que tanto la ausencia como el aumento en su función producen una maduración incorrecta del sistema auditivo de mamíferos.

En este contexto, la neuromodulación de la sinapsis MOC-CCI cobra una profunda relevancia. Además de la modulación GABAérgica sobre la cual se ha hecho referencia en este trabajo, es importante mencionar que también existe un rol modulatorio sobre los terminales MOC por parte del glutamato (Ye et al., 2017), ACh (Maison et al., 2010) y óxido nítrico (Kong et al., 2013). Al igual que GABA, se cree que dichos neurotransmisores están implicados en el correcto desarrollo tanto de los circuitos ascendentes como los descendentes (Kitcher et al., 2022). La presencia de GABA en la cóclea ha sido reportada en múltiples especies y, durante un tiempo, este neurotransmisor fue propuesto como el principal mediador inhibitorio del sistema eferente olivococlear (Eybalin et al., 1988; Helfert et al., 1989; Maison et al., 2003; Schrott-Fischer et al., 2007; Vetter et al., 1991; Whitlon & Sobkowicz, 1989b). Sin embargo, pese a los esfuerzos por otorgarle un rol fisiológico a GABA en el sistema auditivo periférico, las evidencias eran contradictorias. Por un lado, registros de *whole-cell patch clamp* en las CCEs de la porción apical de la cóclea de cobayos adultos, mostraron que GABA induce una hiperpolarización dosis dependiente (Gitter & Zenner, 1992), posiblemente mediada por receptores del tipo $GABA_A$ (Kempf et al., 1994; Sziklai et al., 1996). Por otro lado, experimentos de electrofisiología en los cuales agregaban picrotoxina o estricnina (bloqueantes de los $GABA_A$-R), no alteraban las respuestas del nervio coclear ante la aplicación de GABA. Sumado a esto, un bloqueante de la enzima que sintetiza GABA, la tiosemicarbazida, no suprimía el efecto de estimulación del haz olivococlear, indicando que GABA no era el neurotransmisor inhibitorio del sistema eferente olivococlear (Bobbins & Guth, 1970). Si bien actualmente es sabido que la ACh es el principal neurotransmisor eferente, mediando la inhibición de las CCIs gracias al acople funcional del canal SK2

(Elgoyhen et al., 1994, 2001; Goutman et al., 2015b; Oliver et al., 2000), durante mucho tiempo se asoció dicha inhibición con GABA y se trató de buscarle un rol fisiológico. A pesar de que la aplicación exógena de GABA no produce ninguna corriente postsináptica inhibitoria sobre las CCIs o las CCEs (Wedemeyer et al., 2013), este neurotransmisor posee un importante rol en el balance de la inhibición que ejercen las neuronas MOC sobre las CCIs durante el desarrollo.

5.1. Liberación de ACh de las fibras MOC a partir de la estimulación optogenética

Pese a no ser el principal neurotransmisor eferente, GABA cumple una importante función en el sistema auditivo periférico. En animales adultos, se ha demostrado que la ausencia de receptores $GABA_B$ en las neuronas cocleares genera la elevación de los umbrales de audición (Maison et al., 2009). Sumado a esto, la exposición a trauma acústico genera un aumento de la concentración de GABA en la perilinfa, otorgándole a GABA un presunto rol protector frente a exposiciones de sonido muy altas (Drescher et al., 1983). Los experimentos realizados por Wedemeyer y colaboradores, atribuyeron por primera vez un rol fisiológico a GABA durante el desarrollo, demostrando que la presencia de este neurotransmisor disminuía la probabilidad de liberación de ACh desde los terminales MOC por medio de receptores del tipo $GABA_B$ (Wedemeyer et al., 2013). En el presente trabajo, en una primera serie de experimentos, nos abocamos a determinar cuál era la identidad de las neuronas que estaban liberando GABA para activar a los receptores presinápticos $GABA_B$. La respuesta a esa pregunta implicó superar un desafío técnico relacionado con la especificidad de la estimulación sobre un único tipo neuronal (de identidad GABAérgica o colinérgica). Para ello, en una primera instancia, se dirigió la expresión de ChR2 con un sistema *Cre-Lox* bajo el promotor de la enzima que sintetiza ACh (ChAT), de manera tal de estimular optogenéticamente solo las fibras colinérgicas (ratones $ChAT^{+/cre}$;ChR2-$eYPF^{+/fl}$). El aumento de la $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ junto con la homocigosis del transgén de la ChR2 resultaron críticos para la obtención de corrientes postsinápticas evocadas a partir de breves pulsos de luz (*o*eIPSCs), siempre y cuando se mantuviese una baja frecuencia de estimulación (pulso de 2ms, 0.03 Hz, Figura 14.F; Sección 4.1.3), tal como otros autores han reportado (O'Neill et al., 2017).

Tanto el bloqueo farmacológico utilizando antagonistas específicos para α9α10 (Figura 16.A-C; Sección 4.1.5), como la reversión de la corriente a –40 mV (Figura 16.D; Sección 4.1.5), son evidencias fuertes que sugieren que la estimulación optogenética de las fibras colinérgicas en la cóclea produce la liberación de ACh de los terminales MOC. Sumado a esto, al comparar las respuestas evocadas mediante estimulación optogenética o estimulación eléctrica (*e*eIPSCs), no se hallaron diferencias significativas en tiempo de decaimiento de la respuesta ($t_{decaimiento}$) (Figura 15.C, Sección 4.1.4). Este parámetro cinético de la respuesta postsináptica indicaría que, al igual que con la estimulación eléctrica ya descripta (Goutman et al., 2005), las respuestas evocadas optogenéticamente estarían activando los receptores α9α10 y, consecutivamente, los canales de potasio del tipo SK2. De manera similar a este trabajo, Yu y colaboradores, estimulando con los dos métodos mencionados las neuronas eferentes del sistema vestibular de ratón (Z. Yu et al., 2020), tampoco reportaron diferencias respecto al $t_{decaimiento}$. Vale la pena mencionar que, si bien el sistema

eferente vestibular ha sido menos estudiado que el sistema eferente olivococlear, se cree que ambos sistemas tienen características similares (Mathews et al., 2017). De hecho, los autores demostraron que, al igual que en la cóclea, la estimulación de las neuronas eferentes vestibulares produce la activación de los nAChRs α9α10 y la subsecuente apertura de los canales SK2. De este modo, los resultados obtenidos sobre el tiempo de decaimiento en esta tesis son muy similares a los reportados para la estimulación eléctrica de las fibras MOC, así como a los reportados por Yu y colaboradores en el vestíbulo.

Sin embargo, se hallaron algunas diferencias significativas en los otros parámetros sinápticos registrados entre ambos métodos de estimulación. Por un lado, se encontraron diferencias significativas en la latencia de la respuesta, siendo mayor en aquellas respuestas evocadas por estimulación optogenética (Figura 15.D, Sección 4.1.4). Además de la diferencia en la latencia, también se halló que la probabilidad de liberación al estimular optogenéticamente es significativamente mayor que al estimular eléctricamente (Figura 15.A; Sección 4.1.4). Tal como se mencionó en la sección de resultados correspondiente, estos parámetros nos indican que los mecanismos mediante los cuales se evoca la liberación de neurotransmisor difieren dependiendo del tipo de estimulación a la que se sometió la preparación. Mientras que la estimulación eléctrica sin duda genera un potencial de acción, no tenemos evidencias suficientes para definir cuál es el mecanismo subyacente al estimular optogenéticamente. Una posibilidad es que la entrada de cationes por la ChR2 genere una despolarización a nivel de los terminales, permitiendo por un lado la entrada de calcio y aumentando la probabilidad de liberación en el mismo (Le Gratiet et al., 2022), y por otro lado una despolarización retrógrada hasta el último nodo de Ranvier, generando finalmente un potencial de acción de manera tardía. Más allá de las especulaciones que se pueden realizar sobre el mecanismo de liberación al dar un estímulo optogenético, lo que es importante recalcar que se logró evocar la liberación de ACh de los terminales MOC de una manera consistente.

