



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Circuitos sensoriales en desarrollo: rol de la actividad eléctrica espontánea en el establecimiento y maduración de la vía aferente del sistema de línea lateral del pez cebra

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

Lic. Lucia Salatino

Directora de tesis: Dra. Paola Plazas
Consejero de Estudios: Dr. Fernando Marengo

Lugar de trabajo: Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2024

A mi abu...

AGRADECIMIENTOS

Estar de este lado del papel no es fácil, no alcanzan palabras para agradecer tantos años rodeada de gente especial. Todos sabemos que los vínculos van y vienen a lo largo de la vida, por eso, lo importante es llevarse lo mejor de cada uno, cada aprendizaje, cada momento, cada virtud. Y agradecer, siempre.

Esta tesis está dedicada a mi abuela, María, que nos dejó físicamente hace un tiempo, sin embargo, sus enseñanzas y valores nunca lo harán. Su bondad, humildad y simpatía características, sus ganas de compartir buenos momentos, domingos llenos de amor, alegría, calidez y, por supuesto, comida casera, hicieron de ella una de las mejores personas que conocí y que, hoy en día, extraño mucho.

Por otro lado, está claro que nada de esto hubiese sido posible sin el sostén más importante de mi vida, aquellas personas que me enseñaron lo que es el amor y la unidad. Mami y Flor, ustedes me vieron nacer, crecer, estuvieron conmigo en mis mejores y peores momentos, me agarraron de la mano no me soltaron nunca. Es un honor para mí tenerlas mi vida, las amo muchísimo y gracias por absolutamente todo. Y una mención al mejor cuñado del mundo, Dieguín.

Le agradezco a mi perrita, Katara, el ser más dulce de esta tierra y con quien comparto cada minuto de mi vida. Mi cable a tierra en malos días, solo mirarnos a los ojos, un par de besos y el mundo se aclara y las preocupaciones desaparecen. También a Ami, que me acompañó hasta donde pudo, supo ser una perrita dulce y maravillosa que nunca voy a olvidar.

A mis amigos más profundos, más cercanos, más fieles, más sabios. Aquellos que conocí por el comienzo de la carrera y me di cuenta que no estaba sola en esa, Flor Ma, May, Andriy y Ger (desde tierras lejanas). Flor Me, mi compañera de estudio, de quejas, de risas, un apoyo incondicional que me enseñó más sobre ser comprensiva y paciente. Y una mención especial a mi hermano, Joni, el ser más sabio y una de las personas que más admiro en este mundo. Nuestras conversaciones me bajan a tierra, su incomparable perspectiva de la vida me enseña a ser un poco más consciente de quién quiero ser.

Personas que me acompañaron en el último tramo de este camino, cuando me reinventé, cuando comenzó una nueva e increíble etapa de mi vida. Rube, Lucha y Dani Ch. Me abrieron sus enormes corazones, confiaron en mí y me ayudan a ser mejor persona todos los días. El apoyo emocional muchas veces llega en forma de alegrías compartidas en comunidad, así que gracias por tanta cantidad de amor en tan poco tiempo.

A mi amigo Pablo, que me sostuvo en muchos momentos, me compartió su hermosa locura y siempre pude encontrar en él un ser de confianza.

Le agradezco mucho a Julián, que fue mi compañero en gran parte de este recorrido y en muchos años de mi vida que me llevaron a este momento. Me atajó en cada caída que tuve, me ayudó a creer en mí misma y a no aflojar ni rendirme ante momentos difíciles.

Luego de tantos y tantos años de amistad, debo agradecerle a Flor C. Tu perspectiva del mundo, tu manera de reflexionar, aconsejarme y traerme a tierra, y hacerme entender que siempre que llovió, paró.

Aquellos seres increíbles que están lejos, que muchas veces extraño, y otras veces me doy cuenta que están y siempre estarán conmigo. Mi tocaya Guada, cada momento que hablamos me llevo un aprendizaje nuevo, me llevo un poquito de tu manera de disfrutar cada momento. Vale, mi hermanita chilena, solo nos separan algunos cientos de kilómetros, pero tenemos una conexión más allá de la distancia.

Y si hablamos de distancia, le agradezco a Fer, que fue una de las personas que me acompañó en esta última etapa, sin conocerme tanto creyó en mí y en que podía con esto y con mucho más. Nunca me dio más que frases de aliento y ayuda cuando la necesité.

Se lleva un pedacito de esta tesis mi psicóloga, Belén, la cual después de mucho trabajo en conjunto me dio muchas herramientas para manejar mis frustraciones y para ser capaz de afrontar todo lo que se viene.

Especiales agradecimientos a Pao, que, más allá de cumplir el rol de mi directora de tesis, es una mentora para mí. A lo largo de estos años, estuvo incondicionalmente conmigo dentro y fuera del labo. Siempre sentí su empatía y compresión a cada paso, y ante varias complicaciones en mi vida personal. Siempre un consejo, siempre un espacio, siempre una voz de tranquilidad y aliento, siempre fiel al tipo persona que es. La admiro y le agradezco mucho tanta enseñanza.

A veces compartir el día a día en un lugar de trabajo no es fácil, pero se torna muy simple cuando tenés compañeras tan cálidas. Por eso quiero agradecer a Maru, Vale y Jime, que supieron hacer del laboratorio un lugar donde abundan las risas, la buena onda, los chismes, y algunas locuras. Maru, escucharte hablar durante estos años (algo que claramente te gusta hacer) acerca de tu forma de ver la vida y tus experiencias, me enseñó mucho sobre lo que es la empatía y abrió en mi mente nuevas perspectivas que aún falta explorar. Quiero agradecerle a Mati, mi joven Padawan, aunque me acompañó poco tiempo, demostró ser una gran persona y un compañero excelente.

Agradezco haber podido tener la oportunidad de trabajar junto con Sabi, pude conocer a una mujer muy admirable, luchadora, con la cual me sentí identificada muchas veces, además de que me inspiró mucha confianza. Me llevo un gran recuerdo de su apoyo y buenos deseos.

Mucha más gente que compartió la cotidianidad del trabajo en el instituto y a lo largo de los años, vínculos que fueron cambiando, gente que estuvo y gente que está. Martín, Martu, Maru, Juli, Angie, Claudia, Laura, Silvia, solo por nombrar algunos.

Siempre dije y voy a decir lo mismo: la calidad humana que hay en nuestro laboratorio simplemente no se ve en todos lados. Trabajar con este grupo de personas hizo que me sienta muy afortunada del rumbo que tomó mi carrera. Gracias a Belén por darme la oportunidad de participar en este equipo de trabajo y por ayudarme cuando lo necesité. A los que se fueron hace poco, pero tuve el placer de conocer y compartir, Tais, Marce y Lucho. Gente hermosa que me nutrió con su experiencia y dedicación, Eleo, Caro y Marian.

A Vivi, Pauli y Clau por todas esas charlas y mates pre y post seminarios, la buena onda y complicidad característica de ustedes, su fortaleza es una inspiración para mí. A Pauli, especialmente, por los tan útiles y sabios consejos que me dio a lo largo de estos años. Y a aquellos más nuevos, que al entrar al labo trajeron alegría, frescura y energía al grupo, Lu A, Wally y Cami.

Le agradezco particularmente a Guchi que me ayudó a avanzar en el inhóspito camino del análisis de datos de esta tesis y siempre tuvo un tiempo para mí, mucha paciencia, Me enseñó a definir criterios mediante con sus explicaciones y a confiar más en el proceso.

Quiero agradecer a Seba Romano, por compartirme el software utilizado en esta tesis y tomarse el tiempo de explicarme la metodología de análisis y ayudarme a llegar a plantear las preguntas correctas.

Por último, un millón de gracias a la Universidad pública, en especial, a la Universidad de Buenos, que me dio la oportunidad de poder estudiar mi carrera soñada. Alimentar de conocimiento a la niña curiosa que siempre llevé dentro. Me permitió tener más y mejores oportunidades que las que hubiese tenido en el caso de no existir. Me dio herramientas para ser independiente, para valerme por mí misma y trabajar de lo que gusta. Me permitió conocerme mejor y conocer gente apasionada por la ciencia como yo. Me permitió conocer otras realidades y ampliar mi panorama del mundo donde vivo.

CIRCUITOS SENSORIALES EN DESARROLLO: ROL DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA EN EL ESTABLECIMIENTO Y MADURACIÓN DE LA VÍA AFERENTE DEL SISTEMA DE LÍNEA LATERAL DEL PEZ CEBRA

RESUMEN

Una de las preguntas clave de la neurociencia es cómo se forman los circuitos neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso. Existen numerosas evidencias del papel que juegan los programas genéticos en este proceso; sin embargo, aún no está claro de qué manera la actividad eléctrica puede afectar la estructura y la función de los circuitos en formación.

Los circuitos neuronales responsables de procesar la información sensorial se establecen en estadios tempranos del desarrollo. Una característica notable de este proceso es que depende de actividad eléctrica espontánea (AEE) que es generada dentro de los mismos órganos sensoriales. Este trabajo tiene por objetivo general develar de qué manera la AEE controla el correcto ensamblado de los circuitos sensoriales en desarrollo. Para ello usamos como modelo la línea lateral (LL) del pez cebra (*Danio rerio*). Este sistema mecanosensorial es superficial y muy fácilmente accesible, lo que permite su estudio y manipulación en el animal entero.

La LL detecta los movimientos del agua y los cambios de presión relativos al cuerpo del animal. Comprende una serie de agrupaciones celulares, llamadas neuromastos (NM), que contienen células ciliadas (CC) mecanosensitivas inervadas por neuronas aferentes (NAs) glutamatérgicas, que llevan la información sensorial al sistema nervioso central, y por neuronas eferentes (NEs) que proyectan desde áreas centrales hacia la periferia y modulan la transducción sensorial.

Las CC de la LL comparten características estructurales, moleculares y funcionales con las CC del oído interno de mamíferos. Debido a ello y su fácil accesibilidad, han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de las bases genéticas de la audición y el equilibrio. Entre los 2 y los 3 días post fecundación (dpf), las NAs de la LL extienden sus axones hacia áreas centrales y periféricas en pos de establecer los primeros contactos sinápticos. A los 5 dpf, el sistema ya es funcional y responde a estímulos externos.

Se ha reportado que tanto las CC como las NA en desarrollo exhiben AEE. Sin embargo, aún no existen evidencias del rol de la AEE en el correcto ensamblado de la LL. A lo largo de esta tesis se presentan dos capítulos enfocados en responder este interrogante.

Capítulo 1- Rol de la AEE en el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAs de la LL.

Con el fin de develar cuál es el papel que juega la AEE en el ensamblado de los circuitos sensoriales en desarrollo, estudiamos *in vivo* el establecimiento de los árboles axonales (AAs) de las NAs que inervan el cerebro medio del pez. Analizamos los estadios de 3 y 5 dpf para estudiar el rol de la AEE en el ensamblado de la vía aferente, en desarrollo y madura, respectivamente.

Realizamos un análisis estructural detallado de los AAs centrales a partir de la expresión estocástica de la proteína fluorescente DsRed y del canal de potasio humano hKir2.1 con el fin de suprimir la excitabilidad neuronal. Como resultado obtuvimos embriones con NAs únicas silenciadas y marcadas con DsRed. Analizamos *in vivo* el crecimiento axonal y el establecimiento de los AAs centrales adquiriendo imágenes en un microscopio confocal. Nuestros resultados muestran que la supresión de la AEE en NAs únicas genera un desarrollo anómalo de los AAs centrales. Aquellas neuronas silenciadas exhibieron una disminución en la longitud de sus AAs, así como alteraciones en su complejidad, lo que provocó una disminución del área de inervación. Además, estudios *in vivo* de la dinámica de crecimiento axonal evidenciaron que los AAs silenciados poseen mayor motilidad, exhibiendo tasas de elongación, retracción, formación y eliminación, mayores que las NAs WT. Más aún, los AAs silenciados presentaron una alteración en el tiempo de vida de sus ramas, así como una disminución en el número de varicosidades, sugiriendo una disminución en el número de sinapsis maduras.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la AEE es necesaria tanto para el crecimiento y la maduración de los AAs de las NA, como para el establecimiento de la inervación a nivel central.

Capítulo 2- Caracterización de los patrones de AEE en CC de la LL en desarrollo y su modulación.

Trabajos previos han reportado la presencia de AEE en CC de la LL a 3 y 5 dpf, previo al comienzo de la detección de estímulos externos. Sin embargo, aún no se conocen las características de dicha actividad y cómo ésta se desarrolla a lo largo de la maduración del sistema. Con el objetivo de caracterizar los patrones de AEE de las CC en distintos estadios del desarrollo, estudiamos *in vivo* los cambios transitorios de las concentraciones intracelulares de calcio (Ca). Para ello, utilizamos embriones transgénicos que expresan el sensor de Ca genéticamente codificado GCaMP7a selectivamente en CC, y realizamos estudios de *Imaging de Ca in vivo* en embriones enteros de pez cebra antes y durante el establecimiento de las sinapsis aferentes de la LL.

Detectamos señales con distintas características temporales, las cuales discriminamos según su frecuencia. Nos abocamos a estudiar las señales de altas frecuencias, las cuales no habían sido descritas hasta el momento. Detectamos eventos de alta frecuencia, a los que denominamos picos de Ca, entre los 3 y 7 dpf, y observamos un mayor porcentaje de CC activas a los 4 dpf, donde se encontró, además, un máximo en la magnitud promedio de actividad por célula.

En el oído interno de mamíferos, la tasa de la AEE está bajo el control de una vía eferente colinérgica que desciende del cerebro y hace sinapsis directamente con las CC de la cóclea. De manera similar, la vía eferente colinérgica de la LL contacta las CC y la transmisión sináptica está mediada por el receptor nicotínico homomérico $\alpha 9$. Sin embargo, aún se desconoce si las NEs de LL también modulan la AEE expresada por las CC en desarrollo. Con el fin de responder esta pregunta, realizamos estudios de *Imaging de Ca in vivo* en presencia de α -bungarotoxina, bloqueante del receptor nicotínico $\alpha 9$. Observamos una disminución en la frecuencia y en la duración de los picos de Ca, sugiriendo que la vía eferente colinérgica modula la AEE expresada en las CC en desarrollo.

Nuestros resultados muestran evidencias *in vivo* de que la AEE cumple un rol crucial en el ensamblado y maduración del circuito neuronal aferente de la LL y, por otro lado, contribuyen a la caracterización de la AEE en CC en distintos estadios de la LL para comprender mejor tanto su función como su modulación durante el desarrollo.

Palabras claves: actividad eléctrica espontánea, línea lateral, pez cebra, neuronas aferentes, células ciliadas.

DEVELOPMENT OF SENSORY CIRCUITS: ROLE OF SPONTANEOUS ELECTRICAL ACTIVITY IN THE ESTABLISHMENT AND MATURATION OF THE AFFERENT PATHWAY OF THE LATERAL LINE SYSTEM IN ZEBRAFISH

ABSTRACT

One of the key questions in neuroscience is how neuronal circuits form during nervous system development. While the role of genetic programs in this process is well established, it remains unclear how electrical activity may affect the structure and function of developing circuits. Neuronal circuits responsible for processing sensory information are established early in development, and a notable feature of this process is its dependence on spontaneous electrical activity (SEA) generated within the sensory organs. This study aims to uncover how SEA controls the proper assembly of developing sensory circuits, using the lateral line (LL) system of zebrafish (*Danio rerio*).

The LL detects water motion and pressure changes relative to the animal's body. It consists of a series of cellular clusters called neuromasts (NM), containing mechanosensitive hair cells (HC) innervated by glutamatergic afferent neurons (ANs) that transmit sensory information to the central nervous system, and efferent neurons (ENs) projecting from central areas to the periphery and modulating sensory transduction. LL HC share structural, molecular, and functional features with mammalian inner ear HC, making them widely used models for studying the genetic basis of hearing and balance. Between 2- and 3-days post fertilization (dpf), LL ANs extend their axons to central and peripheral areas to establish initial synaptic contacts. By 5 dpf, the system is functional and responds to external stimuli.

Developing HC and ANs have been reported to exhibit SEA. However, the role of SEA in the proper assembly of the LL is still unknown. Throughout this thesis, we present two chapters focused on addressing this question.

Chapter 1- Role of SEA in the establishment of central axonal projections of LL ANs.

To uncover the role of SEA in the assembly of developing sensory circuits, we studied *in vivo* the establishment of axonal arbors (AAs) of ANs innervating the zebrafish hindbrain. We analyzed the central projections at 3 and 5 dpf to study the role of SEA in afferent pathway assembly, in both developing and mature stages, respectively. We performed a detailed structural analysis of central AAs based on stochastic expression of the fluorescent protein DsRed and the human potassium channel hKir2.1 to suppress neuronal excitability. As a result, we obtained embryos with single silenced ANs marked with DsRed. We analyzed axonal growth and central AA establishment *in vivo* by acquiring images on a confocal microscope. Our results show that suppressing SEA in single ANs leads to abnormal development of central AAs. Silenced neurons exhibited reduced AA length and alterations in complexity, resulting in a decrease of innervation area. Moreover, *in vivo* studies of axonal growth dynamics revealed that silenced AAs have increased motility, with higher elongation, retraction, formation and elimination rates compared to WT ANs. Furthermore, silenced AAs showed alterations in branch lifetime and decreased number of varicosities, suggesting a decrease in mature synapses.

In conclusion, our results suggest that SEA is necessary for growth and maturation of AN AAs and for establishing central innervation.

Chapter 2- Characterization of SEA patterns in developing LL HC and their modulation.

Previous studies have reported presence of SEA in LL HC at 3 and 5 dpf, preceding the onset of external stimulus detection. However, the characteristics of this activity and its development throughout system maturation remain unknown. To characterize SEA patterns in HC at different developmental stages, we studied *in vivo* transient changes in intracellular calcium (Ca) concentrations. To achieve this, we used transgenic embryos expressing the genetically encoded Ca sensor GCaMP7a selectively in HC, and performed *in vivo* Ca imaging studies in living embryos before and during establishment of LL afferent synapses.

We detected signals with different temporal characteristics, which we discriminated based on their

frequency. We focused on studying high-frequency signals, which had not been described previously. We detected high-frequency events, which we called Ca peaks, between 3 and 7 dpf, and observed a higher percentage of active HC at 4 dpf and, we also found a peak in average activity magnitude per cell.

In the mammalian inner ear, SEA rate is under control of a cholinergic efferent pathway descending from the brain and directly establishing synapses with cochlear HC. Similarly, the LL cholinergic efferent pathway contacts HC, and synaptic transmission is mediated by the homomeric nicotinic receptor $\alpha 9$. However, it is still unknown whether LL ENs also modulate SEA expressed by developing HC. To answer this question, we performed *in vivo* Ca imaging in the presence of α -bungarotoxin, a blocker of the $\alpha 9$ nicotinic receptor. We observed a decrease in Ca peak frequency and duration, suggesting that the cholinergic efferent pathway modulates SEA expressed in developing HC.

Our results provide *in vivo* evidence that SEA plays a crucial role in the assembly and maturation of the LL afferent neuronal circuitry, and contribute to the characterization of SEA in HC at different LL stages for a better understanding of its function and modulation throughout development.

Key words: spontaneous electrical activity, lateral line, zebrafish, afferent neurons, hair cells.

ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina.

AChNE: Neuronas eferentes colinérgicas.

APA: Apamina.

ATP: Adenosín trifosfato.

bg: Background.

Ca_v1.3: Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L 1.3a.

CC(s): Célula(s) ciliada(s).

Cdh23: Cadherina 23.

cOEN: Núcleo eferente octavolateral caudal.

DAG: Diacilglicerol

DELL: Núcleo diencefálico eferente de la línea lateral.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNE: Neuronas eferentes dopaminérgicas.

dpf: Días post fecundación.

GCaMP7a: Sensor de calcio genéticamente codificado.

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

hKIRm: Canal de potasio humano Kir2.1 mutado, que no permea K⁺.

hpf: Horas post fecundación.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

ISR: Isradipina.

KO: *knockout*.

LL: Línea lateral.

LLA: Línea lateral anterior.

LLP: Línea lateral posterior.

MET: Canal mecanotransductor.

min: Minutos.

MNTB: Núcleo medial del cuerpo trapezoide.

MOC: Sistema eferente medial olivoclear.

NA(s): Neurona(s) aferente(s).

nAChRs: Receptores colinérgicos nicotínicos.

NAD⁺/NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada / reducida.

NGE: Neuronas del ganglio espiral.

NGR: Neuronas ganglionares de la retina.

NM(s): Neuromasto(s).

NMDA: Receptor glutamatérgico ionotrópico NMDA.

NOM: Núcleo octavolateral medial.

P2rx: Receptores purinérgicos ionotrópicos P2X.

P2ry: Receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y.

Pcdh15: Protocadherina 15.

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

PLC: Fosfolipasa C.

pLLg: Ganglio aferente de la línea lateral posterior.

PTU: N-feniltiourea.

rOEN: Núcleo eferente octavolateral rostral.

ROI: Región de interés.

RRP: Vesículas listas para ser liberadas ("readily releasable vesicle pool").

seg, s: Segundos.

SNC: Sistema nervioso central.

Tdw: Ventana temporal móvil.

TeNT-Ic: Cadena liviana de la toxina tetánica.

TMEM16a: Canales de Cl⁻ activables por Ca²⁺.

VAMP: Proteína de membrana asociada a vesículas.

VAMPm: Versión mutante no funcional de la proteína VAMP.

WT: Wild-type.

α-BTX: α-bungarotoxina.

λ: Longitud de onda.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	10
SISTEMA DE LÍNEA LATERAL	11
Neuromastos	12
Transducción mecanoeléctrica	14
Inervación de los neuromastos de la línea lateral	16
Desarrollo de los neuromastos.....	17
CÉLULAS CILIADAS.....	19
Sistema auditivo y vestibular	19
Transducción mecanoeléctrica	21
INERVACIÓN AFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL	24
Neuronas aferentes	26
Varicosidades en neuronas aferentes	30
INERVACIÓN EFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL.....	31
Núcleos eferentes	32
Neuronas eferentes dopaminérgicas del DELL	34
Neuronas eferentes colinérgicas del OEN.....	35
ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA.....	36
Transientes rápidos y lentos	38
Actividad espontánea en sistemas sensoriales	40
Sistema auditivo.....	41
Origen de la actividad espontánea en la cóclea.....	41
Actividad espontánea en las neuronas del ganglio espiral	42
Modulación de las neuronas eferentes colinérgicas sobre las células ciliadas	43
Sistema de línea lateral del pez cebra.....	44
Neuronas aferentes	44
Células ciliadas y células de soporte	45
Neuronas eferentes colinérgicas.....	46
OBJETIVOS.....	48
CAPÍTULO 1: Rol de la actividad eléctrica espontánea en el establecimiento de las proyecciones axonales centrales de las neuronas aferentes de la línea lateral.....	49
Materiales y Métodos.....	50
Mantenimiento del acuario y cría de animales.....	50
Animales.....	50
Obtención y cría de embriones.....	50
Plásmidos	51
Microinyecciones de ADN plasmídico en estadio de I -célula.....	52
Preparación de las larvas para la adquisición de imágenes	53
Adquisición de imágenes in vivo (live-imaging) y estudio de la dinámica de crecimiento axonal (time-lapse imaging)	53
Metodología para el análisis de imágenes	54
Análisis morfométrico de las proyecciones centrales de neuronas aferentes de la línea lateral	54

Análisis de la dinámica de crecimiento de la proyección central.....	55
Determinación de varicosidades.....	57
Unidades experimentales y análisis estadístico.....	57
Resultados.....	59
Caracterización morfométrica de neuronas aferentes de la LL en desarrollo que sobreexpresan el canal de potasio hKir 2.1	59
Caracterización morfométrica de neuronas aferentes a los 3 dpf - Estadío inmaduro de la LL.....	60
Caracterización morfométrica de neuronas aferentes a los 5 dpf - Estadío maduro de la LL.....	66
Estudio de varicosidades en NAs silenciadas.....	71
Estudio de la dinámica de crecimiento de las proyecciones centrales de NAs en desarrollo que sobreexpresan el canal de potasio hKir 2.1	74
Análisis de los eventos de motilidad.....	77
Eventos de formación y eliminación	77
Eventos de elongación y retracción.....	81
Discusión.....	86
Silenciamiento de las neuronas aferentes de la línea lateral.....	86
La AEE es crucial para el correcto desarrollo de los árboles axonales de las NAs	88
La disruptión de la AEE tiene como consecuencia fallas en la conectividad sináptica dentro del núcleo octavolateralis en el cerebro medio	91
La maduración de los árboles axonales de las NAs es dependiente de actividad.....	94
La complejidad de los árboles axonales en estadios tempranos está modulada por la actividad espontánea.....	96
Rol del Ca ²⁺ en el crecimiento axonal.....	99
Conclusiones.....	102
CAPÍTULO 2: Caracterización de los patrones de actividad eléctrica espontánea en células ciliadas de la línea lateral en desarrollo y su modulación	103
Materiales y Métodos.....	104
Animales.....	104
Preparación de larvas para el registro in vivo de imágenes de Ca ²⁺	104
Estudio de la actividad eléctrica espontánea a través de imágenes de Ca ²⁺ (Imaging de Ca).....	106
Procesamiento de las imágenes	106
Determinación de una línea de base dinámica (F ₀).....	108
Estimación del ruido del sistema y umbral de detección	109
Determinación de la magnitud promedio de actividad	110
Discriminación de las señales de Ca ²⁺ con diferentes perfiles temporales	111
Estudio farmacológico de la modulación de la actividad eléctrica espontánea.....	113
Drogas.....	113
Unidades experimentales y análisis estadístico.....	113
Resultados.....	115
Caracterización de los patrones de actividad eléctrica espontánea expresada en CCs de LL en desarrollo.....	115
Modulación de la actividad eléctrica espontánea expresada por las CCs de la línea lateral en desarrollo	121
Modulación de la AEE mediada por el sistema eferente.....	127
Modulación de la AEE mediada por señalización purinérgica	135
Discusión.....	142
Caracterización de los patrones de AEE expresada en CCs de LLP en desarrollo	143

A los 4 dpf, los NM _s exhiben un máximo en el reclutamiento de CCs activas y en la magnitud promedio de AEE expresada por las CCs.....	143
Estudio de la modulación de la AEE en las CCs.....	145
El nAChR α 9 está involucrado en la modulación de la AEE a los 6/7 dpf.....	146
Las CCs presentan modulación purinérgica a los 6/7 dpf.....	149
Conclusiones.....	154
REFERENCIAS.....	155

INTRODUCCIÓN

Los circuitos neuronales se establecen en estadios tempranos del desarrollo como resultado de la combinación de eventos determinados tanto por programas genéticos como por procesos dependientes de actividad. En los sistemas responsables de procesar la información sensorial, el correcto ensamblado neuronal consta de una serie de pasos finamente regulados: la especificidad neuronal, el crecimiento axonal y dendrítico, el establecimiento de los contactos sinápticos y el refinamiento de dichas conexiones. Algunos de estos procesos son mayormente guiados por señalizaciones moleculares, mientras que otros son dependientes de actividad espontánea o independiente de la experiencia sensorial.

Se conoce que la actividad eléctrica espontánea (AEE) en el desarrollo de sistemas sensoriales es originada dentro de los mismos órganos sensoriales y propagada hacia áreas superiores de procesamiento. En los sistemas visual y somatosensorial, la AEE exhibida en estadios tempranos se genera como ráfagas de potenciales de acción separadas por períodos largos de quiescencia, en grupos de neuronas que comparten campos receptivos (Meister et al., 1991; Khazipov, 2004). Patrones de actividad similares se han encontrado en el sistema auditivo antes del comienzo de la audición (Lippe, 1994; Sonntag et al., 2008; Jones et al., 2007). Esta actividad independiente del sonido es originada en la cóclea (Johnson et al., 2011; Tritsch, 2007), y juega un papel importante en la sobrevida y maduración de las neuronas auditivas (Mostafapour et al., 2005; Glueckert et al., 2003; Zhang-Hooks, 2016), en el desarrollo de las sinapsis aferentes (Erazo-Fischer et al., 2007, McKay & Oleskevich, 2007), y en el refinamiento de los mapas tonotópicos (Kandler et al., 2009). Sin embargo, aún se desconocen en profundidad los mecanismos por los cuales el rol de la AEE es crucial en el ensamblado de los microcircuitos sensoriales *in vivo* durante el desarrollo del sistema nervioso.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio del desarrollo de vertebrados. Una de sus mayores ventajas es la transparencia de sus embriones y larvas, que, al ser de desarrollo externo, permite realizar estudios de imágenes a nivel de célula única *in vivo* y en un organismo intacto durante etapas muy tempranas de su desarrollo. Todas estas características han hecho del pez cebra un modelo excelente para visualizar los efectos de la expresión de genes en clases específicas de neuronas en el sistema nervioso y estudiar en el animal intacto los procesos de crecimiento axonal y sinaptogénesis.

Debido a las similitudes moleculares y funcionales que presentan el sistema auditivo de mamíferos y el sistema de línea lateral del pez cebra, utilizaremos este excepcional modelo para estudiar el establecimiento de los árboles axonales centrales de la vía aferente y el rol de la AEE en este proceso.

SISTEMA DE LÍNEA LATERAL

La línea lateral (LL) es un sistema sensorial presente en peces y anfibios que les permite detectar los movimientos del agua y los cambios de presión relativos al cuerpo del individuo (Dijkgraaf, 1962; Montgomery et al., 2000). Este sistema está involucrado en diferentes comportamientos tales como la reotaxis (movimiento de un organismo a favor o en contra de la corriente de agua), la detección de presas, la respuesta de escape ante amenazas y otros comportamientos sociales tales como el nado en cardúmenes y la danza de cortejo sexual (Bleckmann, 2008; McHenry et al., 2009; Oteiza et al., 2017; Partridge & Pitcher, 1980; Suli et al., 2012).

La LL está constituida por tres componentes principales: 1- los neuromastos (NMs), órganos que constituyen la unidad sensorial funcional del sistema y son los encargados de la transducción de la señal mecánica a eléctrica, 2- el sistema de inervación aferente, el cual recolecta e integra la información eléctrica proveniente de los NMs y la transmite hacia

centros superiores de procesamiento en el cerebro medio, y, 3- el sistema de inervación eferente, implicado en la modulación sensorial y constituido por neuronas cuyos somas se encuentran en áreas centrales y proyectan sus axones hacia la periferia. El sistema de LL está subdividido en dos sistemas conforme a su ubicación: la línea lateral anterior (LLA) (posicionado mayormente en la cabeza) y la línea lateral posterior (LLP) (que se extiende a través de la línea media hasta la cola) (Metcalfe, 1989; Raible & Kruse, 2000) (Figura 1). En el pez cebra, a los 7 días después de la fecundación (dpf), la LLP está formada por 14 NM: 8 primarios y 6 secundarios (Kimmel et al., 1995; Metcalfe, 1985; Pujol-Martí & López-Schier, 2013; Sarrazin et al., 2010). Los NM primarios y secundarios de la LLP poseen diferente sensibilidad en la detección de la direccionalidad del movimiento del agua debido a que poseen distintos ejes de polaridad. Mientras que los NM primarios son sensibles a movimientos en dirección del eje antero-posterior, los NM secundarios responden al eje dorso-ventral (planos de simetría paralelo y perpendicular al cuerpo del pez, respectivamente) (López-Schier et al., 2004) (Figura 1). En consecuencia, la eficiencia en la detección de señales del entorno está dada por una fina regulación entre la activación de células sensoriales dentro del NM, seguido por una estereotipada inervación de las neuronas aferentes (NAs) encargadas de transmitir la información según la dirección de los movimientos del agua.

Neuromastos

Las unidades funcionales sensoriales de la LL son los NM. Están ubicados de manera discreta a lo largo del cuerpo del pez y se posicionan superficialmente en la epidermis en estadios larvales. En su centro, poseen células ciliadas (CCs) mecanosensoriales encargadas de la transducción de señales mecánicas a eléctricas. En su zona apical, las CCs poseen un arreglo de estereocilios pequeños ubicados en forma de escalera compuestos por actina, unidos a un único cilio verdadero denominado cinocilio, compuesto

por tubulina. Estas estructuras están inmersas en una sustancia gelatinosa compuesta de glicosaminoglicanos denominada cúpula (McHenry & Van Netten, 2007). Este haz de cilios tiene la capacidad de deflectarse como consecuencia de las ondas mecánicas del medio externo, funcionando como un sensor de movimiento del agua. Por otro lado, en la zona basal de las CCs se encuentra la maquinaria sináptica de las inervaciones aferente y eferentes.

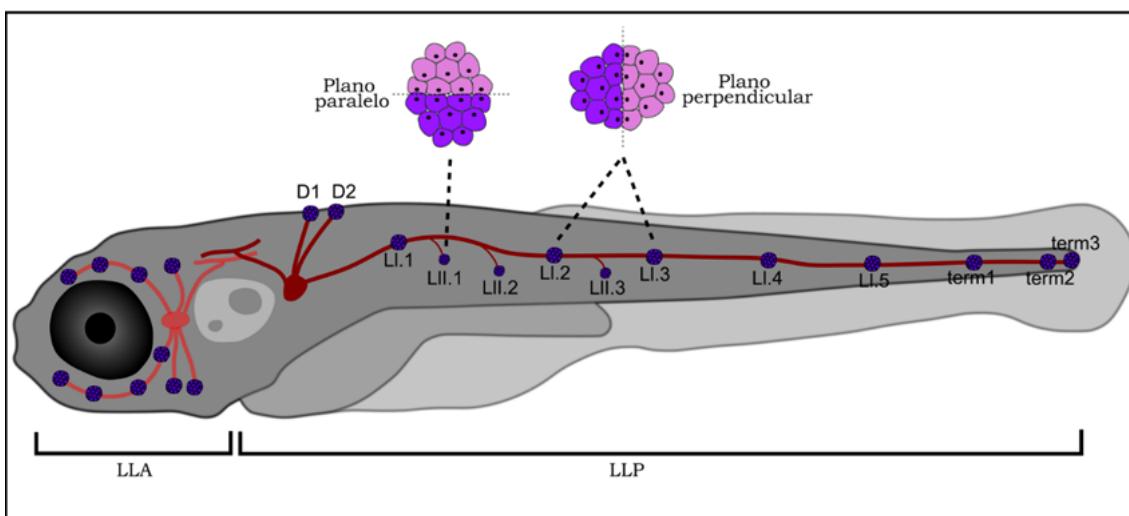


Figura 1: Esquema representativo de una larva de pez cebra de 5 dpf. Se observa el sistema de línea lateral anterior (LLA) y el sistema de línea lateral posterior (LLP). En violeta se representan los NM ubicados en la cabeza y a lo largo del cuerpo. Dentro del sistema de LLP se observan 8 NM primarios (LI.1 – LI.5 y term1 – term3), 3 secundarios (LII.1 – LII.3) y 2 NM dorsales (D1 – D2). Se muestran en detalle los ejes de polaridad de los NM desde una vista dorsal del mismo. Los NM con plano de simetría perpendicular responden a fluctuaciones en el eje antero-posterior y los que presentan plano paralelo responden a fluctuaciones en el eje dorso-ventral.

Rodeando a las CCs se encuentran dos poblaciones de células accesorias no sensoriales: las células del manto y las células de soporte. Las células del manto forman una única lámina celular que cubre la superficie apical de las CCs, permitiendo la salida de los cinocilios a través de una abertura en el centro del NM y son las encargadas de secretar las sustancias que componen la cúpula. Las células de soporte se encuentran en zonas más profundas dentro del NM, en contacto con las CCs de manera interdigitada y participan en el mantenimiento del sistema. Ambos tipos celulares están implicados en mecanismos de diferenciación y proliferación de precursores de nuevas CCs (Hernández et al., 2007).

Transducción mecanoeléctrica

El cinocilio posee una mayor longitud que el resto de los estereocilios, siendo de aproximadamente 30 μm de altura. Está formado por una estructura similar a los flagelos encontrados comúnmente en eucariotas, con un arreglo de 9 + 2 microtúbulos con brazos de dineína dispuestos de manera radial y en la parte más externa. En cambio, los estereocilios están compuestos por haces de actina (Fawcett, 1961; Flock & Duvall, 1965; Kindt et al., 2012). Los cinocilios están ubicados asimétricamente y están interconectados con los estereocilios más altos por estructuras filamentosas denominadas “*tip links*” (Pickles & Osborne, 1984). Esto hace que los estereocilios participen activamente en la transducción de la señal, mientras que el cinocilio participa de manera pasiva (Hudspeth & Jacobs, 1979). Gracias a sus propiedades de viscosidad, elasticidad y longitud, la cúpula protege y une el arreglo de cilios de tal manera que todas las CCs del mismo NM estén sometidas exactamente al mismo estímulo (Van Trump & McHenry, 2008). Cuando se presenta una onda mecánica o el pez realiza algún movimiento, el cinocilio se desplaza en dirección al movimiento y los estereocilios unidos a él giran alrededor de su sitio de inserción. Como consecuencia, se abren canales mecanosensoriales, ubicados en la zona apical de cada uno de los estereocilios, por los cuales entran iones del medio externo. La entrada de iones resulta en la despolarización de la CC, seguida por la transmisión río abajo de esa señal a las NAs. De esta manera, ocurre la mecanotransducción, es decir, la conversión de energía mecánica en señales eléctricas. La excitación de las CCs ocurre particularmente en una sola dirección, y se lleva a cabo solo cuando el arreglo de cilios se deflecta hacia los estereocilios más altos (Flock & Wersäll, 1962) (Figura 2).

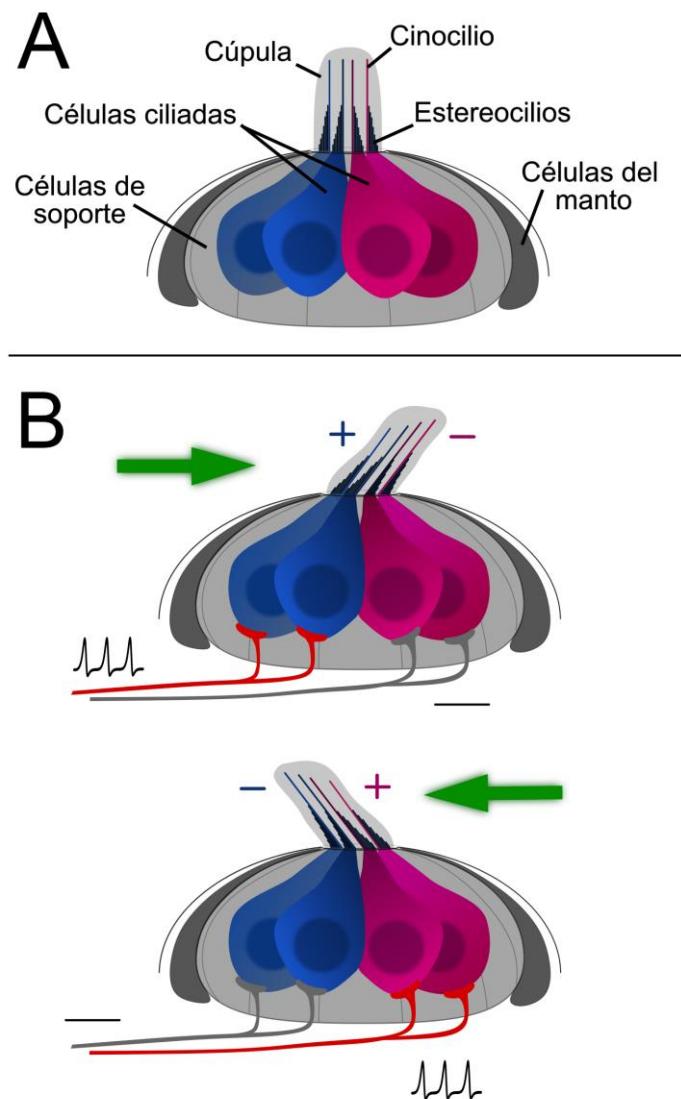


Figura 2: Esquema representativo de un corte transversal de un NM en vista lateral. (A) Se muestran los tipos celulares y estructuras que lo componen. El diagrama muestra a las células ciliadas (CCs) en dos colores diferentes, los cuales identifican las polaridades opuestas (azul y rosa). Las células de soporte (gris claro) se encuentran rodeando a las CCs. En la periferia del NM, y rodeando a las células de soporte, se encuentran las células del manto (gris oscuro). Los cinocilios se representan como estructuras largas y únicas dentro de cada CC. Unidos a los cinocilios se encuentran los estereocilios. Ambas estructuras están embebidas dentro de la cúpula. El cinocilio, los estereocilios y la cúpula están en contacto directo con el medio externo. (B) Diagrama de un NM reconociendo la direccionalidad de la corriente del agua (flecha verde). Se observan los cilios siendo deflectados a causa de las ondas mecánicas del agua. Dicha deflexión tiene como consecuencia que las CCs se activen o inhiban diferencialmente. La transducción de señal se da desde las CCs a las NAs. Los colores rojo y gris en las NAs en B representan la activación o la inhibición de la NA.

Inervación de los neuromastos de la línea lateral

En los peces adultos existen dos tipos de NMs: los de canal y los superficiales. Los neuromastos de canal se encuentran insertos en canales óseos debajo de las escamas del pez, están compuestos por cientos de CCs y son sensibles a la aceleración del flujo (Van Netten, 2006). Por su parte, los neuromastos superficiales se encuentran, como su nombre lo indica, en la superficie del animal expuestos directamente al entorno y son sensibles a la velocidad del flujo (McHenry & Van Netten, 2007). En su estado larval, el pez cebra posee únicamente NMs superficiales (Ghysen & Dambly-Chaudière, 2007).

Cada NM superficial está compuesto por entre 10 y 20 CCs rodeadas por alrededor de 30 células de soporte (López-Schier & Hudspeth, 2006). Los NMs de la LL exhiben un patrón de inervación simple y estereotipado donde varios grupos de neuronas establecen conexiones sinápticas en un espacio restringido. Cada NM es inervado por al menos dos NAs, donde cada una de ellas establece sinapsis con CCs de igual polaridad y, en consecuencia, divide al NM en compartimentos funcionales con un plano de simetría. La transducción de la señal aferente ocurre por medio de una sinapsis glutamatérgica de tipo “en cinta” (Faucherre et al., 2009; Nagiel et al., 2008). Por otro lado, las CCs también establecen conexiones sinápticas directas con neuronas eferentes colinérgicas (AChNEs) (Bricaud et al., 2001). Por último, se ha reportado la presencia de neuronas eferentes dopaminérgicas (DNEs), las cuales liberan sus vesículas de manera paracrína cumpliendo un rol modulatorio sobre la presinapsis en las CCs (Toro et al., 2015) (Figura 3).