Es importante mencionar también que a la edad de los ratones en que se realizaron los experimentos, además de las fibras MOC, existen las fibras LOC, provenientes del sistema lateral olivococlear. Las neuronas LOC también son ChAT+, en consecuencia, también expresan ChR2 y probablemente también liberan neurotransmisor ante la iluminación con el LED. Aunque no somos capaces de descartar dicho fenómeno, sabemos que solo las neuronas MOC establecen contactos axosomáticos con las CCIs en este período del desarrollo y, por esta razón, aunque las LOC estén siendo estimuladas no registraríamos ningún tipo de oeIPSC proveniente de ellas.

5.2. Co-transmisión de GABA y ACh de las fibras MOC en la cóclea de ratones en desarrollo

La estimulación optogenética de las fibras MOC permitió avanzar sobre la pregunta acerca del origen de la liberación de GABA, sin embargo, no sin afrontar una vez más dificultades técnicas. El mecanismo de acción de GABA hace imposible el registro de una corriente GABAérgica postsináptica al estimular las fibras colinérgicas, debido a que los receptores para GABA son metabotrópicos y se localizan en la presinapsis. No obstante, la estimulación de las fibras colinérgicas y la subsecuente aplicación de un bloqueante de los

receptores $GABA_B$ generó un aumento en la amplitud promedio de las *o*eIPSCs (Figura 17.C, Sección 4.4.2). Estos experimentos sirvieron como una primera evidencia a favor de la co-transmisión de GABA y ACh de la sinapsis MOC-CCI, dado que el efecto del bloqueo solo se hace evidente si GABA está presente en la hendidura sináptica. Es importante aclarar que un resultado similar al obtenido en la Figura 17.C, bloqueando los receptores $GABA_B$, podría llegar a observarse si el GABA no estuviese siendo liberado por los terminales colinérgicos estimulados optogenéticamente, sino por la existencia de una liberación tónica de GABA de un grupo de fibras no identificadas. En este sentido, resultó clave mostrar que la estimulación optogenética de fibras GABAérgicas produjo una respuesta colinérgica. Para ello se estimularon las neuronas GABAérgicas en vez de las colinérgicas utilizando ratones que expresen la ChR2 únicamente en las neuronas GABAérgicas (GAD;ChR2-eYFP). Bajo condiciones que favorecen la despolarización de los terminales (Ca^{2+} 1.8 mM y 4-AP 2 mM), se obtuvieron *o*eIPSCs que fueron parcialmente bloqueadas ante la aplicación de α-Btx (el antagonista de los nAChRs α9α10) (Figura 21.A-C, Sección 4.2.5). Al igual que con los registros realizados en los animales ChAT;ChR2-eYFP, al fijar el voltaje en potenciales más despolarizados (-40 mV), se registró la típica corriente bifásica que demuestra el acople de los receptores α9α10 con los canales SK2 (Figura 21.D, Sección 4.2.5). Mas aún, las corrientes evocadas en los animales ChAT;ChR2-eYFP no son significativamente diferentes a las evocadas en los ratones GAD;ChR2-eYFP (Figura 22; sección 4.2.6). Es así como, el registro de *o*eIPSCs colinérgicas luego de la estimulación de fibras GABAérgicas, representa una evidencia sólida a favor de la hipótesis de la co-transmisión de GABA y ACh de los terminales MOC.

Por su parte, los resultados obtenidos en los experimentos de inmunohistoquímica respaldan el resultado de co-transmisión obtenido en los experimentos de estimulación optogenética. La presencia de terminales en el haz olivococlear interno en los cuales co-localizan los marcadores GABAérgicos y colinérgicos, demuestra que efectivamente existen terminales con la maquinaria necesaria para sintetizar tanto ACh como GABA. Más aún, la presencia de co-localización de estos marcadores en los somas de las neuronas MOC (en el núcleo VNTB), demuestran que existe una población de dichas neuronas que son tanto colinérgicas como GABAérgicas. Esta técnica, sin embargo, tiene sus limitaciones. Por un lado, es imposible saber si los terminales que co-localizan en el haz olivococlear interno provienen de las neuronas MOC o LOC, ya que las neuronas LOC también están presentes a esta edad del desarrollo en el haz olivococlear interno (Simmons et al., 1998b) y nuestras marcaciones a nivel del tallo encefálico (núcleo LSO) muestran que hay neuronas LOC que de igual manera co-localizan ambos marcadores. Sumado a esto, dado que el VNTB también inerva otros núcleos (Warr & Beck, 1996), no podemos confirmar que aquellas neuronas en las cuales co-localizan los marcadores colinérgicos y GABAérgicos sean las mismas que dirigen sus axones hacia la cóclea. Por otro lado, nuestros resultados de co-localización en el VNTB, van parcialmente en contra de los resultados hallados por otros autores. Por un lado, en ratas adultas, se encontraron neuronas marcadas positivamente con GAD, ChAT y CGRP en el LSO y VNTB entre otros núcleos (Vetter et al., 1991). Si bien en este trabajo los autores reportan que en el VNTB hay neuronas que se marcan intensamente con el anticuerpo anti-GAD y que presentan varias formas, aunque están en bajo número, también reportan que en este núcleo hay numerosas neuronas ChAT+, pero que estos dos

marcadores no co-localizan. Las discrepancias obtenidas entre los resultados aquí reportados y aquellos de Vetter y colaboradores (Vetter et al., 1991), podrían deberse a diferencias interespecíficas entre rata y ratón. Algunos autores han hipotetizado que estas diferencias también podrían deberse a un falso negativo, dado que es posible que la técnica de inmunomarcación utilizada no haya sido suficiente para detectar una enzima (GAD2) que solo se encuentra en el soma neuronal de manera transitoria (Maison et al., 2003). Estos mismos autores realizaron experimentos de doble inmunomarcación en ratones de doce semanas de edad, en los cuales se evidencia una coincidencia completa de los marcadores GABAérgicos y colinérgicos en el área de las CCIs y de las CCEs (Maison et al., 2003). Argumentan, además, que toda la inervación eferente en el área de las CCEs proviene del sistema medial olivococlear. De ser así, los somas de las neuronas MOC deberían tener una identidad citoquímica GABAérgica y colinérgica, aunque los autores no realizaron marcaciones a nivel del tronco encefálico para demostrarlo. Los resultados hallados por Maison y colaboradores, no condicen con el patrón de inervación GABAérgica y colinérgica demostrado en esta tesis, donde hallamos tres poblaciones citoquímicas bien definidas -una colinérgica, una GABAérgica, y una GABAérgica/colinérgica- tanto en la cóclea (terminales) como en el tallo (somas). Es posible, dada la diferencia de edades de los animales utilizados, que esta discrepancia se deba a una cuestión madurativa del sistema olivococlear. Por otro lado, estudios de RNAseq realizados a partir de muestras de neuronas MOC de ratones en desarrollo (P5) confirmaron que estas neuronas, además de ChAT, expresan las subunidades 1 y 2 del $GABA_B$-R así como la isoforma de la enzima que sintetiza GABA, GAD 2 pero no GAD1 (Frank et al., 2023). Este mismo trabajo demostró que la expresión GAD2, $GABA_{B1}$-R y $GABA_{B2}$-R disminuye en animales más grandes (P28), pero no así la expresión de ChAT que es constante en estas dos edades. Por lo tanto, las evidencias reportadas en animales maduros son controversiales y requieren de un análisis más cuidadoso para poder extraer conclusiones. A pesar de las limitaciones recién mencionadas, el registro de *o*eIPSCs colinérgicas en los ratones GAD;ChR2-eYFP$^{+/fl}$ junto con la co-localización de los marcadores GABAérgicos y colinérgicos tanto en la cóclea como en el VNTB, nos permiten afirmar que GABA y ACh están siendo co-transmitidos durante el desarrollo, antes del comienzo de la audición, al menos desde una subpoblación de terminales MOC .