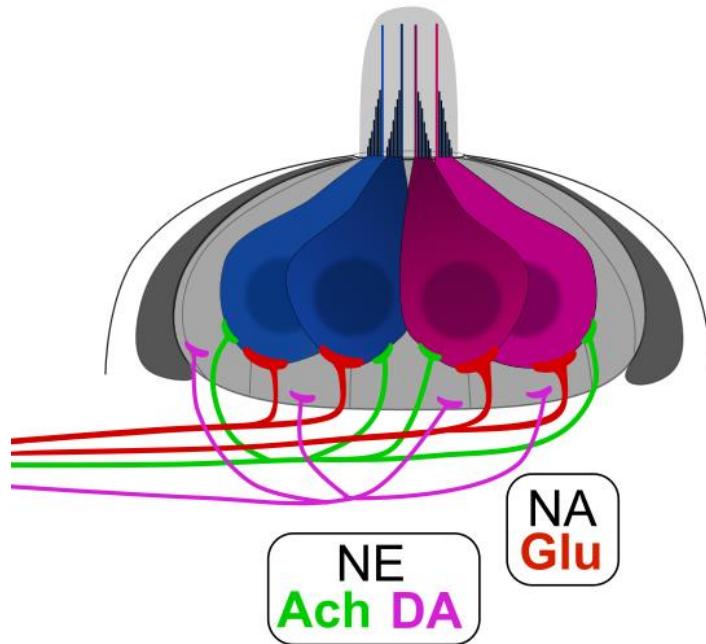


Figura 3: Diagrama de un NM en vista lateral exhibiendo las neuronas que lo contactan. Las CCs de distintos colores corresponden a polaridades opuestas (azul y rosa). Los NM son inervados por al menos 2 NAs (rojo), donde cada una de ellas establece contactos postsinápticos con CCs de igual polaridad. La sinapsis aferente es glutamatérgica excitatoria. Las NEs modulan las respuestas sensoriales mediante la liberación de acetilcolina (ACh, verde) o dopamina (DA, magenta). Las AChNEs establecen contactos sinápticos sobre las CCs, mientras que las DNEs liberan sus vesículas de manera paracrína. La modulación llevada a cabo por las AChNEs es inhibitoria, mientras que la llevada a cabo por las DNEs es excitatoria.

Desarrollo de los neuromastos

La LLP se origina como un conjunto de células inmaduras llamado placoda que se forma donde se va a ubicar el ganglio posterior de la LL (pLLg). Esta placoda comienza a diferenciarse en una parte anterior y otra posterior a las 18 - 20 hpf (Kimmel et al., 1995). Se divide rápidamente en un pequeño compartimento anterior de aproximadamente 20 células que se diferenciarán en neuronas sensoriales, y un compartimento grande de aproximadamente 100 células que forman el primer primordio (PrimI) de la PLL. A las 20 hpf, el PrimI comienza a migrar hacia el extremo caudal, depositando cinco grupos de células a lo largo de la línea media del pez, llegando a la cola antes de las 40 hpf. A medida que migra, es acompañado por axones de las NAs, los cuales se extienden desde el pLLg

(Gilmour et al., 2004; Metcalfe, 1985). Las células depositadas por el PrimI se denominan protoneuromastos y están compuestos aproximadamente por 20 células que se diferenciarán en los distintos tipos celulares que componen a los NMs primarios. Este proceso de desarrollo, entonces, es coherente con la llegada de las primeras NAs formadas a los NMs más caudales. Otros dos primordios comienzan a migrar cuando el PrimI ha llegado a la zona más caudal del pez: el segundo primordio (PrimII) y el primordio dorsal (PrimD). De manera similar, aunque más lenta, el PrimII y el PrimD formarán los NMs secundarios y dorsales, respectivamente (Ghysen & Dambly-Chaudiere, 2007; Sapede et al., 2002).

La proliferación de los primordios está guiada por una fina señalización molecular para lograr la correcta diferenciación celular y morfogénesis. La migración está determinada por interacciones entre las vías de señalización Wnt/β-catenina y FGF. Wnt se expresa en el extremo líder del primordio estimulando la inhibición de FGF, generando un gradiente de expresión diferencial entre estas moléculas y manteniendo la polaridad del primordio (Aman & Piotrowski, 2008). Además, cambios en la expresión de E-cadherina y N-cadherina generan una diferencia de comportamiento de las células de estático a migratorio. Mientras que los primordios migran, la vía Wnt/β-catenina mantiene a una población de células con capacidad proliferativa en el extremo que lidera la migración (ya que es un sistema que va perdiendo células a través de la deposición) y coordina una maduración progresiva de las células que formarán los protoneuromastos (Chitnis et al., 2011).

Una vez depositado el protoneuromasto, la diferenciación en polaridades opuestas de nuevas CCs está mediada, en parte, por el circuito de inhibición lateral de la vía de señalización de Notch (Matsuda & Chitnis, 2010). Luego del proceso de mitosis, las células hermanas recién formadas experimentan una serie de reordenamientos estereotipados en sus posiciones relativas. La CC ubicada más anteriormente desarrolla un cinocilio sensible a la estimulación anteroposterior y la hermana ubicada posteriormente extiende un haz que responde al movimiento posteroanterior del agua. De esta manera, dos CCs con diferente polaridad se originan a partir de una misma célula precursora. Al día de la fecha se sabe

que las proteínas Vangl2 y Emx2 son claves para el correcto desarrollo de la simetría de polaridades. Estudios recientes mostraron que peces *knockout*(KO) para la proteína Vangl2 poseen CCs con polaridades determinadas azarosamente (Dow et al., 2018; Lopez-Schier & Hudspeth, 2006). Por otro lado, otro estudio demostró que existe una expresión diferencial de Emx2 en las células precursoras de las CCs, y que su expresión induce el establecimiento de una polaridad que responde al flujo en dirección anteroposterior (Jiang et al., 2017). La mitad de las CCs de un NM exhibe marcación positiva para Emx2, y esto, además, tiene implicancias en la inervación diferencial de las NAs (Ji et al., 2018).

En resumen, los NMs forman la estructura anatómica esencial para la mecanotransducción en la LL. La disposición asimétrica y opuesta de las CCs, respetando un eje de simetría, contribuye a la polarización intrínseca del NM, que es una característica fundamental que determina la sensibilidad a la dirección del estímulo. Además, la interacción de la cúpula con el entorno hidrodinámico local funciona como un filtro que, por un lado, protege a las estructuras ciliares y, por otro, modula y converge la información que provee la dirección de las corrientes, dando como resultado, una eficiente deflexión del haz de cilios de manera diferencial.

CÉLULAS CILIADAS

Sistema auditivo y vestibular

Como se mencionó anteriormente, las CCs son el primer eslabón de la cadena de transducción de la información sensorial en señales eléctricas, que luego serán transmitidas a vías centrales superiores para su posterior integración. Sin embargo, la LL no es el único sistema con esta particularidad. En el oído interno de mamíferos, la cóclea y el aparato vestibular también están compuestos por epitelios sensoriales que poseen CCs y juegan un

rol crucial en la audición y el balance, respectivamente. Dentro de la cóclea se encuentra el órgano de Corti, cuyas CCs funcionan como receptores de vibraciones acústicas y se dividen en células ciliadas internas (CCI) y células ciliadas externas (CCE) (Dallos, 1992). Estas CCs cuentan con estereocilios de actina que se encuentran en contacto con la membrana tectorial y están rodeados de una solución con una alta concentración de potasio (K^+) llamada endolinfa. Por otro lado, en el aparato vestibular existen dos epitelios sensoriales: la mácula y la crista. La mácula está localizada en elutrículo y el sáculo, mientras que la crista se encuentra al final de los tres canales semicirculares. Las CCs ubicadas en elutrículo son sensibles a los movimientos en el plano horizontal, mientras que aquellas ubicadas en el sáculo son sensibles al movimiento en el plano vertical. Dentro de la mácula, las CCs están cubiertas por una membrana gelatinosa que contiene pequeñas partículas de carbonato de calcio llamadas otolitos. La crista, posee CCs que son sensibles a la aceleración angular. Si bien es histológicamente similar a la mácula, la crista carece de otolitos y está cubierta por una cúpula gruesa. La membrana tectorial de la cóclea, la membrana otolítica de la mácula y la cúpula de la crista funcionan como una estructura que logra una sincronización macromecánica de los haces ciliares (Burns & Stone, 2017; Day & Fitzpatrick, 2005; Quian et al., 2022; Khan & Chang, 2013) (Figura 4).

Por su parte, el pez cebra tiene su propia estructura auditiva y vestibular: la vesícula ótica. Aunque esta estructura carece de compartimentos, como el oído interno de mamíferos, posee cinco agrupaciones de CCs, en espacios bien discriminados, denominadas mácula y crista. La mácula utricular y sacular, detectan la aceleración lineal del movimiento. Se ha demostrado que la mácula utricular es responsable de la función vestibular mientras que la mácula sacular es el órgano auditivo (Riley & Moorman, 2000; Yao et al., 2016). La crista anterior, lateral y posterior, detectan movimientos a causa de la rotación de la cabeza. Al igual que en mamíferos, en la mácula los haces ciliares son desplazados por los otolitos, mientras que en la crista los cilios están en contacto con la endolinfa (Quian et al., 2022).

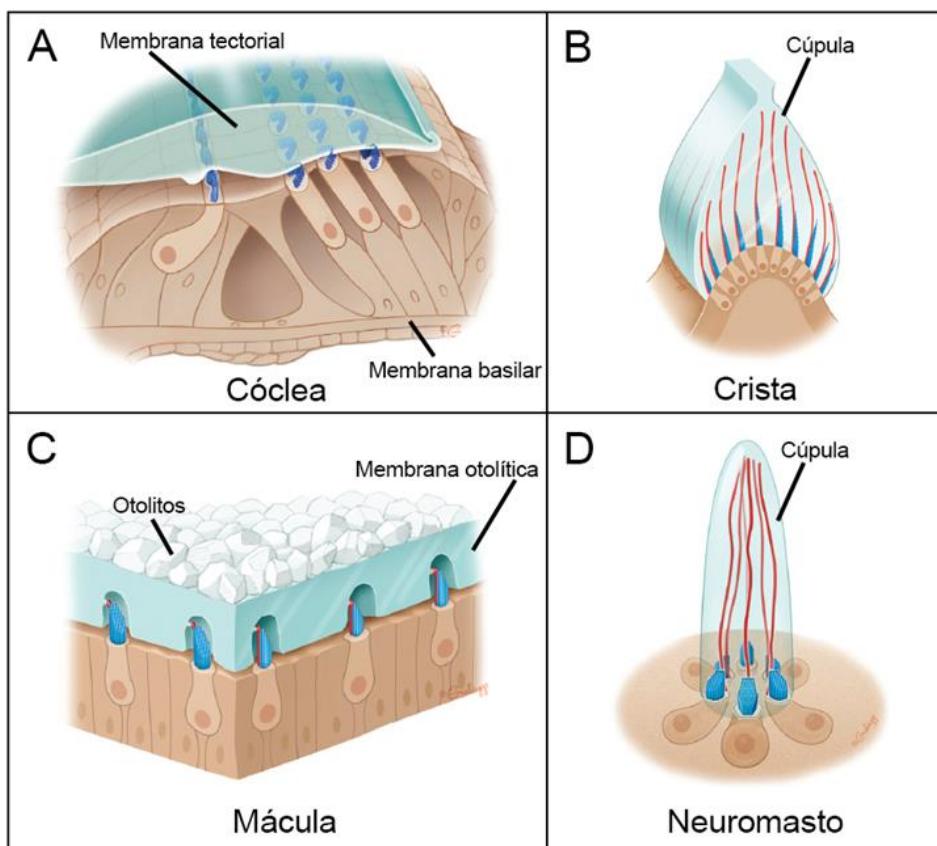


Figura 4: Diferentes epitelios sensoriales tienen en común la funcionalidad de las CCs como transductor principal de señales mecánicas. (A) En el sistema auditivo de mamíferos, las ondas originadas por cambios de presión del aire se transmiten a través de un ambiente acuoso dentro de la cóclea. Las vibraciones concluyen en el movimiento de la membrana basilar, donde se posa el órgano de Corti. Como resultado, los estereocilios de las CCs se deflectan sobre la membrana tectorial, permitiendo la apertura de los canales mecanosensoriales. (B-C) En el caso del sistema vestibular, todas las CCs poseen sus estereocilios de actina unidos a un cinocilio (representado en rojo) (B) En la crista, los movimientos de aceleración rotacional causan un desplazamiento de la endolinfa, en la cual está embebida la cúpula, en la dirección opuesta a la rotación. La cúpula se desplaza sobre una membrana y como consecuencia se produce la despolarización de las CCs. (C) En la mácula, es la membrana otolítica la cual se desplaza sobre los haces ciliares, logrando una señal sincronizada. (D) En los neuromastos, los movimientos del agua generan el desplazamiento de la cúpula, lo que, a su vez, lleva al movimiento de los haces ciliares de las CCs. Cada una de estas configuraciones estructurales proveen una diferenciación mecánica de la transducción de la señal en las CCs (Imagen adaptada de Maoiléidigh & Ricci, 2019).

Transducción mecanoeléctrica

Las CCs son las estructuras principales en la transducción de las señales mecánicas a señales eléctricas en todos los sistemas donde tienen participación. En la zona apical, las

CCs tienen una estructura altamente especializada, que consiste en un haz de estereocilios dispuestos en filas de altura creciente. Cada estereocilio tiene un núcleo densamente poblado de filamentos de actina que le proporciona estabilidad y rigidez. Por esa razón, al recibir un estímulo mecánico, en lugar de doblarse, gira alrededor de su sitio de inserción. La rigidez que exhibe el haz de cilios es proporcional al número de estereocilios que presenta (Crawford & Fettiplace, 1985; Howard & Ashmore, 1986). Adyacente al estereocilio más alto se encuentra el cinocilio, un cilio verdadero compuesto por haces de microtúbulos con un arreglo 9 + 2 (Figura 5A). Como consecuencia del arreglo particular que presentan estas estructuras, de la asimetría e interconectividad de los haces ciliares y de la rigidez intrínseca de la estructura que se comporta como una unidad (Kozlov et al., 2007), el haz de cilios concede a las CCs propiedades óptimas para su excitabilidad en función de las señales mecánicas.

La excitación de una CC sucede en una sola dirección, cuando los haces ciliares son empujados por una señal mecánica en dirección de los cilios más largos. Los cilios están interconectados horizontalmente por filamentos que son conocidos como “*tip links*”. La deflexión de los haces ciliares en el eje excitatorio tiene como consecuencia el incremento de la tensión de estos filamentos y resulta en la apertura de canales mecanotransductores (MET), ubicados en la punta de los estereocilios (Basu et al., 2016) (Figura 5B). Por el contrario, las deflexiones con dirección opuesta al cilio más largo resultan en la inhibición de la CC. El nivel de tensión que se ejerce sobre el *tip link* tiene como consecuencia la apertura de los MET, como un mecanismo de tipo “resorte”. La amplitud de la corriente entrante de iones depende de la intensidad del estímulo: cuanto mayor sea el desplazamiento de los cilios, mayor será la despolarización de la CC (Howard & Ashmore, 1986).

Los *tip links* están compuestos por dos homodímeros de cadherina 23 (Cdh23) y de protocadherina 15 (Pcdh15) conectados. Estos se asocian para formar filamentos que conectan de manera adyacente y extracelular a los estereocilios (Kazmierczak et al., 2007; Siemens et al., 2004). Se ha demostrado que la delección de alguno de los genes que codifican a estas proteínas tiene como resultado la ausencia absoluta de la respuesta

mecanosensorial evocada por un estímulo (Kindt et al., 2012). *Pcdh15* se ubica en la parte inferior del *tip link*, es decir, sobre el estereocilio más corto, y está asociada a otras proteínas formando el complejo canal encargado de la transducción mecanoeléctrica (Figura 5C). En humanos, se han reportado mutaciones en genes relacionados con el desarrollo y la estructura de los cilios que tienen como consecuencia desórdenes del equilibrio e hipoacusia. Entre ellas, proteínas del citoesqueleto relacionadas con el anclaje del *tip link* y moléculas que colaboran con la formación del canal MET (Caprara & Peng, 2022).

El canal MET se caracteriza por ser un canal catiónico inespecífico con un tamaño de poro inusualmente grande y una alta conductancia y permeabilidad a iones (Beurg et al., 2006). En mamíferos, el fluido extracelular que baña los cilios, conocido como endolinfa, posee altas concentraciones de K^+ . Debido a la diferencia en su potencial de equilibrio, el influxo de este ion lidera la despolarización de las CCs. Esta despolarización, sin embargo, no resulta en el disparo de potenciales de acción, sino que tiene como consecuencia un cambio regulado en el potencial de membrana, que activa la liberación de vesículas glutamatérgicas hacia el medio extracelular en la zona basal (Nicolson, 2017).

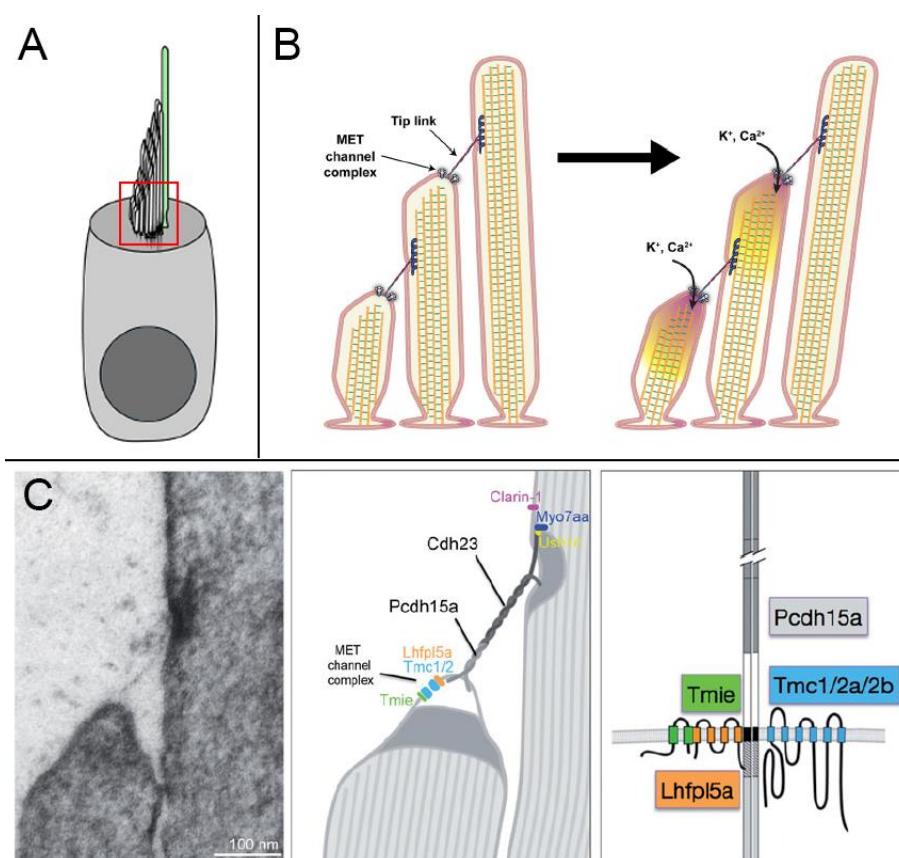


Figura 5: (A) Representación esquemática de una CC del aparato vestibular. En la zona apical se observa el haz de cilios de actina (estereocilios) y un cinocilio de tubulina, ubicados de manera asimétrica. El cuadrado rojo muestra la localización del esquema en B. (B) Los haces ciliares se encuentran unidos por filamentos que forman el *tip link*. La tensión mecánica dada por un estímulo en dirección al cinocilio abre canales mecanostractores (MET) permitiendo el influxo de cationes. Esto despolariza la célula desde la zona apical (los colores dentro de los haces ciliares representan un aumento local en la concentración de cationes). (C) Izquierda: Micrografía electrónica de transmisión en la zona apical de un *tip link*, en una CC de la mácula del pez cebra. Centro: Esquema de los componentes moleculares que participan de la transducción. Se observan la Cdh23 y la Pcdh15 formando homodímeros conectados entre sí. A su vez, la Pcdh15 está conectada a un complejo proteico que contiene el canal MET. Derecha: Proteínas de membrana asociadas a Pcdh15 que son cruciales para el funcionamiento del complejo. TMC1/2 son necesarias para la formación del poro (Jia et al., 2020), TMIE es una subunidad esencial del canal ya que TMC1/2 no pueden asociarse sin ella (Cunningham et al., 2020; Pacentine & Nicolson, 2019). Lhfpl5a participa en la estabilización de TMC1 y la disrupción de esta proteína causa déficit auditivo y vestibular (Erickson et al., 2020). Imágenes adaptadas de: (A-B) Caprara & Peng, 2022; (C) Nicolson, 2017.

INERVACIÓN AFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL

La transducción de las señales sensoriales desde las CCs hacia las NAs de la LL involucra mecanismos notablemente similares a aquellos presentes en las CCI de mamíferos. Consta de dos procesos diferentes: la transducción mecanoeléctrica y la electroquímica. Mientras que la transmisión mecanoeléctrica depende directamente de las características de los haces ciliares, los cuales permiten la entrada de iones y posterior cambio de voltaje en la membrana de las CCs, la transducción electroquímica está liderada por la presencia de la sinapsis en cinta en la zona basal de las CCs. La sinapsis en cinta responde a un amplio rango de intensidades de estímulos, y es por ello que está presente en varios sistemas sensoriales como las CCs mecanosensoriales del aparato auditivo y vestibular (mamíferos, peces y anfibios), los fotorreceptores y células bipolares del aparato visual y en células de la glándula pineal.

La zona activa presináptica contiene estructuras electrónicamente densas, denominadas “*ribbon*”, formadas, principalmente, por la proteína *Ribeye*. Las *ribbon* presentan una

monocapa de vesículas sinápticas cargadas con glutamato, altamente empaquetadas por el transportador Vglut3 (Lenzi et al., 1998; Matthews & Fuchs, 2010; Obholzer et al., 2008). Estos cuerpos densos se encuentran anclados en la membrana basolateral de las CCs, adyacentes a grupos de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo L 1.3 ($\text{Ca}_v1.3$). La activación de los canales $\text{Ca}_v1.3$ presinápticos resulta en una despolarización local, seguido por una exocitosis gradual y coordinada de glutamato. Se ha reportado la existencia de asociaciones de vesículas listas para ser liberadas o RRP (del inglés “*readily releasable vesicle pool*”) que participan en la transmisión sincronizada rápida. Las *ribbon* estabilizan las RRP en la zona activa, y cuando se presenta una despolarización local en un microdominio cercano, el sistema responde liberando un gran número de vesículas. Inicialmente, la exocitosis ocurre con una tasa de liberación alta que se va ralentizando luego de un par de milisegundos. Esta desensibilización parcial de la respuesta sucede luego de la depleción de aproximadamente 80 vesículas luego del estímulo (Olt et al., 2014). Recientemente se ha demostrado que, durante estímulos mayores a 100 ms y luego de agotarse las RRP, comienzan a liberarse vesículas secundarias o SCP (del inglés “*secondary releasable vesicle pool*”) con una cinética más lenta (De Faveri et al., 2021). Si bien el número de vesículas es más bajo que aquellas que se liberan en la CCI de la cóclea (aproximadamente 280 vesículas) (Moser & Beutner, 2000; Obholzer et al., 2008), el glutamato liberado provoca una magnitud de respuesta similar en ambos sistemas (Olt et al., 2014).

Si bien este mecanismo está altamente conservado a lo largo del linaje de vertebrados, hay ciertas diferencias estructurales y funcionales con los mamíferos. En peces y anfibios las *ribbon* son esféricas, cada CC posee entre 3 y 5 *ribbon* (Obholzer et al., 2008), y una sola presinapsis puede estar compuesta por 1, 2 y hasta 3 *ribbon* asociadas a una sola densidad postsináptica (Sheets et al., 2012). La proteína *Ribeye*, no solo es la proteína principal en la zona activa presináptica, sino que es la encargada de organizar a los demás componentes del complejo *ribbon*. Es una variante de *splicing* del correpresor transcripcional CtBP2, que es exclusivo del linaje de vertebrados (Schmitz et al., 2000). Uno de sus dominios contiene un sitio de unión a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+/NADH) y está involucrado

tanto en la oligomerización de la proteína *Ribeye* (Schmitz et al., 2000) como en el metabolismo mitocondrial (Srivastava, 2016).

El *knockdown* de *Ribeye* provoca la ausencia de reclutamiento de los canales $\text{Ca}_v1.3$ en la zona activa. En contraposición, la sobreexpresión de dicha proteína resulta en cuerpos densos ectópicos (inclusive en la zona apical de la CC), cada uno acompañado por canales $\text{Ca}_v1.3$ (Sheets et al., 2011). Por otro lado, la presencia y función de canales $\text{Ca}_v1.3$ regula el tamaño y la forma de los cuerpos densos. Durante el desarrollo de la CC, *Ribeye* se visualiza como pequeños puntos alargados en el citosol que, a lo largo de la maduración de la célula, se fusionan formando un solo cuerpo denso esférico (Sheets et al., 2011; Yu & Goodrich, 2014). En el pez cebra, mutaciones en $\text{Ca}_v1.3$ generan alargamiento de las estructuras y aumento del número de *ribbon* por sinapsis. También se observa un desacople entre la presinapsis y la densidad postsináptica (Sheets et al., 2012). La liberación de glutamato desde la zona activa de las CCs resulta en la entrada de Ca^{2+} en los terminales postsinápticos aferentes a partir de la activación de receptores ionotrópicos AMPA (Sebe et al., 2017) (Figura 6). Se ha reportado que, si bien la generación de las *ribbon* es independiente de la inervación aferente, esta es necesaria para el mantenimiento de la sinapsis, así como su localización, tamaño y número de *ribbon* por sinapsis (Suli et al., 2016).

Neuronas aferentes

Las NAs son las encargadas de transmitir la información hidrodinámica desde la periferia hacia el rombencéfalo. Son neuronas bipolares cuyos cuerpos celulares (o somas) se encuentran en el pLLg, ubicado posterior a la vesícula ótica. Desde los somas se entienden dos axones: uno que proyecta hacia áreas centrales y otro hacia la periferia. Los axones centrales de las NAs inervan el núcleo octavolateral medial (NOM) ipsilateral en el rombencéfalo, y los axones periféricos se extienden a través de la línea media del pez e inervan a los NM.

Sinapsis aferente

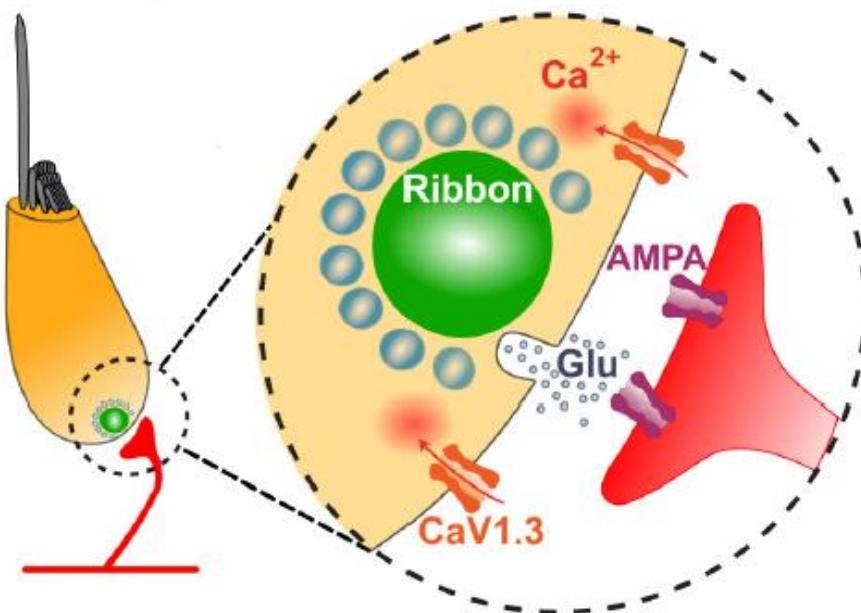


Figura 6: Inervación aferente de la LL del pez cebra. Se observa una CC inervada por un botón postsináptico correspondiente a una NA. De manera ampliada se muestra un diagrama de las diferentes estructuras que forman parte de una zona activa en la sinapsis aferente. A causa de la deflexión de sus cilios, las CCs permiten el influxo de cationes a través de los canales MET. La despolarización de las CCs, activa los canales $CaV1.3$ presinápticos, permitiendo el influxo local de Ca^{2+} . Como consecuencia, se produce la fusión de vesículas de glutamato (círculos celestes), que se encuentran ancladas sobre un cuerpo denso denominado “ribbon” (círculo verde). El glutamato liberado activa canales AMPA presentes en las NAs. Imagen adaptada de Plazas & Elgoyhen, 2021.

La diferente polaridad que presentan las CCs dentro de cada NM no solo se manifiesta en la ubicación asimétrica del cinocilio y sus estereocilios asociados, sino que también en la inervación periférica de las NAs. Cada NM es inervado por, al menos, dos NAs, cada una formando sinapsis exclusivamente con CCs de la misma polaridad funcional (Dow et al., 2018; Faucherre et al., 2009; Nagiel et al., 2008). Este patrón de inervación asegura que la información eléctrica proveniente de los NMs llegue al cerebro de manera coherente con la dirección del movimiento del agua. De esta manera, la asimetría en la inervación aferente resulta en una discriminación direccional de la respuesta a nivel central.

El NOM recibe información no solo de la LLP, sino también de la LLA y del oído. Respeta una organización somatotópica con respecto a los *inputs* de la LL (Gompel et al., 2001)

(Figura 7). En el NOM, cada NA se bifurca para formar una rama posterior y una rama anterior estableciendo aproximadamente 60 contactos sinápticos con neuronas de segundo orden (Pujol-Martí et al., 2012). Un número limitado de NAs poseen, además, proyecciones centrales que convergen cerca de la dendrita lateral de las células de Mauthner, que comandan las respuestas rápidas de escape (Eaton et al., 1977). Dado que las NAs terminan en al menos dos regiones distintas del rombencéfalo, se ha sugerido la existencia de sistema funcional dimórfico. Un primer conjunto está compuesto por NAs grandes, de nacimiento temprano, que inervan múltiples NMs y se contactan con las células de Mauthner. Por otro lado, un segundo conjunto de NAs, más pequeñas, nacidas posteriormente, que inervan un único NM y proyectan al MON (Haehnel et al., 2012; Liao, 2010; Pujol-Martí et al., 2012). En este caso, las neuronas poseen campos receptivos más limitados y una mayor sensibilidad, lo que sería útil para detectar y localizar heterogeneidades más sutiles en el agua que rodea al animal. Se ha planteado la hipótesis de que las NAs y los NMs derivados del PrimI establecen un andamiaje sensorial inicial que permite detectar fluctuaciones gruesas (como detección de movimientos bruscos de posibles predadores), seguido de una segunda ola de CCs derivadas del PrimII, que permiten detectar flujos con mayor sensibilidad y resolución espacial (que le otorgan la capacidad de alimentarse y cazar) (Liao & Haehnel, 2012).

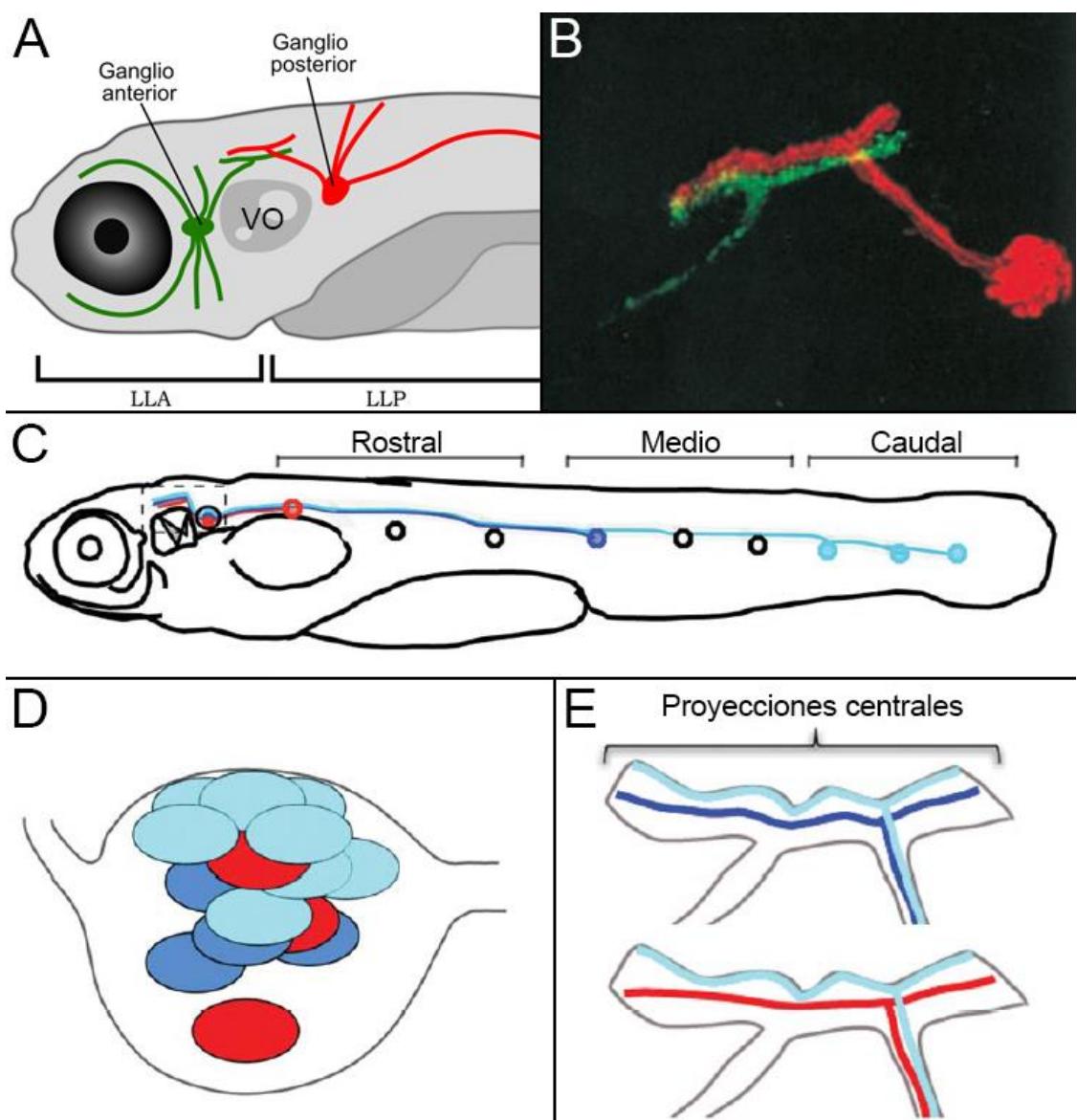


Figura 7: Organización somatotópica del sistema aferente de la LL. (A) Esquema donde se observa la ubicación de los ganglios anterior y posterior de la LL con respecto a la vesícula ótica (VO). El ganglio anterior se encuentra por delante de la VO (verde), mientras que el ganglio posterior se ubica por detrás (rojo). (B) Marcación diferencial de ambas proyecciones centrales (verde: anterior; rojo: posterior). Las NAs de la LLA proyectan hacia regiones más ventrales y aquellas de la LLP proyectan hacia regiones más dorsales. (C-E) Organización somatotópica del sistema aferente de la LLP. (C) Los NM s a lo largo del cuerpo se dividen en rostrales (rojo), mediales (azul) y caudales (celeste) (D) Los somas de los NM s caudales se ubican en la zona dorsal del ganglio, los mediales en la zona medial y los rostrales en las zonas ventral y medial. (E) Las proyecciones centrales de las NAs que inervan a los NM s caudales (celeste) proyectan hacia áreas dorsomediales del NOM, y las NAs que inervan a los NM s mediales y rostrales (azul y rojo) proyectan hacia áreas ventrolaterales en el NOM. Imágenes adaptadas de: (B) Alexandre & Ghysen, 1999; (C-E) Pujol-Martí et al., 2010.

Varicosidades en neuronas aferentes

En el estadio larval, la inervación aferente de la LLP y de la LLA está compuesta, en cada caso, por aproximadamente 60 NAs. Estas NAs presentan un campo receptivo restringido a la inmediata cercanía del NM inervado, pudiendo detectar la hidrodinámica local (Van Netten & McHenry, 2013). A través de la expresión de proteínas fluorescentes en NAs únicas, y realizando reconstrucciones tridimensionales a alta resolución de sus proyecciones centrales, se describió la arquitectura de las NAs a lo largo del desarrollo (Valera et al., 2021). Mediante el seguimiento en el tiempo, desde los 2 dpf hasta los 7 dpf, se observó que a los 5.5 dpf los árboles axonales centrales se encuentran estabilizados. Más aún, se reportó la presencia de varicosidades a lo largo de las ramas anterior y posterior, es decir, engrosamientos de las membranas donde se detecta mayor intensidad de fluorescencia por la acumulación de proteínas reporteras (Figura 8). Los autores encontraron que la mayoría de las varicosidades colocalizan con Sinapsina 1, proteína reclutada por la maquinaria presináptica de neuronas maduras, que regula la liberación de vesículas sinápticas a través de su fosforilación diferencial en sitios específicos (Valera et al., 2021). Este estudio en NAs del pez cebra es consistente con otros estudios realizados en los sistemas olfativo y visual, donde se ve correlación entre varicosidades presentes en las neuronas sensoriales y proteínas de la presinapsis (Edwards et al., 2007; Meyer & Smith, 2006).

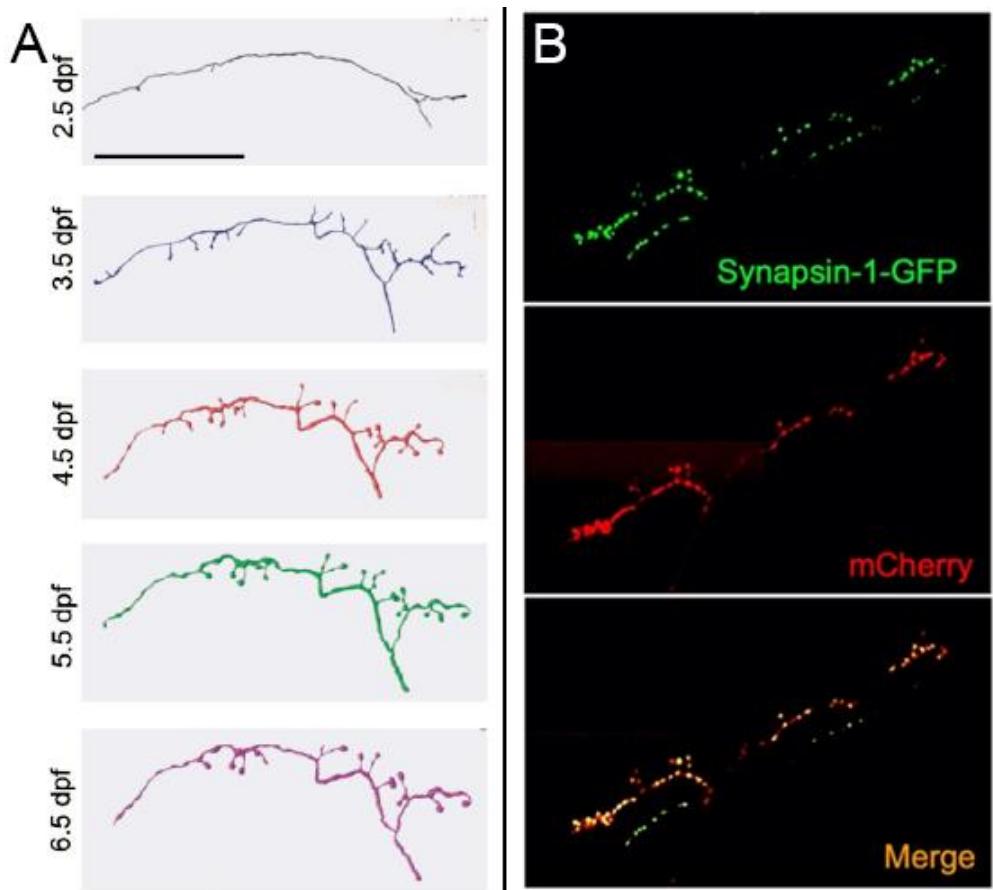


Figura 8: Varicosidades en las proyecciones centrales de NAs en el pez cebra. (A) Serie de reconstrucciones tridimensionales de una NA de la LLP desde los 2.5 hasta los 6.5 dpf. Se puede observar la aparición de varicosidades a los 3.5 dpf. Izquierdo: anterior; arriba: dorsal. Barra de escala: 50 μ m. (B) Vista lateral de la máxima proyección de una NA coexpresando la proteína presináptica Sinapsina1-GFP (verde), y la proteína reportera mCherry (rojo). Se muestra la colocalización de ambos fluoróforos (amarillo). Las NAs analizadas presentaron una colocalización promedio del 77%. Adaptado de Valera et al., 2021.

INERVACIÓN EFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL

Además de la inervación aferente, los NM s también son contactados por neuronas eferentes (NEs), cuyos somas se encuentran en el sistema nervioso central (SNC). Muchos sistemas sensoriales poseen una inervación eferente que modula la respuesta al estímulo sensorial. La inervación eferente puede cumplir varios propósitos. Uno de ellos es la retroalimentación inhibitoria, que reduce la respuesta al estímulo sensorial con el fin de proteger al sistema de la citotoxicidad resultante de la sobreestimulación. Encontramos, además, sistemas

eferentes de retroalimentación positiva que anticipan la estimulación sensorial debido a movimientos voluntarios e inhiben la respuesta a la estimulación. Por otra parte, algunos sistemas eferentes pueden ser excitatorios, reduciendo el umbral de respuesta a la estimulación, sensibilizando al sistema.

Núcleos eferentes

Estudios anatómicos en peces demostraron que los somas de las NEs de la LLP se localizan en tres núcleos en el SNC (Bricaud et al., 2001; Hashimoto et al., 1970; Metcalfe et al., 1985; Zottoli & Van Horne, 1983). El núcleo eferente octavolateral (OEN) es colinérgico y se ubica en el rombencéfalo. Está dividido en dos sub-núcleos más pequeños ubicados en la parte rostral y caudal (rOEN y cOEN) (Brantley & Bass, 1988; Meredith & Roberts, 1987; Odstrcil, 2018). El tercero es el núcleo diencefálico eferente de la línea lateral (DELL) ubicado en el hipotálamo ventral y responde a una señalización catecolaminérgica (Bricaud et al., 2001; Odstrcil, 2018; Tay et al., 2011; Toro et al., 2015) (Figura 9A).

Las neuronas del DELL se extienden de manera ipsilateral para inervar el oído interno, NM_s de la cabeza y la cola y a la médula espinal. Los axones de las AChNEs proyectan únicamente hacia las CCs del oído interno ipsilateral y los NM_s de la LLA y LLP. Cada neurona del OEN puede inervar una o varias de estas regiones al mismo tiempo, pero no se ha demostrado hasta el momento la existencia de una neurona que inerve únicamente al oído interno. Cabe destacar que los blancos celulares de las NEs pertenecientes a los diferentes sub-núcleos del OEN se superponen (Odstrcil, 2018). Observaciones hechas sobre las NEs del rOEN muestran que se encuentran, mayoritariamente, direccionadas sobre la LLA, lo que sugeriría una distribución topográfica en el rombencéfalo. Sin embargo, el cOEN se encuentra igualmente distribuido entre la LLP y la LLA, lo que implica que no hay una determinación clara de la ubicación de los NM_s inervados a partir de la posición de los somas en el rombencéfalo, lo cual, a su vez, sugiere que los mecanismos eferentes deben estar actuando de manera global. Sosteniendo esta teoría, existen reconstrucciones

a partir de imágenes de microscopía electrónica y marcaciones con proteínas fluorescentes que muestran que una única NE contacta a todas las CCs dentro de un mismo NM, independientemente de su polaridad (Bricaud et al., 2001; Dow et al., 2018; Faucherre et al., 2009; Nagiel et al., 2008; Odstrcil, 2018; Zhang & Kindt, 2022).