5.3. Heterogeneidad en la modulación de GABA y ACh en las sinapsis MOC-CCI

Los mecanismos de neuromodulación en las sinapsis son creciente motivo de investigación. Es probable que esto sea porque en la actualidad el desarrollo tecnológico permite analizar cada vez regiones más pequeñas, pero, además, porque los modelos de circuitos neuronales en ocasiones fallan en explicar gran parte de su variabilidad intrínseca. En este sentido, si bien los experimentos de registros electrofisiológicos en configuración *whole-cell patch clamp* son extremadamente útiles, no permiten tener una resolución a nivel sináptico. La variabilidad obtenida en efecto global de CGP sobre la regulación de la liberación de ACh, así como la heterogeneidad en el patrón de los marcadores colinérgicos y GABAérgicos, nos motivó a investigar sobre el proceso de modulación GABAérgica a nivel de sinapsis únicas.

Los experimentos de imágenes de calcio nos permitieron registrar múltiples sitios de entrada de calcio o *hotspots* al mismo tiempo, al igual que lo descripto por Moglie y colaboradores (Moglie et al., 2018), y además evaluar su modulación farmacológicamente. Lejos de encontrar una homogeneidad en la modulación mediada por GABA, se demostró que incluso dentro de una misma CCI cada sitio sináptico se modula de manera independiente. Más aún, se demostró que existe una correlación entre el efecto global de CGP y el grado de modulación de la sinapsis que contactan las CCIs. Existen antecedentes en la literatura que también reportan la presencia de heterogeneidad en circuitos donde se co-transmiten GABA y ACh. Por ejemplo, a partir de experimentos de estimulación optogenética en microdominios, fue posible evocar la liberación desde los terminales de las neuronas del núcleo Tegmental Laterodorsal, las cuales establecen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas de la Substantia Nigra (Estakhr et al., 2017; Le Gratiet et al., 2022). Los autores lograron identificar tres tipos de conexiones monosinápticas compuestas únicamente por la liberación de GABA, la liberación de ACh, o la liberación de GABA y ACh (Le Gratiet et al., 2022). Tales observaciones eran coincidentes con la presencia de terminales presuntamente puramente GABAérgicos, puramente colinérgicos, o mixtos. De manera similar a nuestras observaciones, los autores confirman que los terminales que co-transmiten ambos neurotransmisores representan una minoría. Por otro lado, un ejemplo de una modulación presináptica heterogénea, son los registros de las señales de calcio en los botones presinápticos de las fibras paralelas del cerebelo, ya que se demostró que los mismos pueden responder de manera diferencial a la aplicación de distintos neuromoduladores (W. Zhang & Linden, 2009). En otro trabajo, también realizado sobre la presinapsis de las fibras paralelas, se encontró que hay una gran variabilidad en la inhibición mediada por GABA (que activa $GABA_B$-R) entre las distintas células registradas, y proponen que cambios en la expresión de los $GABA_B$-R presinápticos pueden contribuir en dicha variabilidad (Orts-Del'Immagine & Pugh, 2018).

Los experimentos realizados en este trabajo no nos permiten saber si los terminales que co-localizan los marcadores de GAD y de ChAT (presuntamente los mismos que co-transmiten GABA y ACh), son a su vez aquellos que son susceptibles a ser modulados por GABA. Esto se debe al hecho de que en los registros de imágenes de calcio se evoca la liberación de ACh a partir de la estimulación eléctrica, con lo cual se están estimulando todas las fibras, tanto las que co-transmiten GABA y ACh como las que solo liberan ACh. Sin embargo, es posible hipotetizar que aquellos sitios que co-transmiten GABA y ACh sean probablemente más susceptibles al bloqueo farmacológicos de los $GABA_B$-Rs. Este razonamiento se debe a que solo desde esos terminales se estaría liberando ACh y GABA en la hendidura sináptica, activando los $GABA_B$-Rs, y por ende siendo susceptibles al bloqueo mediado por CGP. No obstante, cabe la posibilidad de que parte de la heterogeneidad observada pueda deberse a que no todos los terminales MOC tengan receptores de $GABA_B$, y por ende que no todos sean susceptibles al bloqueo farmacológico de CGP, incluso aunque estuvieran co-transmitiendo ambos neurotransmisores. Otro escenario posible es que los terminales que solo liberan ACh tengan receptores de $GABA_B$, los cuales podrían ser activados por un "derrame" o *spill over* de GABA desde otros terminales, y, en consecuencia, ser bloqueados farmacológicamente luego de la aplicación de CGP. A pesar de tales limitaciones metodológicas, lo cierto es que bajo las condiciones experimentales empleadas no todos los terminales MOC son modulados por GABA, al menos durante esta

etapa en del desarrollo. Si bien se requieren más experimentos para terminar de esclarecer cuál podría ser su rol fisiológico, la heterogeneidad en la neuromodulación de la sinapsis MOC-CCI aquí reportada, podría conferirle a la cóclea una mayor complejidad computacional a partir de conexiones sinápticas simples, pero cuidadosamente reguladas.

5.4. Implicancias fisiológicas de la co-transmisión de GABA y ACh

En esta tesis nos hemos referido al proceso de liberación de ACh y GABA de los terminales MOC como co-transmisión. Como hemos mencionado, a diferencia de la co-liberación que implica la liberación de los dos neurotransmisores empaquetados en la misma vesícula, la co-transmisión se refiere a la liberación de los neurotransmisores desde grupos vesiculares distintos. El llenado de las vesículas es un proceso complejo, cuyo mecanismo varía mucho según la naturaleza del neurotransmisor en cuestión (Anne & Gasnier, 2014; Ayala-Lopez & Watts, 2021). En líneas generales, las vesículas son llenadas gracias a transportadores vesiculares de neurotransmisores en un proceso que a su vez involucra a ATPasas de H^+ del tipo V. Estas ATPasas llenan el interior de las vesículas de protones, generando un gradiente electroquímico que luego es utilizado por las proteínas transportadoras para ingresar el neurotransmisor en las vesículas con un mecanismo de co-transporte antiporte. Hay tres grandes familias de transportadores vesiculares denominadas SLC17 (que contiene los transportadores de glutamato: VGLUTs), SLC18 (que contiene los transportadores de ACh: VChATs) y SLC32 (que contiene los transportadores de GABA y glicina: VGATs y VGlyTs). Actualmente se propone que el mecanismo de llenado vesicular puede actuar como un nuevo nivel de modulación de la fuerza sináptica (Hnasko & Edwards, 2012). Se ha demostrado que existe cierta promiscuidad en el llenado vesicular mediado por el VGAT, ya que además de GABA es capaz trasportar glicina dentro de las vesículas (Hnasko & Edwards, 2012). Sin embargo, no hay ningún reporte -al menos de nuestro conocimiento- que indique promiscuidad en el transporte de GABA y ACh por los VGATs o los VChATs. De esta manera, lo más parsimonioso es suponer que ambos son empaquetados en grupos vesiculares diferentes y que, por ende, están siendo co-transmitidos y no co-liberados de la sinápsis MOC-CCI.