Se ha demostrado en larvas del pez cebra que todas las AChNEs del OEN se activan durante la actividad locomotora, independientemente de la posición de su soma. Además, la actividad en los diferentes sub-núcleos está altamente correlacionada, lo cual indica que el OEN puede considerarse un único núcleo en términos funcionales. El sistema eferente colinérgico es fundamental para distinguir entre estímulos provenientes del medio, es decir, exógenos y estímulos generados por el movimiento del propio organismo (Lunsford et al., 2019; Odstrcil, 2018; Pichler & Lagnado, 2020).

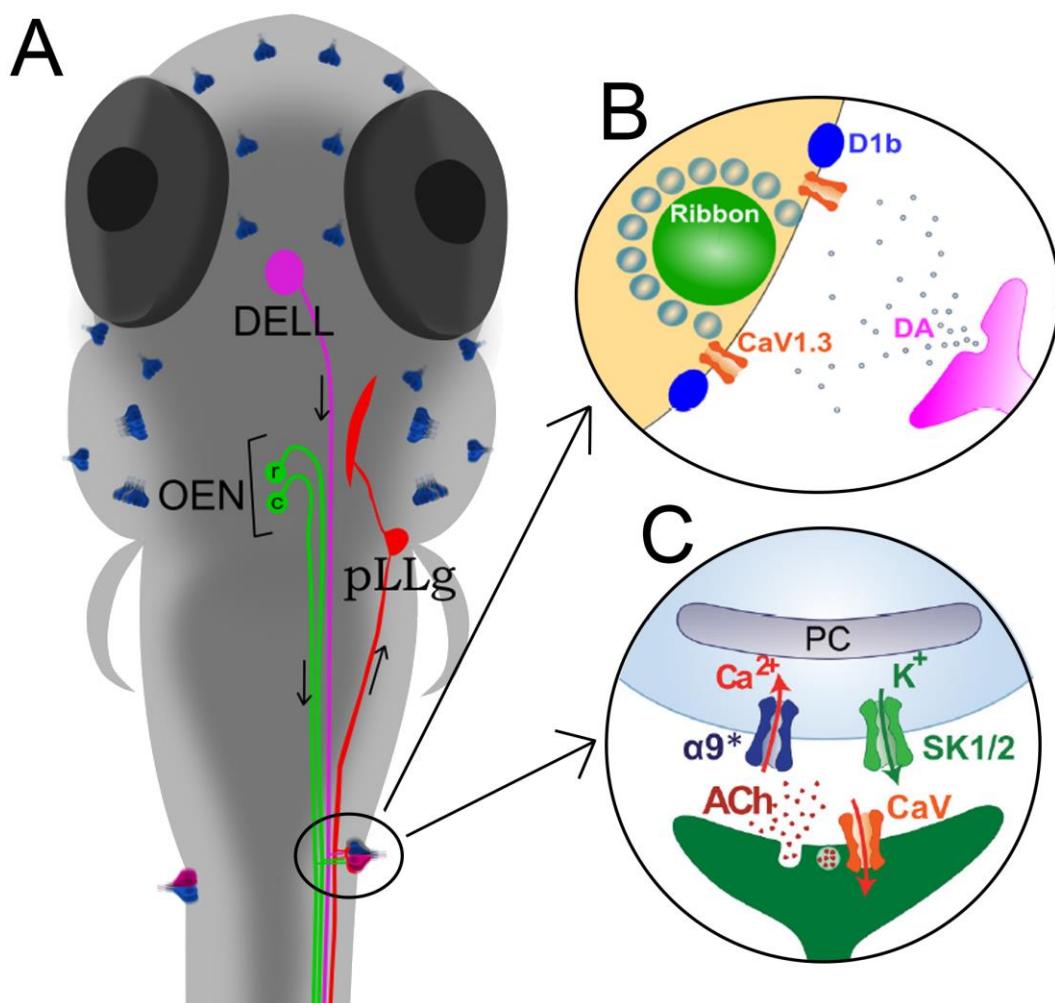


Figura 9: Inervación eferente en NMs de la LLP en el pez cebra. (A) Diagrama representativo en vista dorsal de una larva donde se observan las inervaciones tanto aferente como eferentes de la LLP. El comienzo de la transmisión de la señal se da en los NMs, donde las NAs llevan la información eléctrica al ganglio posterior (pLLg) de manera ascendente (representado en rojo). El pez cebra posee dos núcleos eferentes: 1- el núcleo diencefálico eferente (DELL) (representado en magenta); 2- el núcleo octavolateral medial (OEN) (representado en verde), que se subdivide en un núcleo caudal (cOEN) y uno rostral (rOEN). Las flechas negras muestran la dirección de la transmisión. (B) Sinapsis eferente excitatoria proveniente del DELL. Los terminales eferentes liberan dopamina (DA) de manera parácrina a las CCs, las cuales expresan el receptor D1b en la presinapsis aferente. La activación de los receptores D1b baja el umbral de la respuesta aferente, es decir, se produce un mayor influjo de Ca^{2+} por los canales $Ca_v1.3$ y una mayor liberación de glutamato a las NAs. (C) Sinapsis eferente inhibitoria proveniente del OEN. Los terminales eferentes contactan las CCs y liberan acetilcolina (ACh), la cual activa a los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) $\alpha 9$. Tras la apertura del canal $\alpha 9$ ingresa Ca^{2+} y Na^+ , que, a su vez, despolariza a la CC de manera local y activa a los canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes SK. El eflujo de K^+ conduce a la hiperpolarización de la CC, disminuyendo la sensibilidad al estímulo. (B-C) Imagen adaptada de Plazas & Elgoyhen, 2021.

Neuronas eferentes dopaminérgicas del DELL

Las NEs del DELL tienen terminales dopaminérgicos que inervan la parte basal del NMs donde se encuentran las células de soporte, sin hacer contacto directo con las CCs. Sin embargo, existen receptores dopaminérgicos D1b que están localizados junto a la *ribbon* en la presinapsis de las CCs. De esta manera, la transmisión sináptica aferente es regulada por estas neuronas de manera parácrina. Bajo el efecto de la DA sobre los receptores D1b, se intensifica la transmisión aferente desde las CCs al aumentar la actividad presináptica de los canales $Ca_v1.3$, llevando la detección del estímulo a un umbral más bajo (Toro et al., 2015) (Figura 9B). Aunque se ha demostrado que la actividad dopaminérgica se correlaciona con la actividad motora (Jay et al., 2015), se desconoce aún cuál es la función que cumple esta inervación sobre el sistema de LL. Se sugiere que una sensibilización del sistema podría ayudar al animal a ser más eficiente en su habilidad de caza o de escape ante la posible amenaza de predadores.

Neuronas eferentes colinérgicas del OEN

Por otro lado, el OEN está formado por neuronas colinérgicas que proyectan sus axones hacia la periferia y contactan directamente con las CCs (Dow et al., 2018). La sinapsis eferente colinérgica en el pez cebra comparte similitudes moleculares, estructurales y funcionales con aquella del oído interno de mamíferos. La sinapsis eferente colinérgica olivococlear medial (MOC) sobre las CCE (y las CCI en el desarrollo) está mediada por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyheng et al., 2001). El influjo de Ca^{2+} a través de este receptor activa los canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes SK2 (Dulon et al., 1998; Nenov et al., 1996; Nie et al., 2004; Yamamoto et al., 1997).

En el pez cebra, se ha reportado la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 9$ en CCs de la LL, pero no se ha encontrado expresión de la subunidad $\alpha 10$ (Carpaneto et al., 2021). Además, experimentos de secuenciación de ARNm (ARNseq) revelaron que el transcriptoma de las CCs de LL se encuentra enriquecido por la expresión de *chrna9*, gen que codifica a la subunidad $\alpha 9$ (Erickson & Nicolson, 2015; Lush et al., 2019; Matern et al., 2018; Steiner et al., 2014). Estos resultados sugieren fuertemente que la sinapsis eferente colinérgica en CCs de la LL está mediada por el nAChR $\alpha 9$ homomérico (Carpaneto et al., 2021).

Estudios en sistemas heterólogos han caracterizado las propiedades funcionales y farmacológicas de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 9$ homomérico. Los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de mamíferos presentan una modulación por Ca^{2+} extracelular bifásica: potenciación a concentraciones micromolares de este ion y un bloqueo voltaje-dependiente a concentraciones milimolares (Gómez-Casati et al., 2005; Weisstaub et al., 2002). Por el contrario, $\alpha 9$ homomérico del pez cebra no es modulado por Ca^{2+} extracelular en concentraciones dentro del rango fisiológico (Carpaneto et al., 2021). Además, una característica global de los nAChRs es su capacidad de desensibilización ante la exposición prolongada a su agonista (Quick & Lester, 2002). Recientemente, estudios electrofisiológicos demostraron que los receptores nAChRs $\alpha 9$

homoméricos del pez cebra poseen mayor desensibilización con respecto a los de rata o pollo (Carpaneto et al., 2021; Elgoyhen et al., 1994; Lipovsek et al., 2012).

Por último, estudios farmacológicos con bloqueante de los canales SK, mostraron inhibir la hiperpolarización generada por ACh en CCs de la LLP, sugiriendo que los canales SK1 o SK2 estarían implicados en la respuesta inhibitoria de la sinapsis eferente en el pez cebra (Carpaneto et al., 2021) (Figura 9C).

ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA

Se ha puesto en evidencia un fenómeno altamente ubicuo, que es la presencia de actividad en múltiples tipos celulares en ciertas ventanas del desarrollo del individuo y en ausencia absoluta de estímulos. Dado esta característica tan particular, que anteriormente se creía era ruido causado por las mediciones, se llevó a conocer este fenómeno como actividad eléctrica espontánea (AEE).

Hasta el día de la fecha, se ha detectado AEE en el desarrollo de numerosos tipos celulares no solo *in vivo*, sino también en cultivos celulares, tales como células musculares, células de la glía, neuronas del hipocampo, hipotálamo, tálamo, cerebelo, corteza cerebral, espina dorsal, así como también en células y neuronas involucradas en circuitos sensoriales (reviews: Feller, 1999; Leighton & Lohmann, 2016; Martini et al., 2018; Moody & Bosma, 2005; Swandula et al., 1990). Existen evidencias del papel que juega la actividad no dependiente de estímulos en la maduración celular y la formación de las redes neuronales (Blankenship & Feller, 2010). Previo a este descubrimiento, se creía que el desarrollo estaba liderado puramente por programas genéticos y moleculares, los cuales guiaban el cableado de los circuitos neuronales. Además de la presencia de cascadas de señalización molecular, la AEE cumple un rol crucial en distintos procesos vinculados con el desarrollo como la proliferación, migración, diferenciación y sinaptogénesis, tanto en la fase embrionaria como en la vida adulta (Goda & Davis, 2002; Luhmann et al., 2016; Weissman et al., 2004; Zito &

Svoboda, 2002). La correcta formación y ensamblado de los circuitos neuronales involucra dos fases para las cuales la AEE es necesaria: comienza por una fase temprana, donde se establece un primer cableado del sistema, que sigue con una fase posterior, durante la cual se produce el refinamiento de esas conexiones nerviosas, denominado “*pruning*” (del inglés “*to prune*” que significa “*podar*”).

Los potenciales de acción (PA) en respuesta a la excitación neuronal pueden ser generados por elevaciones transitorias de Na^+ ó Ca^{2+} . La AEE está mayormente liderada por transientes de Ca^{2+} que dependen de la activación de canales sensibles a las diferencias de voltaje. Sin embargo, se han encontrado otro tipo de mecanismos involucrados en la generación de respuestas espontáneas de Ca^{2+} , como receptores mecanosensoriales (activados por estiramiento o tensión), receptores de la familia TRP (del inglés “*transient receptor potential*”) y receptores iónicos activados por ligando (como los receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA) (Rosenberg & Spitzer, 2011; Wong & Grosh, 2002).

La especificidad en la señalización mediada por Ca^{2+} se confiere por sus características espaciales y temporales, siendo una etapa clave, el desarrollo temprano. Diferentes patrones de actividad regulan una gran cantidad de aspectos distintos de la diferenciación neuronal incluyendo la activación de factores de transcripción específicos y reordenamientos del citoesqueleto. Los mecanismos que regulan la expresión y localización de los canales permeables a Ca^{2+} juegan un papel fundamental en la diferenciación impulsada por este ion y en la determinación del subtipo celular. Se ha reportado que los patrones espontáneos de Ca^{2+} modulan la expresión de neurotransmisores. Este fenómeno se denomina reespecificación de neurotransmisores e implica inducir o eliminar la expresión de neurotransmisores excitatorios o inhibitorios, o bien, cambiar la expresión de excitatorios a inhibitorios y viceversa. Esta capacidad de cambio multidireccional permite que la reespecificación de neurotransmisores ejerza un efecto homeostático y compensatorio sobre los niveles de actividad dentro de los circuitos neuronales (Spitzer, 2012). Se ha reportado que el incremento de la frecuencia de disparo de PA de Ca^{2+} en neuronas espinales de *Xenopus*, resulta en un incremento de neuronas GABAérgicas, aumentando la

inhibición del sistema, frente a una exacerbación en la excitación inclusive antes del periodo sinaptogénico (Watt et al., 2000). De la misma manera, cuando se suprime la AEE en el mismo sistema se observa un aumento en la proporción de neuronas colinérgicas y glutamatérgicas con respecto al total (Borodinsky et al., 2004).

Este balance entre excitación e inhibición neuronal durante el desarrollo es necesario no solo para el correcto establecimiento de las conexiones, sino para el funcionamiento óptimo de los sistemas. Hasta el día de hoy, se siguen estudiando las consecuencias en el desbalance de estos dos parámetros, ya que hay afecciones, condiciones y enfermedades humanas relacionadas con problemas en este balance durante el desarrollo como la esquizofrenia, desórdenes del espectro autista, epilepsia, entre otras (Nelson & Valakh, 2015; Sears & Hewett, 2021; van Hugte et al., 2023).

Transientes rápidos y lentos

Existen dos tipos de transientes de Ca^{2+} : los transientes rápidos (o “spikes”) y los lentos (o “waves”) (Gu et al., 1994; Spitzer et al. 1994). Los transientes rápidos experimentan una subida aguda en la concentración de Ca^{2+} intracelular, son generados por PA dependientes del Ca^{2+} que ingresa desde el medio extracelular, y potenciado por el eflujo de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares. La cinética de decaimiento de estas señales, medido con el sensor de Ca^{2+} Fura-2, está representado por una estereotipada curva de doble exponencial, suelen durar menos de 5 segundos y se propagan rápidamente a través de la célula (Gu et al. 1994). Por el contrario, los transientes lentos presentan una duración ampliamente variable (desde medio minuto hasta varios minutos, Figura 10). En células neuronales, los transientes lentos de Ca^{2+} ocurren en el soma y en los conos de crecimiento, y, generalmente permanecen en el compartimento donde se generan. Las distintas transiciones de Ca^{2+} también tienen diferentes efectos en la diferenciación neuronal. Los transientes rápidos regulan la especificación del tipo de neurotransmisor que producirá la neurona, mientras que los transientes lentos controlan la velocidad a la que crece el axón de la neurona. Esto indica

que las características espaciotemporales de la actividad espontánea de Ca^{2+} pueden proporcionar una especificidad funcional crucial para el desarrollo neuronal.

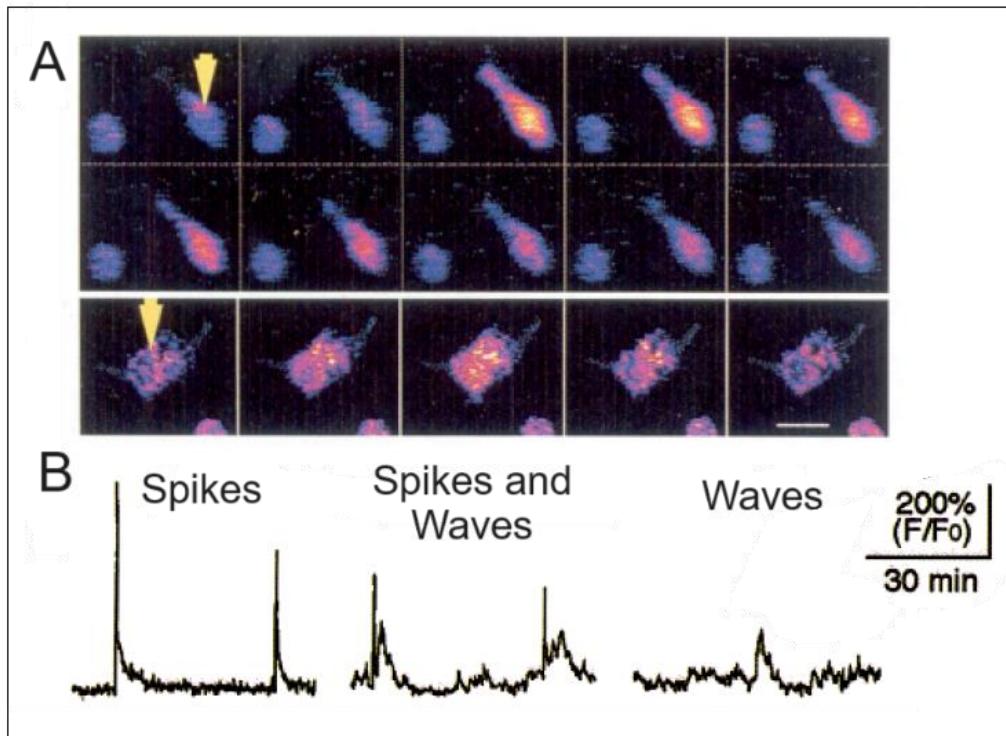


Figura 10: Registros *in vivo* de las elevaciones transientes espontáneas de la concentración intracelular de Ca^{2+} en neuronas espinales de *Xenopus laevis* en cultivo luego de 6-8 hs. (A) Transientes rápidos (arriba) y lentos (abajo) marcado con flechas. El sensor de Ca^{2+} utilizado fue Fluo-3 y está representado con una escala de pseudocolor donde colores más claros indican un valor alto y colores oscuros indican un valor bajo de concentración de Ca^{2+} . Barra de escala: 25 μm . (B) Registros de fluorescencia de elevaciones en la concentración de Ca^{2+} en forma de picos (spikes), picos y olas (spikes and waves) y solo olas (waves) medidas a 0.2 Hz. Imagen adaptada de Gu & Spitzer, 1994.

El establecimiento y la plasticidad de la morfología de las dendritas representan aspectos importantes de la diferenciación neuronal. El crecimiento relativo y la ramificación de los árboles dendríticos y axonales influyen en el número de conexiones sinápticas que una neurona puede formar. La regulación de la arborización dependiente actividad ha sido descrita para numerosos subtipos neuronales y se reportó que la señalización mediada por Ca^{2+} está implicada en la regulación de la plasticidad de los árboles axonales y el crecimiento dendrítico (Wong & Ghosh, 2002). Algunos estudios han demostrado el rol del glutamato y

de los receptores NMDA, cuya apertura incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular y promueven un aumento en la ramificación dendrítica tanto en neuronas de roedores como de anfibios (Chevaleyre et al. 2002; Rajan & Cline, 1998).

Actividad espontánea en sistemas sensoriales

Con el fin de procesar los estímulos sensoriales externos con precisión y coherencia, las células y neuronas sensoriales deben estar conectadas y organizadas en redes funcionales finamente establecidas. Durante una primera etapa del desarrollo, el ensamblado de estas redes neuronales está guiado por señales moleculares, y luego modulado por actividad eléctrica, inclusive antes de que el sistema sensorial pueda detectar estímulos externos. La ventana temporal donde se genera la AEE es crucial para el correcto desarrollo del sistema a distintos niveles. Si bien la AEE en sistemas sensoriales se descubrió hace varias décadas, las recientes tecnologías de imágenes en animales intactos facilitaron el estudio *in vivo* de esta actividad.

El fenómeno de AEE es propio de células inmaduras, es decir que lo observamos durante el proceso de maduración del sistema y suele reducirse con el tiempo, cuando los sistemas comienzan a funcionar sensando estímulos del medio externo. Es ubicuo en múltiples sistemas sensoriales, exhibiendo distintas dinámicas de actividad lideradas por Ca^{2+} y no solo sobre neuronas sensoriales sino en las células sensoriales y no sensoriales. Se ha registrado AEE en el sistema visual (retina y corteza) (Blankenship & Feller, 2011; Fredj et al., 2010; Marachlian et al., 2018; Toborg & Feller, 2005), olfatorio (epitelio y corteza) (Edwards et al., 2007; Yu et al., 2004), somatosensorial (corteza) (Khazipov et al., 2004; Minlevaev et al., 2007), vestibular (utrículo) (Holman et al., 2019) y auditivo (cóclea y corteza), (Clause et al., 2014; Johnson et al., 2013; Tritsch et al., 2007; Zhang et al., 2002). En algunos sistemas como el visual y el auditivo, se ha encontrado AEE coordinada en forma de oleadas de Ca^{2+} (Ackman et al., 2012; Babola et al., 2018) que se transmiten entre células

vecinas a través de canales gap (hemicanales de conexinas asociados entre dos células vecinas) (Ceriani et al., 2019; Kandle & Katz, 1998). Por otro lado, también hay trabajos que demuestran que, en algunos sistemas, los transientes de Ca^{2+} se encuentran sincronizados entre las células que las exhiben (Voufo et al., 2023), mientras que, en otros, la AEE está desincronizada o es aleatoria (Marcotti et al., 2003; Eckrich et al., 2018)

Sistema auditivo

Origen de la actividad espontánea en la cóclea

Antes del comienzo de la audición, las CCI de la cóclea exhiben AEE generada por PA de Ca^{2+} , cuyos eventos tienen iniciación en las células de soporte del órgano de Kölleker. Estas células liberan ATP por su lado apical, activando al receptor purinérgico metabotrópico P2Y1 (P2ry₁) de manera autócrina (Babola et al., 2020). La señalización purinérgica extracelular activa una cascada de transducción canónica a través de los P2ry₁, receptores acoplados a proteína G_q, mediante la cual, la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), dependiente de fosfolipasa C (PLC), genera el segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ actúa sobre los reservorios intracelulares de Ca^{2+} generando un aumento transitorio en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Berridge et al., 2003; Ceriani et al., 2016). El Ca^{2+} y el IP₃ difunde por la célula de soporte y hacia células de soporte vecinas por medio de uniones gap, transmitiendo así, la señal en forma de oleada. Por otro lado, la despolarización de las células de soporte resulta en la activación de los canales de cloro (Cl⁻) TMEM16a y el eflujo de este ion al medio extracelular basolateral. Acompañando al Cl⁻, agua y K⁺ tienden a salir de la célula para preservar el balance osmótico, generando en ella un encogimiento. El incremento extracelular en la concentración de K⁺ despolariza a las CCI, desencadenando la liberación de glutamato y generando PA en las neuronas del ganglio espiral (NGE) (Babola et al., 2018; Wang et al., 2015), las cuales integran el nervio aferente auditivo encargado de transmitir la información a la primera zona

de relevo en el tallo cerebral. Las CCI tienen la capacidad de disparar PA de Ca^{2+} (también llamados picos de Ca^{2+}) antes del comienzo de la audición, cuya cinética es más lenta que los PA convencionales generados por la entrada de Na^+ . Estos PA de Ca^{2+} están mediados principalmente por los canales $\text{Ca}_v1.3$ (Brandt et al., 2003; Eckrich et al., 2018).

Por otro lado, existe una modulación mediada por el receptor purinérgico ionotrópico P2X (P2rx). Las CCs de la cóclea expresan 3 tipos de P2rx: P2rx₂, P2rx₃ y P2rx₇ (Housley et al., 1999; Nikolic et al., 2003; Vlajkovic & Throne, 2022). Si bien aún no es del todo claro el papel que juega la señalización de ATP sobre las CCI durante el desarrollo, se ha reportado que produce efectos diferentes sobre las CCs dependiendo de su concentración. Por un lado, se plantea que los P2rx₂ se encuentran en la proximidad de los estereocilios, y son activados por concentraciones micromolares de ATP, causando la despolarización de la CCI (Housley et al., 1999). Por otro lado, los P2rx₃ son activados por concentraciones nanomolares de ATP, se encontrarían acoplados a canales SK2 en la zona basal de las CCI y conducirían a una hiperpolarización (Johnson et al., 2011). Vale la pena destacar que los canales SK2 también están acoplados a los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. Su activación por fibras eferentes MOC, durante el desarrollo, conduce a la apertura de los canales SK2, y la consiguiente hiperpolarización de las CCI a través de la salida de K^+ , modulando el patrón de descarga de PA en las NGE. Por lo tanto, se cree que el ATP podría estar actuando sinérgicamente con ACh modulando las corrientes de los SK2 (Jovanovich & Milenkovic, 2020; Vlajkovic & Throne, 2022).

Actividad espontánea en las neuronas del ganglio espiral

Antes del comienzo de la audición, las vesículas sinápticas liberadas espontáneamente por las CCI impactan sobre receptores glutamatérgicos de tipo AMPA/kainato, provocando una respuesta de tipo excitatoria sobre las NGE (Glowatzki & Fuchs, 2002). Además, las NGE también muestran presencia del receptor glutamatérgico NMDA en los árboles dendríticos (Zhang-Hooks et al., 2016). Luego de la liberación espontánea de vesículas por parte de las

CCI, los receptores NMDA en la postsinapsis se activan permitiendo el influjo de Ca^{2+} a los terminales dendríticos, actuando como un mecanismo de amplificación que prolonga las corrientes postsinápticas, intensifica la respuesta y permite una tasa de alta frecuencia de PA río abajo. El bloqueo farmacológico del receptor NMDA resulta en una disminución de la sobrevida de las NGE, evidenciando que la AEE actúa sobre la maduración de los terminales postsinápticos antes del comienzo de la audición (Zhang-Hooks et al., 2016). La actividad generada por las células de la periferia, se propaga como PA a través del nervio auditivo al resto del sistema, siendo esta actividad, anulada al remover la cóclea (Tritsch et al., 2010). Cambios en el patrón temporal de la AEE resulta en una alteración en los mapas tonotópicos (Clause et al., 2014; Kandle et al., 2009).

Modulación de las neuronas eferentes colinérgicas sobre las células ciliadas

En mamíferos, durante el desarrollo, existen contactos sinápticos eferentes MOC, modulando la actividad a nivel de las CCI, que desaparecen luego del comienzo de la audición. La descarga eferente colinérgica es de carácter inhibitorio y desencadena la hiperpolarización de las CCI, lo que reduce el disparo de PA de Ca^{2+} (Glowatzki & Fuchs, 2000). La inhibición es lo suficientemente robusta que, si la señalización colinérgica es prolongada y de alta frecuencia, podrían suprimir en su totalidad la generación de los PA de Ca^{2+} (Goutman et al., 2005). La inhibición del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en cócleas aisladas induce un aumento en el patrón de disparo de las CCI provocando una ráfaga sostenida (o *burst*) de actividad (Johnson et al., 2011), lo que sugiere que los eferentes colinérgicos pueden mantener altas tasas de liberación incluso cuando están separados de sus cuerpos celulares.

Sistema de línea lateral del pez cebra

Recientemente, se comenzó a estudiar la AEE exhibida por el sistema de LL del pez cebra. Como se mencionó anteriormente, la LL del pez cebra guarda similitudes estructurales, moleculares y funcionales con el oído interno y aparato vestibular de mamíferos debido a que se encuentran relacionados evolutivamente. Como en todo sistema sensorial conocido, fue esperable encontrar presencia de transientes espontáneos en el desarrollo de este sistema sensorial.

Neuronas aferentes

Las NAs de la LL del pez cebra exhiben AEE en estadios tempranos del desarrollo. Al igual que en el aparato auditivo y vestibular de mamíferos, esta actividad no es generada intrínsecamente dentro de las neuronas, sino que es el resultado de la liberación espontánea de glutamato desde las CCs (Keen & Hudspeth, 2006; Moser & Beutner, 2000). Registros electrofisiológicos en el pLLg a 5 y 6 dpf, revelaron la presencia de ráfagas de PA, los cuales son completamente silenciados al bloquear farmacológicamente las diferentes corrientes que participan de la despolarización de las CCs. Se observó el mismo efecto en animales con mutaciones de pérdida de función para el transportador de glutamato Vglut3 y para los canales $Ca_v1.3$ (Trapani & Nicolson, 2011). Esto se realizó en un estadio maduro de la LL, cuando los animales muestran comportamientos indicativos de órganos auditivos, vestibulares y de la LL funcionalmente activos (Kimmel et al., 1974; Obholzer et al., 2008; Zeddies & Fay, 2005). Estos resultados evidenciaron que la sinapsis aferente entre las CCs y las NAs es necesaria para la generación de AEE en el pLLg. En particular, se ha demostrado que cuando se aumenta el tamaño de la estructura *ribbon* por sobreexpresión de la proteína *Ribeye*, se detecta una menor cantidad de canales $Ca_v1.3$ reclutados, menor liberación de vesículas y, en consecuencia, una disminución en la tasa de PA en las NAs (Sheets et al., 2017).

Durante el desarrollo, el pLLg está compuesto por aproximadamente 50 somas de diferentes tamaños (Figura 7D). Por un lado, tenemos somas grandes, correspondientes a NAs de nacimiento temprano y, por otro lado, somas de formación más reciente que son más pequeños (Pujol-Martí et al., 2010). Se ha reportado que existe una relación inversa entre el tamaño del soma y la tasa de disparo de PA espontáneos (Liao & Haehnel, 2012).

Células ciliadas y células de soporte

Debido a la dificultad que implica realizar registros electrofisiológicos en CCs y células de soporte de la LL, estos transientes de Ca^{2+} suelen estudiarse a través de protocolos de adquisiciones de imágenes. A lo largo de los años, no solo se han desarrollado herramientas moleculares que facilitan el sensado del ion Ca^{2+} , sino que también, se generaron nuevas tecnologías de microscopía de fluorescencia que permiten, de manera cada vez más eficiente, acotar el estudio de dichas moléculas sensoras espacial y temporalmente.

Trabajos recientes reportaron que las CCs en desarrollo exhiben transientes espontáneos de Ca^{2+} dependientes de los canales $\text{CaV}1.3$ a los 2-3 y 6 dpf (Zhang et al., 2018). Dicha actividad es necesaria para el establecimiento de la maquinaria presináptica. Las mitocondrias aledañas a las estructuras *ribbon* actúan como reservorios de Ca^{2+} intracelulares, y el influjo y eflujo de Ca^{2+} mitocondrial jugaría un rol crucial en el establecimiento de la presinapsis. Se ha propuesto que la *ribbon* podría estar actuando como un biosensor del metabolismo, ya que alteraciones en el metabolismo de óxido-reducción de NAD^+/NADH resulta en cambios en el tamaño y función de las estructuras presinápticas (Wong et al., 2019).

Dentro del NM, las CCs no son el único tipo celular que exhibe transientes de Ca^{2+} espontáneos. Un trabajo reciente reportó la existencia de fluctuaciones espontáneas de Ca^{2+} durante el desarrollo en las células de soporte del NM y en terminales de las AChNEs que contactan a las CCs (Zhang & Kindt, 2022). La magnitud y frecuencia de los eventos de AEE de las CCs son mayores a los 3 dpf, cuando las células se encuentran inmaduras, que a los

6 dpf, cuando las CCs maduran. No se encontró una correlación temporal entre los eventos expresados por las diferentes CCs dentro del mismo NM. Por el contrario, los eventos de AEE detectados en las células de soporte exhiben los mismos parámetros de magnitud y frecuencia a 3 y a 6 dpf, sin observar una disminución en conjunto con la maduración del NM. Además, se observó un patrón de sincronización temporal parcial, donde algunos eventos están coordinados en varias células de soporte vecinas, mientras que otros eventos son propios de las distintas células. Las células de soporte están acopladas eléctricamente a través de uniones gap y se cree que podrían estar participando de la sincronización parcial (Wong et al., 2018). De manera similar a lo que sucede en las células de soporte del órgano de Kölliker en la cóclea, los transientes de Ca^{2+} de las células de soporte del NM se originan debido a una señalización mediada por ATP a través del receptor purinérgico P2ry₁. En dicha señalización está involucrado el retículo endoplasmático que participa liberando y recaptando Ca^{2+} del citoplasma, funcionando como un reservorio de Ca^{2+} . Se cree, entonces, que la señalización purinérgica tiene como consecuencia la liberación del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, la difusión de dicho Ca^{2+} hacia las células de soporte vecinas, sincronizando la actividad. Sin embargo, el bloqueo de la señalización purinérgica mediada por P2ry₁ a 3 dpf, no produce cambios en los patrones de AEE sobre CCs (Zhang & Kindt, 2022).

Neuronas eferentes colinérgicas

A los 3 dpf, los terminales de las AChNEs que contactan a un NM exhiben AEE mediada por Ca^{2+} y se encuentran altamente sincronizados. La magnitud y frecuencia de estos eventos se reduce a los 6 dpf. En el estadio inmaduro no hay correlación alguna entre los patrones de AEE de los terminales eferentes y las CCs, evidenciando que a 3 dpf, no habría una modulación eferente de la AEE de las CCs. Trabajos recientes han demostrado que en larvas maduras del pez cebra, durante el nado, los eferentes colinérgicos se activan sincrónicamente con las neuronas motoras de la médula espinal (Lunsford et al., 2019;

Pichler & Lagnado, 2020). Por lo tanto, se cree que, durante el desarrollo, la actividad espontánea de los eferentes colinérgicos puede estar sincronizada con la actividad de las neuronas motoras espinales ya que, durante el desarrollo de la médula espinal, se establece el generador de patrones centrales (GPC) para crear los ritmos oscilatorios necesarios para la locomoción (Grillner et al., 1998).

OBJETIVOS

De acuerdo a la información presentada sobre el sistema de LLP y su semejanza con los sistemas auditivo y vestibular de mamífero, este proyecto tiene por objetivo general entender cómo la AEE afecta el ensamblado de los circuitos sensoriales en desarrollo. Los objetivos específicos tienen como finalidad: 1- entender el rol de la AEE en el establecimiento de la inervación aferente de la LL del pez cebra y elucidar los procesos celulares que subyacen a dicho fenómeno, y 2- caracterizar los patrones de AEE generados por las CCs durante el ensamblado de la vía aferente de la LL.

Objetivos particulares - Capítulo 1:

- Realizar una caracterización morfométrica de las neuronas aferentes de la línea lateral del pez cebra en dos estadíos representativos del desarrollo.
- Estudiar las consecuencias del silenciamiento de neuronas aferentes únicas de la línea lateral a nivel morfológico sobre el cerebro medio.
- Analizar las consecuencias del silenciamiento de neuronas aferentes sobre la dinámica de crecimiento de árboles axonales en desarrollo.

Objetivos particulares - Capítulo 2:

- Realizar una caracterización de los patrones de actividad eléctrica espontánea en las células ciliadas del neuromasto a lo largo del desarrollo.
- Estudiar la modulación mediada por las neuronas eferentes colinérgicas sobre la actividad eléctrica espontánea expresada por las células ciliadas del neuromasto.
- Estudiar la modulación mediada por la señalización purinérgica sobre la actividad eléctrica espontánea expresada por las células ciliadas del neuromasto.

**CAPÍTULO 1: Rol de la actividad eléctrica
espontánea en el establecimiento de las
proyecciones axonales centrales de las neuronas
aferentes de la línea lateral**

Materiales y Métodos

Mantenimiento del acuario y cría de animales

Esta tesis fue realizada utilizando como modelo de estudio al pez cebra (*Danio rerio*). Nuestro laboratorio cuenta con un acuario propio, mantenido en condiciones estándares, tanto del ambiente como de la composición y calidad del agua donde crecen los animales, según lo indicado en *The Zebrafish Book* (Westerfield, 1995). El ciclo de luz-oscuridad se regula automáticamente, siendo este de 14 y 10 horas, respectivamente. La temperatura del ambiente varía en un rango de entre 24 y 26 °C.

El acuario consta de dos *racks*, cada uno con un sistema cerrado de circulación de agua, con 16 y 12 peceras, respectivamente, donde habitan animales salvajes (*wild-type*, WT) de la cepa AB y de distintas líneas transgénicas. La temperatura del agua varía entre los 25 y 27 °C y el pH del agua es considerado óptimo en un valor de entre 8.4 y 8.6. La composición del agua es crucial para el crecimiento y calidad de vida de los animales. Es por ello que cada *rack* cuenta con un filtro biológico que impide que los niveles de amonio se eleven a valores tóxicos para los peces. Además, llevamos un registro de la concentración de desechos de nitrógeno acumulados en forma de nitritos (NO_2^-) y amonio ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$), siendo lo esperable encontrar una concentración de $\text{NO}_2^- < 0.3 \text{ mg/l}$ y de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 < 0.25 \text{ mg/l}$.

También cuenta con un sistema de filtración de agua a través del proceso de ósmosis inversa. Este agua es utilizada para el mantenimiento de las peceras, la puesta de huevos para experimentos y mantención de líneas, y la crianza de larvas en pequeños contenedores dentro del mismo cuarto.

Animales

Para la realización de los experimentos de este capítulo se utilizaron animales salvajes (*wild-type*, WT) de la cepa AB.

Obtención y cría de embriones

Para la obtención de embriones, el método de cruce utilizado en esta tesis fue natural, involucrando el desove de ovocitos de las hembras seguido por la liberación de los espermatozoides de los machos, luego de una estereotipada danza de cortejo. Este proceso se realizó siempre por la mañana para maximizar la probabilidad de puesta.

La preparación de los animales se realizó el día anterior a la cría para que el animal se habitúe y reduzca el estrés provocado por el cambio de ambiente. Los animales fueron atrapados mediante una red, removidos de sus peceras y reubicados en contenedores de acrílico especiales para crías, los cuales estaban provistos con un segundo contenedor de acrílico con un patrón de rendijas paralelas para la deposición de los ovocitos en el fondo del recipiente. Machos y hembras fueron separados por un divisor transparente con el fin de controlar los tiempos de fecundación de los embriones.

Al inicio de los experimentos, el divisor transparente fue removido y los peces comenzaron el cortejo y posterior puesta. Los embriones fueron recolectados entre los 5 y 15 minutos luego del desove mediante la remoción de agua, lavados con agua filtrada para eliminar desechos, y mantenidos en placas de Petri de 15 ml con medio E3 (en mM: NaCl 5, KCl 0.17, CaCl₂ 0.33, MgSO₄ 0.33, pH 7.2) a 28°C (Westerfield, 2000). A las 24 hpf se removieron los embriones muertos y se agregó al medio E3 n-feniltiourea (PTU) 0.2 mM, para prevenir la formación de pigmento en las larvas (Karlsson et al., 2001).

Plásmidos

Para el abordaje experimental de esta tesis, realizamos microinyecciones de ADN plasmídicos de diferentes construcciones. Para dirigir la expresión de genes a las NAs de la LL utilizamos la construcción hsp70:gal4VP16-SILL (Pujol-Martí et al., 2012). Hsp70 es un promotor constitutivo altamente conservado ya que está implicado en hidrólisis de ATP, plegamiento y degradación de proteínas. Río abajo posee una secuencia que codifica a la proteína GAL4 fusionada a VP16, que es un dominio de transactivación procedente del virus del herpes simplex (Sadowski et al., 1988) que actúa como potenciador de la transcripción. Gal4 es un gen que codifica al factor de transcripción GAL4 que reconoce al promotor constitutivo UAS (por sus siglas en inglés “*upstream activation sequence*”). La especificidad de expresión está dada por la secuencia SILL (por sus siglas en inglés “*sensory innervation of lateral line*”), que es un *enhancer* específico de NAs de la LL (Fauchere et al., 2009). Para todos los tratamientos, hsp70:gal4VP16-SILL fue inyectado junto con plásmidos que contienen la secuencia UAS.

Para revelar el fenotipo WT de las neuronas aferentes se utilizó la construcción UAS:DsRed, que codifica a la proteína fluorescente roja DsRed, lo cual nos permitió observar la morfología de las proyecciones axonales centrales de las NAs de la LL. Para el silenciamiento de la actividad eléctrica, se utilizó un plásmido contenido el doble cassette UAS:DsRed::UAS:hKir2.1, que codifica a la proteína DsRed y al canal de potasio humano hKir2.1. Está reportado que la sobreexpresión de dicho canal suprime la actividad eléctrica

de las neuronas al aumentar el umbral de excitabilidad, desplazando el potencial de reposo de la célula a valores más negativos (Johns et al., 1999). Como control, se utilizó la construcción UAS:DsRed::UAS:hKir2.1mut, que codifica al mismo canal de potasio hKir2.1 pero con pérdida de función debido una mutación en el motivo GYG → AAA (Burrone et al., 2002; Plazas et al., 2013).

A los 3 dpf se seleccionaron las larvas que expresaron DsRed en NAs únicas de la LL, bajo una lupa de epifluorescencia (MZ10F, Leica). Las larvas positivas fueron mantenidas a 28°C hasta el momento de la adquisición de imágenes.

Microinyecciones de ADN plasmídico en estadio de 1-célula

Las microinyecciones se realizaron en el estadio embrionario de 1-célula, en la primera media hora luego de la fecundación. Los embriones fecundados se colocaron en una placa de Petri preparada con anterioridad, la cual contenía un piso de agarosa 3% en forma de canales de 1 mm de ancho donde los embriones se depositaron en fila y quedaron retenidos para el momento de la inyección.

Todas las inyecciones fueron puestas a punto minimizando la masa de ADN plasmídico introducido en el embrión, con el fin de obtener al menos una neurona marcada con DsRed, y maximizando la viabilidad de los embriones. La concentración óptima obtenida fue de 10 ng/μl para cada una de las construcciones en la solución final de inyección.

El microinyector utilizado fue WPI PV830, el cual está unido, por un extremo, a un tubo con nitrógeno gaseoso, el cual realiza presión positiva de forma regulada, y, por el otro extremo, a un micromanipulador (Narishige MN-153) donde se le coloca una pipeta de vidrio cerrada cargada con la solución a inyectar. Las pipetas de vidrio fueron estiradas el día de inyección con un puller (Narishige PC-10) a partir de capilares de borosilicato de 1.0 mm OD x 0.75 mm ID (FHC, Bowdoin, ME USA). Antes de cada inyección se rompió la punta de la pipeta con una pinza y se descargó líquido dentro de una gota de aceite mineral sobre un vidrio de calibración graduado con una resolución espacial de 0.01 mm bajo una lupa (EZ4, Leica). La calibración de la gota de inyección se realizó en referencia a una curva de calibración de volumen de líquido conocido en función del diámetro de la gota. El volumen óptimo de inyección fue de 1.5 nl para todos los casos. De esta manera, la masa de cada uno de los plásmidos inyectados fue aproximadamente de 15 pg.

Luego de ser inyectados, los embriones se mantuvieron en medio E3 a 28°C. 24 horas post inyección se removieron los embriones muertos, y los restantes se mantuvieron en medio E3 PTU a 28°C hasta el día de registro.

Preparación de las larvas para la adquisición de imágenes

El día de la adquisición de imágenes, larvas de 3 ó 5 dpf fueron anestesiadas con metasulfonato de tricaina 0,02% (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) en E3, embebidas en agarosa de bajo punto de fusión al 1% y colocadas sobre un cubreobjetos con el saco vitelino hacia arriba. La tricaina es un derivado de la benzocaína, que bloquea los canales de Na^+ dependientes de voltaje, inhibiendo el disparo de PA a nivel global. Una vez que la agarosa se solidificó, el cubreobjetos contenido a las larvas se colocó dentro de una cámara de registro, quedando las larvas con su lado dorsal hacia arriba. La tricaina fue removida y la adquisición de imágenes se realizó en E3 para minimizar posibles interferencias con la actividad eléctrica del sistema a estudiar.