El fenómeno de co-transmisión tiene grandes implicancias a nivel de la fisiología sináptica. Por un lado, si cada neurotransmisor está empaquetado en vesículas diferentes, las probabilidades de liberación de los grupos vesiculares son *a priori* independientes. En un estudio realizado en las células amácrinas de la retina (SACs), se demostró que GABA y ACh eran liberados conjuntamente para mediar una transmisión sináptica rápida en dos circuitos sinápticos diferentes (Lee et al., 2010). Por un lado, la liberación de ACh requiere de una alta $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ y una estimulación repetitiva, formando un circuito más silente encargado de permitirle a las células ganglionares de la retina (DSGCs) codificar la sensibilidad del movimiento sin comprometer la resolución espacial. En contraste, la liberación de GABA requiere de una baja $[Ca^{2+}]_{extracelular}$ y es menos sensible a la estimulación repetitiva, generando una inhibición confiable que asegura una robusta selectividad de la dirección. De este modo, Lee y colaboradores, proponen que la co-transmisión de GABA y ACh le permiten al circuito entre las SACs y las DSGs codificar tanto la sensibilidad al movimiento

como la selectividad de la dirección, reduciendo así el número de circuitos neuronales requeridos para el cómputo de estas dos claves visuales. Otro estudio muy interesante realizado en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, demostró que la co-transmisión de GABA y ACh regula los estados hipocampales (Takács et al., 2018). A partir de experimentos de reconstrucciones 3D de imágenes de microscopía electrónica y líneas transgénicas reporteras combinadas con inmunomarcaciones, demostraron que las neuronas colinérgicas tienen la maquinaria necesaria en sus sinapsis para liberar GABA y que, además, hay receptores del tipo $GABA_A$ en la membrana postsináptica. Estos resultados se corroboraron a partir de la estimulación optogenética de las neuronas del presencéfalo basal, en donde se observan respuestas postsinápticas tanto colinérgicas como GABAérgicas. Luego, a partir experimentos de tomografía electrónica y microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM), realizaron reconstrucciones que demuestran un empaquetamiento de GABA y ACh en vesículas distintas, aunque dentro de las mismas zonas activas. Más aún, los autores demostraron que los componentes GABAérgicos y los colinérgicos tienen diferente plasticidad a corto término, y que se modulan diferencialmente por distintos canales de calcio dependientes de voltaje. Mientras que la liberación de las vesículas GABAérgicas están preferencialmente regulados por CCDVs de tipo P/Q, las colinérgicas lo hacen por los CCDVs de tipo N. Estos trabajos nos llevan a analizar el posible rol fisiológico de la co-transmisión en la sinapsis MOC-CCI. Si bien se requieren experimentos para demostrarlo, es probable que GABA y ACh se encuentren en dos grupos vesiculares diferentes, cada uno gobernado por una probabilidad de liberación particular.

En la sinapsis estudiada, mientras que la liberación de ACh depende de los receptores del tipo P/Q y N (Kearney et al., 2019), es posible que la liberación de las vesículas que contienen GABA dependa de otros CCDVs o que tenga otras proteínas de fusión vesiculares. Esto podría generar que las vesículas de ACh tengan una probabilidad de liberación diferente a las vesículas de GABA, lo cual le confiere a la misma neurona un carácter dual. De este modo, la liberación de GABA podría ser más silente, y solo generarse como un mecanismo de retroalimentación negativa que emerge cuando es necesario regular la liberación de ACh. Esto supondría la existencia de un mecanismo de regulación sináptico *in situ* en un momento del desarrollo cuándo la fuerza de la inhibición sobre las CCIs es crítica para el correcto establecimiento de las vías auditivas.

Tal como ya hemos mencionado, previo al inicio de la audición, las CCIs disparan potenciales de acción de calcio espontáneos que se presentan en forma de ráfagas de corta duración (Tritsch et al., 2010). Se ha demostrado que el patrón de disparos de las CCIs controla a su vez la actividad de las neuronas del ganglio espiral (NGEs), el núcleo medial del cuerpo trapezoidal (MNTB) y el colículo inferior (CI) (Tritsch et al., 2010). La secuencia de disparos no se da de manera azarosa, sino que está muy bien definida y sirve como una especie de marcapasos para definir los intervalos de actividad de los otros relevos auditivos.

En este contexto, la inhibición de las neuronas MOC sobre las CCIs para controlar su tasa de disparos cobra una profunda relevancia. La pérdida de un sistema eferente funcional ocasiona alteraciones en la consolidación de las sinapsis, tanto a nivel periférico como a nivel central. Se ha demostrado que la falta de la subunidad a9 del nAChR a9a10, genera una maduración incorrecta de la sinapsis en cinta entre las

CCIs y las NGEs (Johnson et al., 2013). Además, provoca una alteración de la estructura temporal de la actividad espontánea del MNTB, lo cual impide el refinamiento de la conectividad de dicho núcleo (Clause et al., 2014). Sumado a esto, se ha visto también que los ratones que carecen de dicha subunidad, tienen dificultades para procesar la frecuencia y la localización del sonido (Clause et al., 2017). En este escenario, es claro que la inhibición de las neuronas MOC sobre las CCIs debe ser extremadamente precisa y temporalmente regulada, ya que una alteración en su funcionamiento puede generar una maduración incorrecta del sistema auditivo. Es probable que durante los primeros estadios del desarrollo postnatal las conexiones a nivel del VNTB, donde se encuentran los somas de las MOC, aún sean inmaduras, lo cual implica que su frecuencia de disparos no esté finamente regulada, haciendo indispensable la existencia de un control más preciso a nivel de las sinapsis.

Conclusiones

A lo largo de esta tesis fue posible dilucidar un mecanismo de neuromodulación de la sinapsis MOC-CCI finamente regulado. En primer lugar, demostramos que es posible evocar respuestas colinérgicas desde las fibras MOC mediante una estimulación optogenética en los ratones ChAT;ChR2-eYPF. Por otro lado, demostramos que GABA estaba siendo co-transmitido con ACh de los terminales MOC a partir de los experimentos de optogenética en ratones GAD;ChR2-eYFP en los cuales fue posible registrar corrientes colinérgicas a partir de la estimulación optogenética de las fibras GABAérgicas. Por su parte los experimentos de farmacología en los animales ChAT;ChR2-eYFP y las evidencias aportadas en las imágenes de inmunohistoquímica, apoyaron el resultado de co-transmisión. Finalmente, gracias a experimentos realizados mediante imágenes de calcio pudimos demostrar una heterogeneidad en la modulación GABAérgica de las sinapsis MOC-CCI. En conclusión, proponemos que la co-transmisión de GABA y ACh desde algunos terminales MOC podría presuponer un delicado mecanismo de retroalimentación negativa a nivel local, que ayuda a modular de manera precisa la actividad espontanea de las CCI durante un estadio crítico del desarrollo y de plena maduración del sistema auditivo.

Bibliografía

Albrecht, O., Dondzillo, A., Mayer, F., Thompson, J. A., & Klug, A. (2014). Inhibitory projections from the ventral nucleus of the trapezoid body to the medial nucleus of the trapezoid body in the mouse. *Frontiers in Neural Circuits*, *8*(JULY). https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00083

Anne, C., & Gasnier, B. (2014). Vesicular neurotransmitter transporters: Mechanistic aspects. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 73, pp. 149–174). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800223-0.00003-7

Arnold, T., Oestreicher, E., Ehrenberger, K., & Felix, D. (1998). *GABA(A) receptor modulates the activity of inner hair cell afferents in guinea pig cochlea*.