Adquisición de imágenes *in vivo* (*live-imaging*) y estudio de la dinámica de crecimiento axonal (*time-lapse imaging*)

Para el estudio *in vivo* de la morfología de las arborizaciones axonales centrales de las NAs, se adquirieron imágenes en un microscopio confocal (TCS SPE, Leica), con un objetivo de inmersión en agua de 40X y NA = 0.8. La configuración de adquisición se estableció mediante el software LAS X (Leica Application Suite X) y el eje X,Y,Z se fijó con una profundidad de intensidad de fluorescencia de 8 *bits*. Se iluminó la cabeza de la larva desde su lado dorsal con un láser de una longitud de onda (λ) de 532 nm y se tomaron imágenes seriadas cada 2 μm a lo largo del eje dorsoventral de la proyección central, detectando un espectro de emisión entre $\lambda = 560$ y $\lambda = 600$ nm. La resolución de cada imagen fue de 512 x 512 píxeles.

Para el estudio *in vivo* de la dinámica de crecimiento de la proyección axonal central, se realizó un seguimiento en el tiempo de la neurona en estudio (*time-lapse imaging*): se adquirió una serie de imágenes cada 2 μm a lo largo del eje dorsoventral de la proyección central, cada 5 minutos durante 1 hora de registro.

Metodología para el análisis de imágenes

Análisis morfométrico de las proyecciones centrales de neuronas aferentes de la línea lateral

Las imágenes de fluorescencia fueron procesadas utilizando la distribución FIJI del software ImageJ (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012).

Se realizó una proyección en el eje dorso-ventral, sumando los valores de fluorescencia de cada píxel de todas las imágenes consecutivas en una sola imagen bidimensional como muestra la Figura 11.

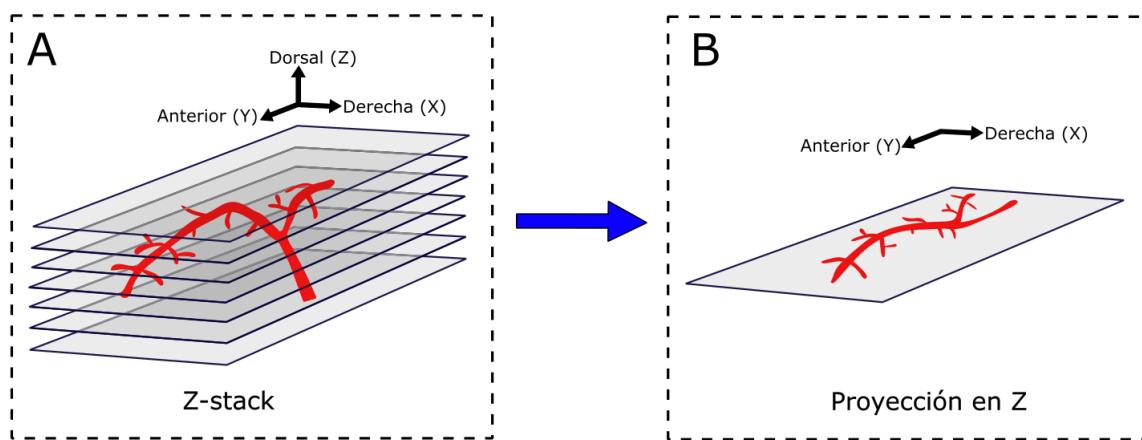


Figura 11: Representación de la adquisición realizada para el análisis de la morfología de las proyecciones centrales aferentes, siendo (A) una secuencia espacial tridimensional en el eje dorsoventral (Z-stack) y (B) la sumatoria de la fluorescencia de A resultando en una sola imagen bidimensional (Proyección en Z).

Para obtener un trazo representativo del esqueleto neuronal, se realizó un trazado semiautomático de la fluorescencia con el *plugin NeuronJ* (Meijering et al., 2004) a partir de la proyección en Z (Figura 12A). Se procedió a discriminar el axón central del árbol axonal y dichos grupos se estudiaron por separado (Figura 12B). El axón central se extiende desde el pLLg, y, una vez en el cerebro medio, se bifurca en dos ramas: una anterior (o larga) y otra posterior (o corta). El fragmento intermedio entre el ganglio y su bifurcación no se estudiará en esta tesis (Figura 12B). Los trazos del árbol axonal se realizaron en forma independiente (un trazo para cada rama) comenzando desde el axón central y terminando donde la línea de fluorescencia visualizada desaparece o se bifurca, marcando, de esta manera, ramas de forma individual.

Para este análisis, se determinó la longitud total de la proyección central axonal como la suma de la longitud del axón central más la longitud de todas las ramas del árbol axonal. Para estudiar la complejidad del árbol axonal, las ramas se clasificaron en primarias o secundarias, según se muestra en la Figura 12C. Se contabilizó el número total de ramas de cada tipo, y se determinó la cantidad de ramas secundarias surgidas a partir de cada rama primaria. Por último, se determinó el área de cobertura sobre el cerebro medio. Para ello, se unió con líneas rectas los extremos de cada rama del árbol axonal y se midió el área de la figura emergente (Figura 12D).

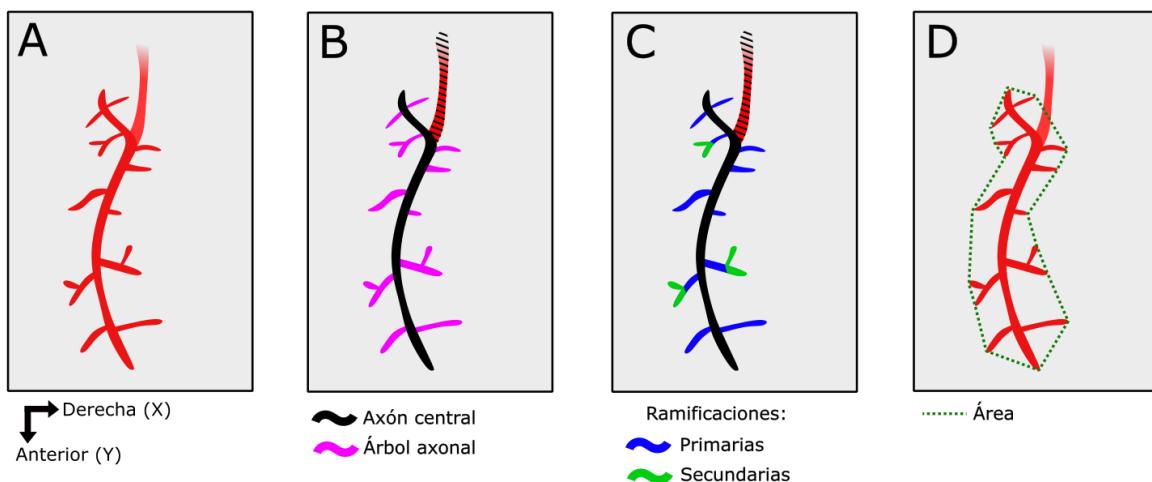


Figura 12: (A) Proyección axonal central de una NA de la LL. (B) Categorización de la proyección central discriminando el axón central (negro) del árbol axonal (magenta). (C) Trazos utilizados para el análisis de la complejidad del árbol axonal, donde se distinguen las ramas primarias (azul) y secundarias (verde). El motivo rayado en B y C representa el fragmento del axón aferente, precedente a la bifurcación, que no fue incluido en el análisis. (D) Polígono que delimita el área de cobertura sobre el cerebro medio (línea punteada).

Análisis de la dinámica de crecimiento de la proyección central

Aprovechando las capacidades del *plugin NeuronJ*, el cual permite modificar el esqueleto neuronal luego de haberlo establecido, decidimos utilizarlo, también, para estudiar la dinámica de crecimiento de la proyección central. El seguimiento de cada NA en el tiempo consistió en la adquisición de 13 series de imágenes, tal como se indicó anteriormente, tomadas cada 5 minutos durante 1 hora. El trazado del esqueleto completo se hizo por única vez sobre la primera imagen bidimensional de la proyección axonal central correspondiente al inicio de la adquisición (t_0). En los tiempos subsiguientes (t_1 a t_{12}), cada imagen bidimensional adquirida se utilizó para modificar el esqueleto de la adquisición anterior,

hasta completar la totalidad de imágenes. Las modificaciones sobre las proyecciones axonales centrales fueron determinadas superponiendo el trazo de t_n sobre la imagen t_{n+1} . Para detectar los eventos de motilidad se alargó o acortó las longitudes desde las puntas de las ramas del árbol axonal de t_n , de manera que coincidan con la imagen adquirida a t_{n+1} . Se detectaron movimientos de elongación y retracción de ramas (como estiramientos y acortamientos de los trazos, respectivamente), así como las formaciones y eliminaciones (como trazos nuevos y trazos de valor 0, respectivamente) como muestra la Figura 13.

Se determinaron los siguientes parámetros: longitud del axón central y del árbol axonal, longitud de ramas individuales, motilidad total del árbol axonal (calculado como la sumatoria de las distancias recorridas por la punta de cada rama del árbol axonal), tasas de formación, eliminación, elongación y retracción de ramas (calculadas como el número de eventos ocurridos a lo largo de 1 hora de registro). Debido a la gran variabilidad que existe entre las longitudes de las proyecciones analizadas, para comparar los parámetros descritos anteriormente, se normalizó cada valor por la longitud de dicho árbol en t_0 .

Para estudiar la estabilidad de los árboles axonales, se determinó el porcentaje de ramas consistentes (aquellas en las cuales no se detectan eventos de elongación o retracción) y el porcentaje de ramas persistentes (aquellas que, independientemente de sus movimientos, se pueden observar durante toda la hora de registro). Además, se determinó el tiempo de vida de aquellas ramas provenientes de eventos de formación ocurridos durante los primeros 40 minutos de registro, cuantificando el tiempo transcurrido hasta su eliminación.

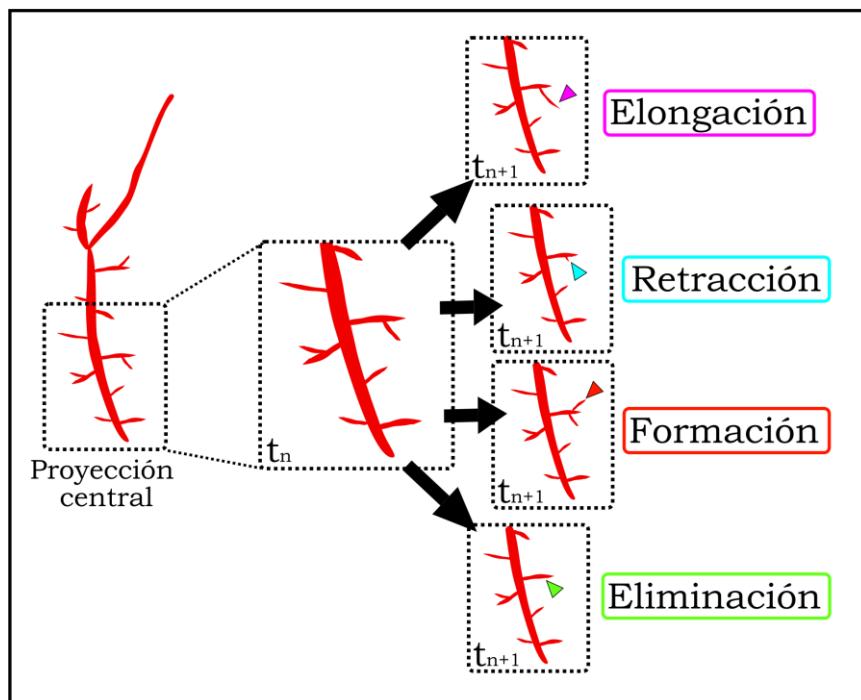


Figura 13: Panel izquierdo: esquema representativo de la proyección central de una NA a 5 dpf, desde una vista dorsal. Panel central: acercamiento de la rama anterior de la NA a un tiempo determinado (t_n) donde se observan las ramas del árbol axonal. Panel derecho: misma neurona registrada 5 minutos después (t_{n+1}). Las flechas de colores indican la categoría del evento de motilidad detectado (de arriba hacia abajo): elongación (magenta), retracción (cian), formación (rojo) y eliminación (verde).

Determinación de varicosidades

Se determinó, de manera indirecta, el número de contactos sinápticos aferentes a partir de la cuantificación de varicosidades presentes en la proyección axonal central de larvas de 5 dpf. La identificación de las varicosidades se realizó sobre las proyecciones en Z de cada neurona, identificando los engrosamientos de la membrana (puntos donde se acumula la proteína DsRed y, por lo tanto, tienen mayor intensidad de fluorescencia). Las adquisiciones donde no se pudo identificar correctamente dichas varicosidades fueron descartadas del análisis. Utilizando los trazos neuronales anteriormente descritos, se discriminaron las varicosidades que se encontraban sobre el axón central, el árbol axonal y la porción terminal de cada rama. Los valores obtenidos fueron normalizados dividiéndolos por la longitud del trazo de referencia correspondiente.

Unidades experimentales y análisis estadístico

Para el estudio de las proyecciones axonales centrales se registró una neurona por individuo en todos los casos. La caracterización morfométrica de los árboles axonales se realizó utilizando un $N_{WT3dpf} = 14$, $N_{KIR3dpf} = 16$, $N_{WT5dpf} = 16$, $N_{KIR5dpf} = 25$ y $N_{KIRm5dpf} = 12$ neuronas. El estudio de dinámica de crecimiento del árbol axonal contó con un $N_{WT3dpf} = 8$, $N_{KIR3dpf} = 5$, $N_{WT5dpf} = 6$, $N_{KIR5dpf} = 9$ y $N_{KIRm5dpf} = 9$ neuronas. La determinación de varicosidades se realizó a partir de un $N_{WT5dpf} = 18$, $N_{KIR5dpf} = 24$ y $N_{KIRm5dpf} = 12$ neuronas.

Para los cálculos estadísticos y gráficos se utilizaron los programas Microsoft Excel, GraphPad 8 y la interfaz de desarrollo integrado Spyder (Python 3.7) del paquete de distribución Anaconda3. La determinación de normalidad fue realizada mediante el test de Shapiro-Wilks evaluando cada tratamiento por separado si los grupos tenían $N > 6$, o sobre los residuos de los tratamientos en conjunto, utilizando un código personalizado escrito en lenguaje Python utilizando las librerías pandas y numpy (McKinney, 2010; Walt et al., 2011), si al menos un grupo poseía un $N \leq 6$. El estudio de varianza se realizó con el test de Fisher o el test de Levene. Se utilizaron pruebas paramétricas o no paramétricas dependiendo del

resultado del test de normalidad y varianza: test de t o test de Mann-Whitney para comparación entre 2 grupos; y ANOVA de una vía o test de Kruskal-Wallis para la comparación de 3 ó más grupos. Para el análisis de comparaciones múltiples de 3 o más grupos se utilizaron el test de Tukey *post hoc* y el test de Dunn *post hoc* para el análisis paramétrico y no paramétrico, respectivamente. La comparación de la complejidad del árbol axonal se realizó a partir de pruebas de Chi cuadrado. Las tasas de elongación, retracción, los tiempos de vida de las ramas axonales nuevas y las longitudes promedio por rama fueron cuantificados utilizando códigos personalizados en Python.

La significancia estadística se reporta en todos los casos con un $\alpha < 0.05$.

Resultados

Caracterización morfométrica de neuronas aferentes de la LL en desarrollo que sobreexpresan el canal de potasio hKir 2.1

Nuestro objetivo es determinar el rol de la AEE en el desarrollo de las NAs de la LLP. Para ello, se optó por realizar un abordaje experimental basado en el silenciamiento de NAs únicas mediante la expresión exógena del canal de potasio humano Kir2.1 (hKir2.1), que ha demostrado ser una potente herramienta para reducir la excitabilidad neuronal (Burrone et al., 2002). Estudiamos *in vivo* el establecimiento de los árboles axonales de las NAs que inervan el cerebro medio del pez, a partir de la expresión estocástica de la proteína fluorescente DsRed y del canal hKir2.1. Como resultado obtuvimos embriones con NAs únicas silenciadas y marcadas con DsRed. Realizamos un análisis estructural detallado de los árboles axonales centrales *in vivo* adquiriendo imágenes en un microscopio confocal.

Todos los registros sobre las NAs fueron adquiridos en vista dorsal sobre la cabeza del pez tal como muestra la Figura 14A. Esto nos permitió estudiar la proyección axonal central que inerva áreas superiores de procesamiento en el cerebro medio (Figura 14B).

Decidimos realizar nuestro análisis en dos estadios distintos del desarrollo del sistema aferente. Por un lado, analizamos el fenotipo de las NAs a los 3 dpf, cuando aún el sistema de la LL se encuentra inmaduro, y, por otro lado, a los 5 dpf, cuando el sistema se encuentra funcional, con neuronas establecidas en la periferia. Se procedió a analizar el fenotipo morfométrico de las neuronas salvajes (WT) y silenciadas (KIR) para ambos estadios.

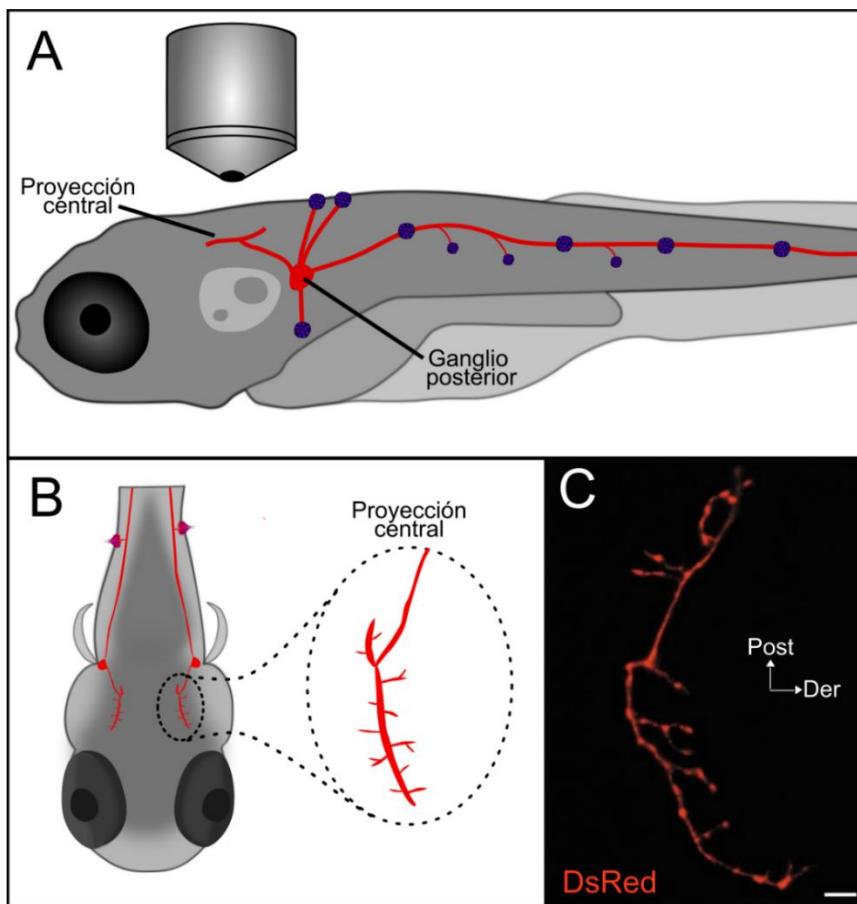


Figura 14: (A) Esquema de los componentes de la LLP en una larva de 5 dpf, representando las NAs en rojo y los NM en violeta. Se observa la proyección axonal central y el ganglio posterior donde se encuentran los cuerpos neuronales de las NAs. El objetivo representa la orientación de las adquisiciones. (B) Vista dorsal de una larva mostrando en detalle una proyección axonal central única. (C) Proyección en Z de una adquisición en vista dorsal de la proyección central de una NA única que expresa la proteína DsRed en una larva de 5 dpf. Barra de escala: 10 μ m.

Caracterización morfométrica de neuronas aferentes a los 3 dpf -

Estadío inmaduro de la LL

A partir de las proyecciones en Z de las imágenes adquiridas (ver “Materiales y Métodos”) en larvas de 3 dpf para cada tratamiento, WT y KIR, se obtuvieron trazados de las proyecciones centrales de las NAs (Figura 15). En primer lugar, observamos que tanto las NAs WT como las silenciadas habían desarrollado proyecciones centrales hacia el cerebro

medio del pez. Es decir que este silenciamiento no evitó que el axón central extienda sus ramas principales.

Analizamos la longitud total de la proyección central como la suma de la longitud del axón central y de las ramas del árbol axonal. Encontramos una disminución en la longitud total en las NAs silenciadas (Figura 16A. WT: $261.6 \pm 11.57 \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=14$; KIR: $214.8 \pm 8.40 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=16$; test de T, $**p=0.0025$). Al estudiar más en profundidad los componentes de dicha proyección, encontramos que esta disminución se explica por una reducción en la longitud del árbol axonal de las mismas (Figura 16B. WT: $89.21 \pm 7.03 \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=14$; KIR: $55.36 \pm 6.57 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=16$; test de T, $**p=0.0015$), no así en la longitud de su axón central (Figura 16C. WT: $172.4 \pm 5.63 \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=14$; KIR: $159.1 \pm 6.32 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=16$; test de T, $p=0.131$).