Ashmore, J. (2008). Cochlear outer hair cell motility. In *Physiological Reviews* (Vol. 88, Issue 1, pp. 173–210). https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2006

Ayala-Lopez, N., & Watts, S. W. (2021). Physiology and Pharmacology of Neurotransmitter Transporters. *Comprehensive Physiology*, *11*(3), 2279–2295. https://doi.org/10.1002/cphy.c200035

Ballestero, J., Zorrilla de San Martin, J., Goutman, J., Elgoyhen, A. B., Fuchs, P. A., & Katz, E. (2011). Short-Term Synaptic Plasticity Regulates the Level of Olivocochlear Inhibition to Auditory Hair Cells. *Journal of Neuroscience*, *31*(41), 14763–14774. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6788-10.2011

Batta, T. J., Panyi, G., Szucs, A., & Sziklai, I. (2004). Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. *European Journal of Neuroscience*, *20*(12), 3364–3370. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03797.x

Bobbins, R. P., & Guth, S. (1970). *Evidence that Gamma-Aminobutyric acid is not the inhibitory transmitter at the crossed olivocochlear nerve-hair cell junction*.

Boero, L. E., Castagna, V. C., Di Guilmi, M. N., Goutman, J. D., Elgoyhen, A. B., & Gómez-Casati, M. E. (2018). Enhancement of the medial olivocochlear system prevents hidden hearing loss. *Journal of Neuroscience*, *38*(34), 7440–7451. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0363-18.2018

Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, *8*(9), 1263–1268. https://doi.org/10.1038/nn1525

Brown, M. C. (1989). Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. In *Hearing Research* (Vol. 40).

Brown, M. C. (1994). Antidromic Responses of Single Units From the Spiral Ganglion. In *JOURNALOFNEUROPHYSIOLOGY* (Vol. 7, Issue 5). www.physiology.org/journal/jn

Brown, M. C. (2014). Single-unit labeling of medial olivocochlear neurons: the cochlear frequency map for efferent axons. *J Neurophysiol*, *111*, 2177–2186. https://doi.org/10.1152/jn.00045.2014.-Medial

Brown, M. C., & Levine, J. L. (2008). Dendrites of medial olivocochlear neurons in mouse. *Neuroscience*, *154*(1), 147–159. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.045

Bruce, L. L., Christensen, M. A., & Bruce Warr, A. W. (2000). *Postnatal Development of Efferent Synapses in the Rat Cochlea*.

Bulankina, A. V., & Moser, T. (2012). Neural circuit development in the mammalian cochlea. In *Physiology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 100–112). https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2011

Cabral, A., Cornejo, M. P., Fernandez, G., De Francesco, P. N., Garcia-Romero, G., Uriarte, M., Zigman, J. M., Portiansky, E., Reynaldo, M., & Perello, M. (2017). Circulating ghrelin acts on GABA neurons of the area postrema and mediates gastric emptying in male mice. *Endocrinology*, *158*(5), 1436–1449. https://doi.org/10.1210/en.2016-1815

Cadenas, L. T., Fischl, M. J., & Weisz, C. J. C. (2020a). Synaptic inhibition of medial olivocochlear efferent neurons by neurons of the medial nucleus of the trapezoid body. *Journal of Neuroscience*, *40*(3), 509–525. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1288-19.2019

Clause, A., Kim, G., Sonntag, M., Weisz, C. J. C., Vetter, D. E., Rubsamen, R., & Kandler, K. (2014). The Precise Temporal Pattern of Prehearing Spontaneous Activity Is Necessary for Tonotopic Map Refinement. *Neuron*, *82*(4), 822–835. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.001

Clause, A., Lauer, A. M., & Kandler, K. (2017). Mice lacking the alpha9 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor exhibit deficits in frequency difference limens and sound localization. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00167

Dallos, P. (1985). Response Characteristics of Mammalian Cochlear Hair Cells. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 5, Issue 6).

Dallos, P. (1992). The active cochlea. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(December), 4575–4585.

Dallos, P. (2008). Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 18, Issue 4, pp. 370–376). https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.016

Dallos, P., Santos-Sacchi, J., & Flock, A. (1982). Intracellular recordings from cochlear outer hair cells. *Science*.

Delano, P. H., Elgueda, D., Hamame, C. M., & Robles, L. (2007). Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *Journal of Neuroscience*, *27*(15), 4146–4153. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3702-06.2007

Di Guilmi, M. N., Boero, L. E., Castagna, V. C., Rodríguez-Contreras, A., Wedemeyer, C., Gómez-Casati, M. E., & Elgoyhen, A. B. (2019). Strengthening of the efferent olivocochlear system leads to synaptic

dysfunction and tonotopy disruption of a central auditory nucleus. *Journal of Neuroscience*, *39*(36), 7037–7048. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2536-18.2019

Drescher, M. J., Drescher, D. G., & Medina, J. E. (1983). Effect of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates, in perilymph of the guinea pig inner ear. In *J. Neurochem* (Vol. 41). Bennett.

Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E., & Heinemann, S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, *79*, 705–715. https://doi.org/0092-8674(94)90555-X [pii]

Elgoyhen, A. B., & Katz, E. (2012). The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *Journal of Physiology Paris*, *106*(1–2), 47–56. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.06.001

Elgoyhen, A. B., Langguth, B., De Ridder, D., & Vanneste, S. (2015). Tinnitus: Perspectives from human neuroimaging. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 10, pp. 632–642). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrn4003

Elgoyhen, A. B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V, Heinemann, S. F., & Boulter, J. (2001). a10: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.051622798

Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J. K., Feldblum, S., Patel, N., & Tobin, A. J. (1991). Two Genes Encode Distinct Glutamate Decarboxylases. In *Neuron* (Vol. 7).

Erlander, M. G., & Tobin, A. J. (1991). The Structural and Functional Heterogeneity of Glutamic Acid Decarboxylase: A Review. In *Neurochemical Research* (Vol. 16, Issue 3).

Estakhr, J., Abazari, D., Frisby, K., McIntosh, J. M., & Nashmi, R. (2017). Differential Control of Dopaminergic Excitability and Locomotion by Cholinergic Inputs in Mouse Substantia Nigra. *Current Biology*, *27*(13), 1900-1914.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.084

Eybalin, M., Parnaud, C., Geffard~, M., & Pujol, R. (1988). IMMUNOELECTRON MICROSCOPY IDENTIFIES SEVERAL TYPES OF GABA-CONTAINING EFFERENT SYNAPSES IN THE GUINEA-PIG ORGAN OF CORTI. In *Neuroscience* (Vol. 24, Issue 1).

Feil, R., Rgen Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains. In *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* (Vol. 237).

Felix, D., & Ehrenberger, K. (1992). *The efferent modulation of mammalian inner hair cell afferents*.

Fettiplace, R. (2017). Hair cell transduction, tuning, and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Comprehensive Physiology*, *7*(4), 1197–1227. https://doi.org/10.1002/cphy.c160049

Frank, M. M., Sitko, A. A., Suthakar, K., Cadenas, L. T., Hunt, M., Yuk, M. C., Weisz, C. J. C., & Goodrich, L. V. (2023). Experience-dependent flexibility in a molecularly diverse central-to-peripheral auditory feedback system. *ELife*, *12*. https://doi.org/10.7554/elife.83855

Fuchs, P. A. (2005). Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *Journal of Physiology*, *566*(1), 7–12. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.082214

Fuchs, P. A. (2014). It takes two to tango. *Channels*, *8*(1), 62–75. https://doi.org/10.4161/chan.27470

Fuchs, P. A., Evanst, M. G., & Murrow, B. W. (1990). Calcium Currents in Hair Cells isolated from the Cochlea of the Chick. In *Journal of Physiology* (Vol. 429).

Fuchs, P. A., Glowatzki, E., & Moser, T. (2003). The afferent synapse of cochlear hair cells. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 452–458). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00098-9

Fuchs, P. A., & Lauer, A. M. (2019). Efferent inhibition of the cochlea. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(5). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033530

Fuchs, P. A., Lehar, M., & Hiel, H. (2014). Ultrastructure of cisternal synapses on outer hair cells of the mouse cochlea. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(3), 717–729. https://doi.org/10.1002/cne.23478

Galambos, R. (1956). Supression of Auditory Nerve Activity by Stimulation of Efferent Fibers to Cochlea.

Gifford, M. L., & Guinan, J. J. (1987). Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hearing Research*, *29*(2–3), 179–194. https://doi.org/10.1016/0378-5955(87)90166-3

Gitter, A. H., & Zenner, H. P. (1992). Gamma-Aminobutyric acid receptor activation of outer hair cells in the guinea pig cochlea. In *Eur Arch Otorhinolaryngol* (Vol. 249).

Glowatzki, E., & Fuchs, P. A. (2000). Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5475), 2366–2368. https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2366

Gómez-Casati, M. E., Fuchs, P. A., Elgoyhen, A. B., & Katz, E. (2005). Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *Journal of Physiology*, *566*(1), 103–118. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087155

Goutman, J. D., Elgoyhen, A. B., & Gómez-Casati, M. E. (2015). Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. In *FEBS Letters* (Vol. 589, Issue 22, pp. 3354–3361). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.030

Goutman, J. D., Fuchs, P. A., & Glowatzki, E. (2005). Facilitating efferent inhibition of inner hair cells in the cochlea of the neonatal rat. *Journal of Physiology*, *566*(1), 49–59. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087460

Goutman, J. D., & Pyott, S. J. (2016). Whole-cell patch-clamp recording of mouse and rat inner hair cells in the intact organ of Corti. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1427, pp. 471–485). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3615-1_26

Guinan, J. J., & Gifford, M. L. (1988). Effects of electrical stimulation of efferent olivocochlear neurons on cat auditory-nerve fibers. II. Spontaneous rate. In *Hearing Reseur&* (Vol. 33).

Guinan, J. J., Warr, W. B., & Norris, B. E. (1983). Differential Olivocochlear Projections From Lateral Versus Medial Zones of the Superior Olivary Complex. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 221, Issue 358).

Helfert, R. H., Bonneau, J. M., Wenthold, R. J., & Altschuler, R. A. (1989). GABA and glycine immunoreactivity in the guinea pig superior olivary complex. In *Brain Research* (Vol. 501).

Helfert, R. H., Juiz, J. M., Bledsoe, S. C., Bonneau, J. M., Wenthold, R. J., & Altschuler, R. A. (1992). Patterns of Glutamate, Glycine, and GABA Immunolabeling in Four Synaptic Terminal Classes in the Lateral Superior Olive of the Guinea Pig. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 323).

Herman, A. M., Huang, L., Murphey, D. K., Garcia, I., & Arenkiel, B. R. (2014). Cell type-specific and time-dependent light exposure contribute to silencing in neurons expressing Channelrhodopsin-2. *ELife*, *3*. https://doi.org/10.7554/elife.01481

Herz, J., Fu, Z., Kim, K., Dykstra, T., Wall, M., Li, H., Salvador, A. F., Zou, B., Yan, N., Blackburn, S. M., Andrews, P. H., Goldman, D. H., Papadopoulos, Z., Smirnov, I., Xie, X. S., & Kipnis, J. (2021). GABAergic neuronal IL-4R mediates T cell effect on memory. *Neuron*, *109*(22), 3609-3618.e9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.022

Hnasko, T. S., & Edwards, R. H. (2012). Neurotransmitter corelease: Mechanism and physiological role. *Annual Review of Physiology*, *74*, 225–243. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153315

Housley, G. D., & Ashmore, J. F. (1991). Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *244*(1310), 161–167. https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0065

Hudspeth, A. J. (1997). How Hearing Happens.

Hudspeth, A. J. (2008). Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron*, *59*(4), 530–545. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.012

Hudspeth, A. J. (2014). Integrating the active process of hair cells with cochlear function. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 15, Issue 9, pp. 600–614). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrn3786

Jeong, J. H., Lee, D. K., Blouet, C., Ruiz, H. H., Buettner, C., Chua, S., Schwartz, G. J., & Jo, Y. H. (2015). Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate mouse brown adipose tissue metabolism. *Molecular Metabolism*, *4*(6), 483–492. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.006

Johnson, S. L., Wedemeyer, C., Vetter, D. E., Adachi, R., Holley, M. C., Elgoyhen, A. B., & Marcotti, W. (2013). Cholinergic efferent synaptic transmission regulates the maturation of auditory hair cell ribbon synapses. *Open Biology*, *3*(NOV). https://doi.org/10.1098/rsob.130163

Jonas, P., Bischofberger, J., & Sandkuhler, J. (1999). Corelease of Two Fast Neurotransmitters at a Central Synapse. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (Vol. 87). www.sciencemag.org

Kawase, T., Delgutte, B., & Liberman, M. C. (1993). Antimasking Effects of the Olivocochlear Reflex. II. Enhancement of Auditory-Nerve Response to Masked Tones. In *JOURNALOF NEUROPHYSIOLOGY* (Vol. 70, Issue 6). www.physiology.org/journal/jn

Kearney, G., Zorrilla De San Martín, J., Vattino, L. G., Elgoyhen, A. B., Wedemeyer, C., & Katz, E. (2019). Developmental synaptic changes at the transient olivocochlear-inner hair cell synapse. *Journal of Neuroscience*, *39*(18), 3360–3375. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2746-18.2019

Kempf, H. G., Brandle, T. U., Wisden, W., & Zenner, H. P. (1994). *Gamma-aminobutyric acid A-receptor messenger ribonucleic acid (alpha-1 subunit) detection by in situ hybridization*.

Kitcher, S. R., Pederson, A. M., & Weisz, C. J. C. (2022). Diverse identities and sites of action of cochlear neurotransmitters. In *Hearing Research* (Vol. 419). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.heares.2021.108278

Kong, J. H., Zachary, S., Rohmann, K. N., & Fuchs, P. A. (2013). Retrograde facilitation of efferent synapses on cochlear hair cells. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, *14*(1), 17–27. https://doi.org/10.1007/s10162-012-0361-0

Le Gratiet, K. L., Anderson, C. K., Puente, N., Grandes, P., Copas, C., Nahirney, P. C., Delaney, K. R., & Nashmi, R. (2022). Differential Subcellular Distribution and Release Dynamics of Cotransmitted Cholinergic and GABAergic Synaptic Inputs Modify Dopaminergic Neuronal Excitability. *Journal of Neuroscience*, *42*(46), 8670–8693. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2514-21.2022

Lee, S., Kim, K., & Zhou, Z. J. (2010). Role of ACh-GABA Cotransmission in Detecting Image Motion and Motion Direction. *Neuron*, *68*(6), 1159–1172. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.031

Liberman, M. C., & Brown, M. C. (1986). Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. In *Hearing Research* (Vol. 24).

Liberman, M. C., Gao, J., He, D. Z. Z., Wu, X., Jia, S., & Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, *419*(6904), 296–300. https://doi.org/10.1038/nature01001

Lioudyno, M., Hiel, H., Kong, J. H., Katz, E., Waldman, E., Parameshwaran-Iyer, S., Glowatzki, E., & Fuchs, P. A. (2004). A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *Journal of Neuroscience*, *24*(49), 11160–11164. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3674-04.2004

LoGiudice, L., & Matthews, G. (2009). The role of ribbons at sensory synapses. In *Neuroscientist* (Vol. 15, Issue 4, pp. 380–391). https://doi.org/10.1177/1073858408331373

Maison, S. F., Adams, J. C., & Liberman, M. C. (2003). Olivocochlear innervation in the mouse: Immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *Journal of Comparative Neurology*, *455*(3), 406–416. https://doi.org/10.1002/cne.10490

Maison, S. F., Casanova, E., Holstein, G. R., Bettler, B., & Liberman, M. C. (2009). Loss of GABAB receptors in cochlear neurons: Threshold elevation suggests modulation of outer hair cell function by type II afferent fibers. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, *10*(1), 50–63. https://doi.org/10.1007/s10162-008-0138-7

Maison, S. F., Liu, X. P., Vetter, D. E., Eatock, R. A., Nathanson, N. M., Wess, J., & Liberman, M. C. (2010). Muscarinic signaling in the cochlea: Presynaptic and postsynaptic effects on efferent feedback and afferent excitability. *Journal of Neuroscience*, *30*(19), 6751–6762. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-09.2010

Maison, S. F., Rosahl, T. W., Homanics, G. E., & Liberman, M. C. (2006). Functional role of GABAergic innervation of the cochlea: Phenotypic analysis of mice lacking GABAA receptor subunits α1, α2, α5, β6, β2, β3, or δ. *Journal of Neuroscience*, *26*(40), 10315–10326. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2395-06.2006

Maison, S. F., Usubuchi, H., & Charles Liberman, M. (2013). Efferent feedback minimizes cochlear neuropathy from moderate noise exposure. *Journal of Neuroscience*, *33*(13), 5542–5552. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5027-12.2013

Marcotti, W. (2012). Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Experimental Physiology*, *97*(4), 438–451. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.059303

Mathews, M. A., Camp, A. J., & Murray, A. J. (2017). Reviewing the role of the efferent vestibular system in motor and vestibular circuits. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 8, Issue AUG). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00552

Meng, X., Murali, S., Cheng, Y.-F., Lu, J., Hight, A. E., Kanumuri, V. V, Christian Brown, M., Holt, J. R., Lee, D. J., & Edge, A. S. (2019). Increasing the expression level of ChR2 enhances the optogenetic

excitability of cochlear neurons. *Journal of Neurophysiology*. https://doi.org/10.1152/jn.00828.2018.-Optogenetics

Moglie, M. J., Fuchs, P. A., Elgoyhen, A. B., & Goutman, J. D. (2018). Compartmentalization of antagonistic Ca2+ signals in developing cochlear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(9), E2095–E2104. https://doi.org/10.1073/pnas.1719077115

Moore, L. A., & Trussell, L. O. (2017). Corelease of inhibitory neurotransmitters in the mouse auditory midbrain. *Journal of Neuroscience*, *37*(39), 9453–9464. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1125-17.2017

Moser, T., Brandt, A., & Lysakowski, A. (2006). Hair cell ribbon synapses. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 326, Issue 2, pp. 347–359). https://doi.org/10.1007/s00441-006-0276-3

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., & Bamberg, E. (2003). *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel*. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.1936192100

Nam, J. H., & Fettiplace, R. (2010). Force transmission in the organ of corti micromachine. *Biophysical Journal*, *98*(12), 2813–2821. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.052

Oghalai, J. S., Patel, A. A., Nakagawa, T., & Brownell, W. E. (1998). *Fluorescence-Imaged Microdeformation of the Outer Hair Cell Lateral Wall*.

Oliver, D., Klö, N., Schuck, J., Baukrowitz, T., Ruppersberg, J. P., & Fakler, B. (2000). Gating of Ca2+-Activated K+ Channels Controls Fast Inhibitory Synaptic Transmission at Auditory Outer Hair Cells. In *Neuron* (Vol. 26). Yuhas and Fuchs.

O'Neill, B., Patel, J. C., & Rice, M. E. (2017). Characterization of Optically and Electrically Evoked Dopamine Release in Striatal Slices from Digenic Knock-in Mice with DAT-Driven Expression of Channelrhodopsin. *ACS Chemical Neuroscience*, *8*(2), 310–319. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00300

Orts-Del'Immagine, A., & Pugh, J. R. (2018). Activity-dependent plasticity of presynaptic GABAB receptors at parallel fiber synapses. *Synapse*, *72*(5). https://doi.org/10.1002/syn.22027

Osman, A. A., Schrader, A. D., Hawkes, A. J., Akil, O., Bergeron, A., Lustig, L. R., & Simmons, D. D. (2008). Muscle-like Nicotinic Receptor Accessory Molecules In Sensory Hair Cells of the Inner Ear. In *Mol Cell Neurosci* (Vol. 38, Issue 2).

Purves, D., et al. (2004) Neuroscience. 3rd Edition, Sinauer Associates Inc., Massachusetts.

Raphael, Y., & Altschuler, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 60, Issues 5–6, pp. 397–422). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00047-9

Reiter, E. R., & Liberman, M. C. (1995). Efferent-Mediated Protection From Acoustic Overexposure: Relation to Slow Effects of Olivocochlear Stimulation. In *JOURNALOF NEUROPHYSIOLOGY* (Vol. 73, Issue 2). www.physiology.org/journal/jn

Robertson, D., Sellick, P. M., & Patuzzi, R. (1999). *The continuing search for outer hair cell afferents in the guinea pig spiral ganglion*.

Robles, L., & Ruggero, M. A. (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiological Reviews*, *81*, 1305–1352.

Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C. E., Choi, M. J., Lauzon, D., Lowell, B. B., & Elmquist, J. K. (2011). Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, *13*(2), 195–204. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.010

Roux, I., Wersinger, E., McIntosh, J. M., Fuchs, P. A., & Glowatzki, E. (2011). Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *Journal of Neuroscience*, *31*(42), 15092–15101. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2743-11.2011

Rubio, M. E. (2004). Differential distribution of synaptic endings containing glutamate, glycine, and GABA in the rat dorsal cochlear nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, *477*(3), 253–272. https://doi.org/10.1002/cne.20248

Russell, I. J., & Kossl, M. (1991). The voltage responses of hair cells in the basal turn of the guinea-pig cochlea. In *Journal of Physiology* (Vol. 435).

Russell, I. J., & Sellick, P. M. (1978). Intracellular studies of Hair Cells in the Mammalian Cochlea. In *J. Phy1&ol* (Vol. 284).

Ryan, A. F., Schwartz, I. R., & Ryan, A. F. (1986). Nipecotic acid" preferential accumulation in the cochlea by GABA uptake systems and selective retrograde transport to brainstem. In *Brain Research* (Vol. 399).

Saunders, A., Granger, A. J., & Sabatini, B. L. (2015a). Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *ELIFE*. https://doi.org/10.7554/eLife.06412.001

Saunders, A., Granger, A. J., & Sabatini, B. L. (2015b). Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *ELife*, *2015*(4), 1–13. https://doi.org/10.7554/eLife.06412

Schoenenberger, P., Schärer, Y. P. Z., & Oertner, T. G. (2011). Channelrhodopsin as a tool to investigate synaptic transmission and plasticity. In *Experimental Physiology* (Vol. 96, Issue 1, pp. 34–39). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.051219

Schrott-Fischer, A., Kammen-Jolly, K., Scholtz, A., Rask-Andersen, H., Glueckert, R., & Eybalin, M. (2007). Efferent neurotransmitters in the human cochlea and vestibule. *Acta Oto-Laryngologica*, *127*(1), 13–19. https://doi.org/10.1080/00016480600652123

Seddik, R., Schlichter, R., & Trouslard, J. (2007). *Corelease of GABA/glycine in lamina-X of the spinal cord of neonatal rats*.

Simmons, D. D., Bertolotto, C., Kim, J., Raji-Kubba, J., & Mansdorf, N. (1998). *Choline Acetyltransferase Expression During a Putative Developmental Waiting Period*.

Spoendlin, H., & Schrott, A. (1988). The spiral ganglion and the innervation of the human organ of corti. *Acta Oto-Laryngologica*, *105*(5–6), 403–410. https://doi.org/10.3109/00016488809119493

Strata, P., & Harvey, R. (1999). *Dale's principle*.

Sziklai, I., He, D. Z. Z., & Dallos, P. (1996). *Effect of acetylcholine and GABA on the transfer function of electromotility in isolated outer hair cells*.

Takács, V. T., Cserép, C., Schlingloff, D., Pósfai, B., Szőnyi, A., Sos, K. E., Környei, Z., Dénes, Á., Gulyás, A. I., Freund, T. F., Nyiri, G., & Nyiri, G. (2018). Synaptic co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1101/193318

Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., Miyoshi, G., Shima, Y., Fishell, G., Nelson, S. B., & Huang, Z. J. (2011). A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*, *71*(6), 995–1013. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.026

Taranda, J., Maison, S. F., Ballestero, J. A., Katz, E., Savino, J., Vetter, D. E., Boulter, J., Liberman, M. C., Fuchs, P. A., & Elgoyhen, A. B. (2009). A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biology*, *7*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000018

Terreros, G., & Delano, P. H. (2015). Corticofugal modulation of peripheral auditory responses. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *9*(September). https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00134

Thompson, G. C., Cortez, A. ~ M., & Igarashi, M. (1986). *GABA-Like Immunoreactivity in the Squirrel Monkey Organ of Corti*.

Tritsch, N. X., Granger, A. J., & Sabatini, B. L. (2016). Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(3), 139–145. https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21

Tritsch, N. X., Rodríguez-Contreras, A., Crins, T. T. H., Wang, H. C., Borst, J. G. G., & Bergles, D. E. (2010). Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nature Neuroscience*, *13*(9), 1050–1052. https://doi.org/10.1038/nn.2604

Trotta, M., Bello, E. P., Alsina, R., Tavella, M. B., Ferrán, J. L., Rubinstein, M., & Bumaschny, V. F. (2020). Hypothalamic Pomc expression restricted to GABAergic neurons suppresses Npy overexpression and restores food intake in obese mice. *Molecular Metabolism*, *37*. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.100985

Vaaga, C. E., Borisovska, M., & Westbrook, G. L. (2014). Dual-transmitter neurons: Functional implications of co-release and co-transmission. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 29, pp. 25–32). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.04.010

Vattino, L. G., Wedemeyer, C., Elgoyhen, A. B., & Katz, E. (2020). Functional Postnatal Maturation of the Medial Olivocochlear Efferent–Outer Hair Cell Synapse. *Journal of Neuroscience*, *40*(25), 4842–4857. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2409-19.2020

Verbitsky, M., Rothlin, C. V, Katz, E., & Belén Elgoyhen, A. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the α9 nicotinic cholinergic receptor. In *Neuropharmacology* (Vol. 39). www.elsevier.com/locate/neuropharm

Vetter, D. E., Adams, J. C., & Mugnaini, E. (1991). Chemically Distinct Rat Olivocochlear Neurons. In *SYNAPSE*.

Vetter, D. E., Liberman, M. C., Mann, J., Barhanin, J., Boulter, J., Christian Brown, M., Saffiote-Kolman, J., Heinemann, S. F., & Elgoyhen, A. B. (1999). Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. In *Neuron* (Vol. 23).

Vicencio-Jimenez, S., Weinberg, M. M., Bucci-Mansilla, G., & Lauer, A. M. (2021). Olivocochlear Changes Associated With Aging Predominantly Affect the Medial Olivocochlear System. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.704805

Vollrath, M. A., Kwan, K. Y., & Corey, D. P. (2007). The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 30, pp. 339–365). https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112917

Von Békésy, G. (1960) Experiments in Hearing. McGraw-Hill, New York.

Warr, W. B., & Beck, J. E. (1996). Multiple projections from the ventral nucleus of the trapezoid body in the rat. In *Heating Research* (Vol. 93).

Wedemeyer, C., Martín, J. Z. de S., Ballestero, J., Gómez-Casati, M. E., Torbidoni, A. V., Fuchs, P. A., Bettler, B., Elgoyhen, A. B., & Katz, E. (2013). Activation of presynaptic GABAb(1a,2) receptors inhibits synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear-hair cell synapses. *Journal of Neuroscience*, *33*(39), 15477–15487. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2554-13.2013

Whitlon, D. S., & Sobkowicz, H. M. (1989). GABA-like immunoreactivity in the cochlea of the developing mouse. In *Journal of Neurocytology* (Vol. 18).

Wichmann, C., & Moser, T. (2015). Relating structure and function of inner hair cell ribbon synapses. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 361, Issue 1, pp. 95–114). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00441-014-2102-7

Wiederhold, M. L., & Kiang, N. Y. (1970). Effects of electric stimulation of the crossed olivocochlear bundle on single auditory-nerve fibers in the cat. *The Journal of the Acoustical Society of America*, *48*, 950–965. https://doi.org/10.1121/1.1912234

Wu, J. S., Yi, E., Manca, M., Javaid, H., Lauer, A. M., & Glowatzki, E. (2020). Sound exposure dynamically induces dopamine synthesis in cholinergic LOC efferents for feedback to auditory nerve fibers. *ELife*, *9*. https://doi.org/10.7554/eLife.52419

Ye, Z., Goutman, J. D., Pyott, S. J., & Glowatzki, E. (2017). mGluR1 enhances efferent inhibition of inner hair cells in the developing rat cochlea. *Journal of Physiology*, *595*(11), 3483–3495. https://doi.org/10.1113/JP272604

Yu, N., Zhu, M. L., & Zhao, H. B. (2006). Prestin is expressed on the whole outer hair cell basolateral surface. *Brain Research*, *1095*(1), 51–58. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.017

Yu, Z., McIntosh, J. M., Sadeghi, S. G., & Glowatzki, E. (2020). Efferent synaptic transmission at the vestibular type II hair cell synapse. *J Neurophysiol*, *124*, 360–374. https://doi.org/10.1152/jn.00143.2020.-In

Zhang, W., & Linden, D. J. (2009). Neuromodulation at single presynaptic boutons of cerebellar parallel fibers is determined by bouton size and basal action potential-evoked Ca transient amplitude. *Journal of Neuroscience*, *29*(49), 15586–15594. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3793-09.2009

Zhang, Y. P., & Oertner, T. G. (2007). Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel. *Nature Methods*, *4*(2), 139–141. https://doi.org/10.1038/nmeth988

Zhao, B., & Müller, U. (2015). The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 34, pp. 172–179). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.08.006

Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D., & Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, *405*, 149–155. https://doi.org/10.1038/35012009

Zorrilla De San Martín, J., Pyott, S., Ballestero, J., & Katz, E. (2010). Ca2+and Ca2+-activated K+ channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *Journal of Neuroscience*, *30*(36), 12157–12167. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2541-10.2010