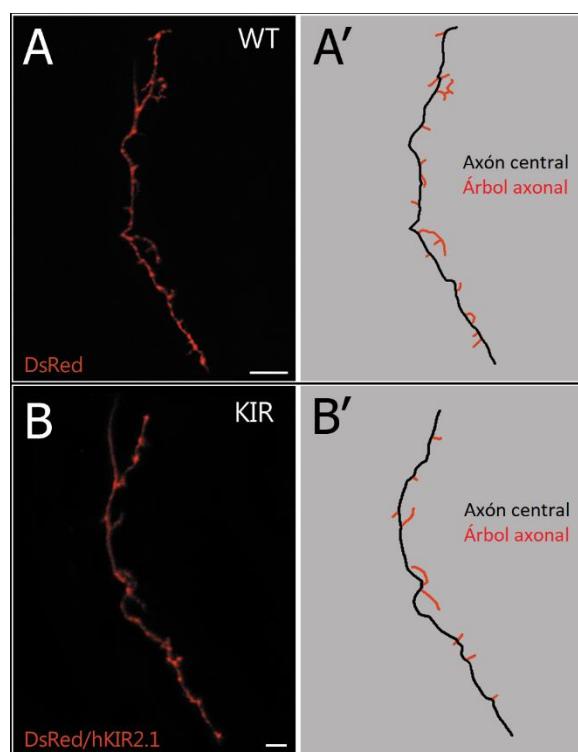


Figura 15: (A-B) Vista dorsal del cerebro medio de una larva a 3 dpf que expresan (A) DsRed (WT) y (B) DsRed/hKir2.1 (KIR) en una NA única. Las imágenes en A y B fueron convertidas en bidimensionales luego de su adquisición. (A'-B') Esqueletos representativos de las imágenes en A y B, discriminando los componentes principales de la proyección central: árbol axonal (rojo) y axón central (negro). Barra de escala: 10 μm .

Dado que las NAs silenciadas exhibieron proyecciones centrales de menor longitud, decidimos evaluar el área de cobertura de las NAs sobre el cerebro medio. Para ello, se trazó un polígono formado por la unión de los extremos de las ramas del árbol axonal (Figura 17A). Encontramos que el área de cobertura sobre el cerebro medio de las NAs silenciadas es menor con respecto a su control (Figura 17B. WT: $1399.03 \pm 88.73 \mu\text{m}^2$, $N_{\text{WT}}=14$; KIR: $1134.68 \pm 91.60 \mu\text{m}^2$, $N_{\text{KIR}}=16$; Test de T, $*p=0.0489$).

En resumen, nuestros resultados muestran que el silenciamiento de NAs únicas produce una disminución de la longitud de sus árboles axonales, y del área de cobertura en el cerebro medio a 3 dpf.

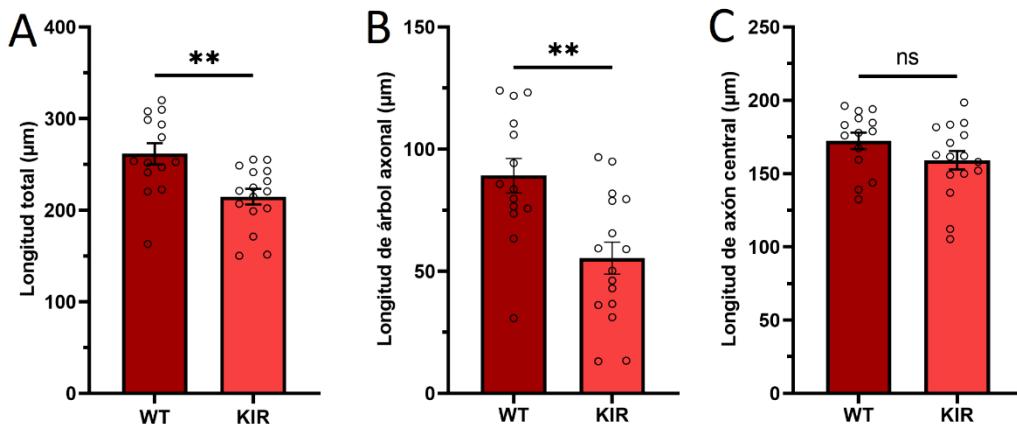


Figura 16: Las NAs silenciadas presentan una disminución en la longitud de sus árboles axonales a los 3 dpf. Cuantificación de (A) la longitud total de la proyección axonal en el cerebro medio, (B) el componente de la longitud de árbol axonal y (C) del axón central de una NA a 3 dpf que expresa DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. Test de T. $N_{\text{WT}}=14$; $N_{\text{KIR}}=16$. (A) **p=0.0025. (B) **p=0.0015. (C) p=0.131.

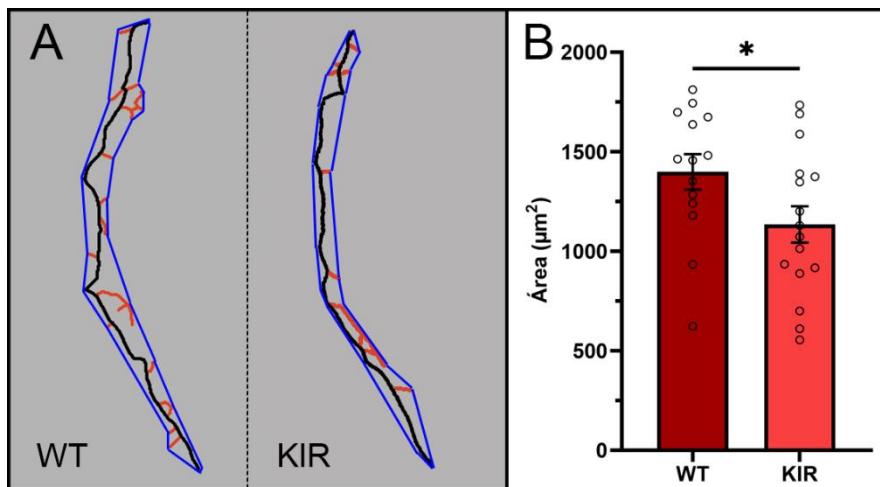


Figura 17: Las NAs exhiben una menor área de cobertura en el cerebro medio a 3 dpf. (A) Esqueletos representativos de la proyección axonal de NAs a 3 dpf que expresan DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR). Las líneas azules representan el polígono a partir del cual se midió el área de cobertura sobre el cerebro medio. (B) Área de cobertura de una NA que expresa DsRed (WT) y silenciada (KIR). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. Test de T. $N_{\text{WT}}=14$; $N_{\text{KIR}}=16$. * $p=0.0489$.

La longitud del árbol axonal está determinada como la suma de la longitud de todas sus ramas axonales, es decir que depende de dos factores: la cantidad de ramas que protruyen del axón central, y la longitud individual de cada una de ellas. Para determinar cuál de estos parámetros fue afectado por el silenciamiento de la AEE, empezamos por medir las longitudes de las ramas del árbol axonal y determinar un valor de mediana por neurona. No observamos cambios en las longitudes individuales de las ramas entre los fenotipos de las neuronas WT y las silenciadas con hKir2.1 (Figura 18. WT: 4.32(0.94) μm , $N_{\text{WT}}=14$; KIR: 3.81(1.46) μm , $N_{\text{KIR}}=16$; Test de Mann-Whitney, $p=0.559$). Posteriormente, realizamos una cuantificación del número de ramas presentes en el árbol axonal para ambos tratamientos. Encontramos que las NAs silenciadas presentaron una menor cantidad de ramas con respecto al fenotipo WT (Figura 19A. WT: 17.0(7.5), $N_{\text{WT}}=14$; KIR: 10.0(6.0), $N_{\text{KIR}}=16$, Test de Mann-Whitney, *** $p=0.0004$). Con el fin de profundizar la caracterización del fenotipo KIR, decidimos estudiar la complejidad que presentan los árboles axonales. Para ello, dividimos las ramas en dos categorías: primarias y secundarias. Las ramas primarias son aquellas que

protruyen directamente del axón central y las ramas secundarias son aquellas que protruyen desde las primarias (Figura 19B). Cuantificamos ambos tipos de ramas por neurona y encontramos que las NAs silenciadas presentan una disminución tanto de las ramas primarias (Figura 19C. WT: 15.0(5.5), $N_{WT}=14$; KIR: 8.5(6.0), $N_{KIR}=16$; Test de Mann-Whitney, *** $p=0.0002$) como de las ramas secundarias (Figura 19D. WT: 2(2.5), $N_{WT}=14$; KIR: 0(2.0), $N_{KIR}=16$; Test de Mann-Whitney, * $p=0.0140$). Por último, en los casos donde las ramas primarias tenían ramas secundarias, se realizó un análisis de la distribución de ramificaciones por rama primaria y se observó que, en ambos tratamientos, cerca de un 80% de las ramas primarias presentaron solo dos ramas secundarias y el 20% restante más de dos (Figura 19E. WT: 2=78.80%, $>2=22.20%$, $N_{WT}=18$; KIR: 2=83.30%, $>2=16.70%$, $N_{KIR}=12$; Test de Chi cuadrado, $p>0.999$). Esta diferencia no resultó significativa, es decir, que, si bien las NAs silenciadas poseen menor cantidad de ramas secundarias, no hay cambios en la complejidad de cada grupo de ramificaciones.

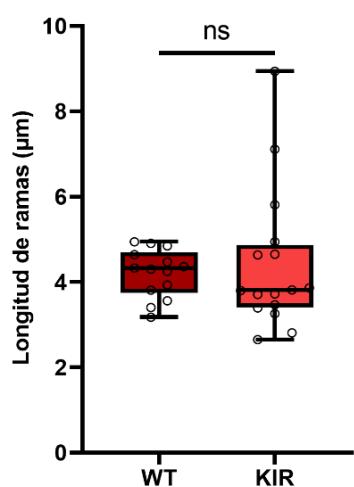


Figura 18: A los 3 dpf, las neuronas silenciadas con hKir2.1 no presentan cambios en la longitud de las ramas de sus árboles axonales con respecto al control. Longitud individual de ramas del árbol axonal en NAs a 3 dpf que expresan DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR). Gráfico de cajas mostrando la mediana, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa la mediana por neurona. Test de Mann-Whitney. $N_{WT}=14$; $N_{KIR}=16$. $p=0.559$.

En resumen, observamos que, a los 3 dpf, las NAs silenciadas exhiben árboles axonales centrales de menor longitud, lo que se traduce en una disminución del área de cobertura sobre el cerebro medio. Además, encontramos una menor complejidad en el árbol axonal explicada por una disminución en el número de ramas, tanto primarias como secundarias. A

partir de este análisis concluimos que, en estadios del desarrollo cuando la LL aún está inmadura, la AEE es necesaria para el correcto crecimiento y formación de los árboles axonales centrales.

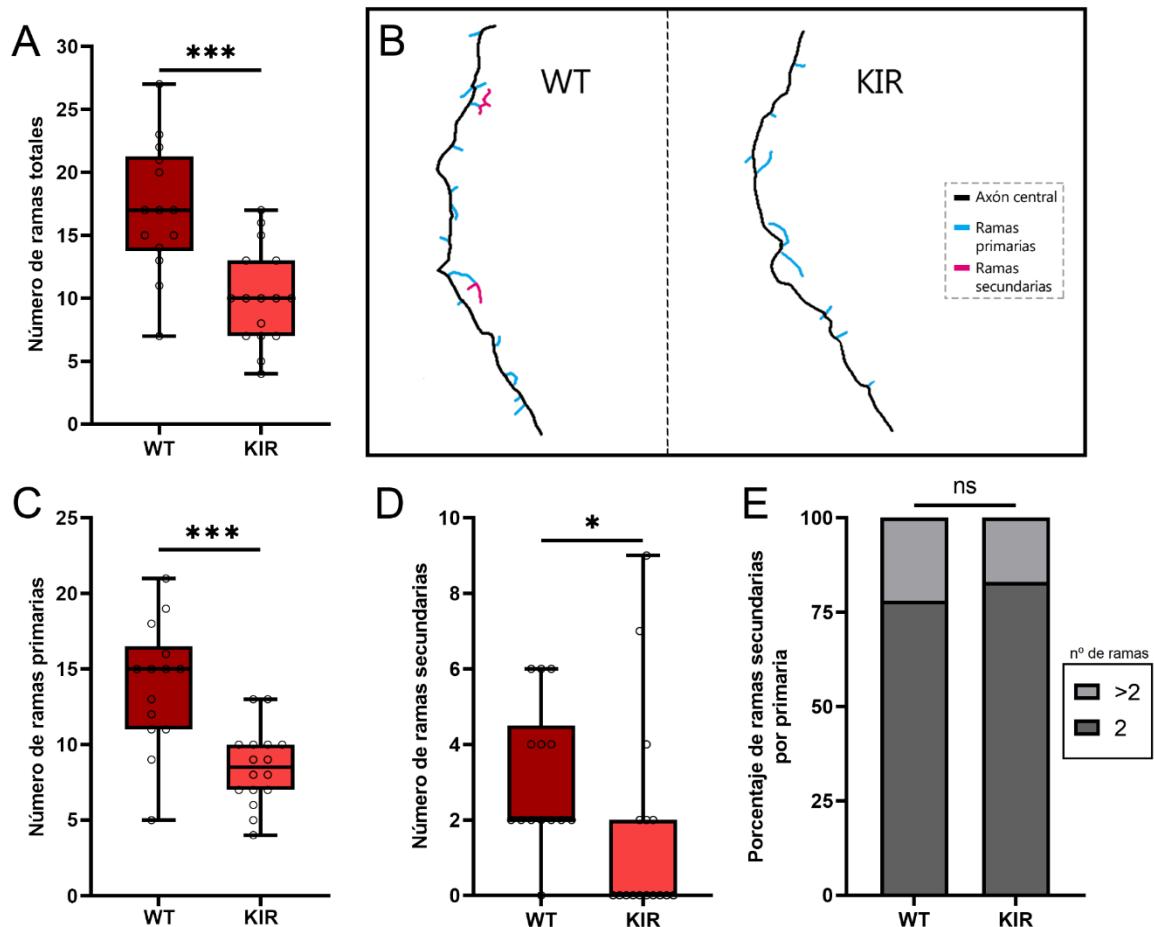


Figura 19: A 3 dpf, los árboles axonales de las NAs que expresan hKir2.1 exhiben una disminución en su complejidad dado por la reducción en el número de ramas primarias y secundarias. (A) Número de ramas totales presentes en el árbol axonal de las NAs WT y silenciadas con hKir2.1. (B) Categorización de las ramificaciones totales en primarias y secundarias sobre los esqueletos de las proyecciones centrales de las NAs, mostrando el axón central (negro), del cual se extienden las ramas primarias (cian), y las ramas secundarias como bifurcaciones subsiguientes extendiéndose desde las primarias (magenta). (C) Cuantificación del número de ramas primarias por cada proyección central de las NAs. (D) Cuantificación del número de ramas secundarias por cada proyección central de las NAs. (E) Análisis de la distribución de ramas secundarias por cada rama primaria. El N total corresponde a la cantidad de ramas primarias que presentan al menos dos ramas secundarias. (A, C, D) Los gráficos de cajas muestran la mediana, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. Test de Mann-Whitney. $N_{WT}=14$, $N_{KIR}=16$. (A) *** $p=0.0004$. (C) *** $p=0.0002$. (D) * $p=0.0140$. (E) Test de Chi cuadrado. $N_{WT}=18$, $N_{KIR}=12$. $p>0.999$.

Caracterización morfométrica de neuronas aferentes a los 5 dpf - Estadío maduro de la LL

Luego de haber estudiado el efecto de silenciar la AEE en NAs inmaduras, decidimos analizar qué sucede a 5 dpf, cuando el sistema de la LL ya está establecido y el animal responde a estímulos externos.

Analizamos las proyecciones centrales de las NAs a 5 dpf para los tratamientos WT y KIR (Figura 20) de la misma manera que a los 3 dpf. Decidimos agregar al análisis un tercer tratamiento con un plásmido control, el cual expresa hKir2.1 con una mutación de pérdida de función (hKirMut2.1) para corroborar que el fenotipo observado se debe a la hiperpolarización causada por la activación de los canales hKir2.1.

Procedimos a medir la longitud total de las proyecciones centrales y encontramos, nuevamente, que las NAs silenciadas exhiben proyecciones centrales menos extensas (Figura 21A. WT: $258.0 \pm 10.20 \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=16$; KIR: $221.8 \pm 8.45 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=25$; KIRm: $269.9 \pm 10.65 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIRm}}=12$; ANOVA de una vía, $**p=0.0019$, Test de Tukey *post hoc*). Esta disminución se explica por una reducción en la longitud de los árboles axonales (Figura 21B. WT: $88.97 \pm 7.47 \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=16$; KIR: $62.76 \pm 4.89 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=25$; KIRm: $94.31 \pm 9.13 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIRm}}=12$; ANOVA de una vía, $**p=0.002$, Test de Tukey *post hoc*), mientras que la longitud del axón central no presentó diferencias significativas (Figura 21C. WT: $169.1 \pm 4.55 \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=16$; KIR: $151.1 \pm 5.719 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=25$; KIRm: $175.6 \pm 2.97 \mu\text{m}$, $N_{\text{KIRm}}=12$, ANOVA de una vía, $p=0.102$, Test de Tukey *post hoc*).

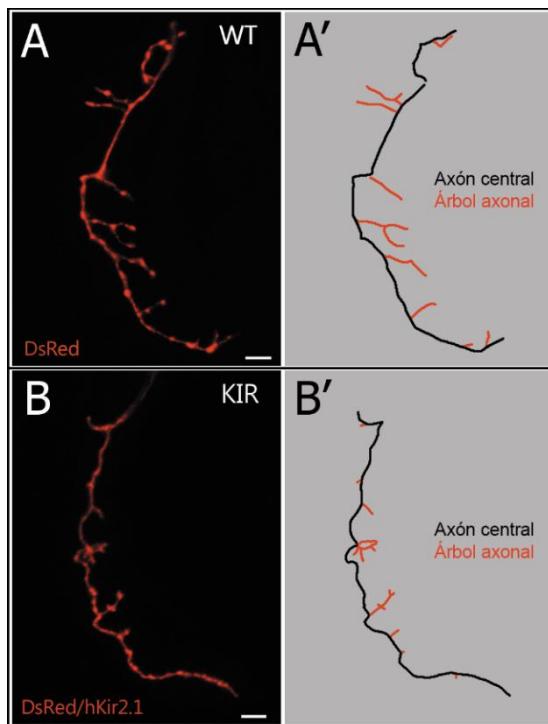


Figura 20: (A-B) Vista dorsal del cerebro medio de una larva a 5 dpf que expresa (A) DsRed (WT) y (B) DsRed/hKir2.1 (KIR) en una NA única. Las imágenes en A y B fueron convertidas en bidimensionales luego de su adquisición. (A'-B') Esqueletos representativos de las imágenes en A y B, discriminando los componentes principales de la proyección central: árbol axonal (rojo) y axón central (negro). Barra de escala: 10 μ m.

Al igual que lo observado a 3 dpf, la disminución de la longitud del árbol axonal se vio acompañada por una reducción en el área de inervación sobre el cerebro medio (Figura 22. WT: $1609.62 \pm 116.93 \mu\text{m}^2$, $N_{\text{WT}}=16$; KIR: $1163.26 \pm 71.969 \mu\text{m}^2$, $N_{\text{KIR}}=25$; KIRm: $1510.47 \pm 82.28 \mu\text{m}^2$, $N_{\text{KIRm}}=12$, ANOVA de una vía, $**p=0.0013$, Test de Tukey *post hoc*). Al medir las longitudes individuales de las ramas del árbol axonal encontramos que, a diferencia de lo observado a los 3 dpf, las NAs silenciadas presentan ramas más cortas que las NAs WT (Figura 23. WT: $5.27(2.93) \mu\text{m}$, $N_{\text{WT}}=16$; KIR: $3.79(1.40) \mu\text{m}$, $N_{\text{KIR}}=25$; KIRm: $4.43(2.32) \mu\text{m}$, $N_{\text{KIRm}}=12$, Test de Kruskal-Wallis, $**p=0.0035$, Test de Dunn *post hoc*). Por otro lado, es importante destacar que no observamos diferencias significativas entre las longitudes de las ramas de las NAs silenciadas a los 5 dpf y las NAs WT a los 3 dpf (Figura 23 Anexo. Test de Mann-Whitney, $p=0.0869$).

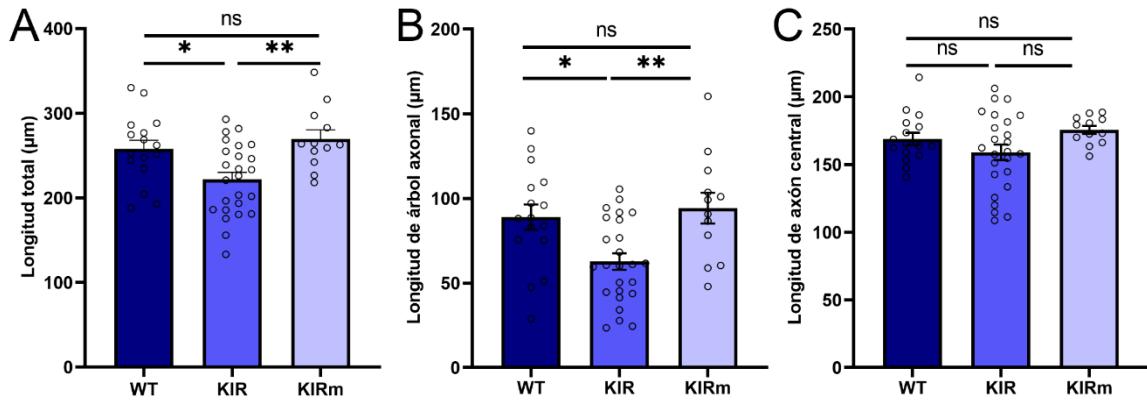


Figura 21: A los 5 dpf, las NAs silenciadas presentan una disminución en la longitud de sus árboles axonales centrales. Cuantificación de (A) la longitud total de la proyección axonal en el cerebro medio, (B) el componente de la longitud de árbol axonal y (C) del axón central de una NA a 5 dpf que expresa DsRed (WT), DsRed/hKir2.1 (KIR) y DsRed/hKirMut2.1 (KIRm). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. ANOVA de una vía, test de Tukey post hoc. (A) WT vs KIR: $*p=0.020$; KIR vs KIRm: $**p=0.0042$; WT vs KIRm: $p=0.727$. (B) WT vs KIR: $*p=0.0135$; KIR vs KIRm: $**p=0.0061$; WT vs KIRm: $p=0.871$. (C) $p=0.102$.

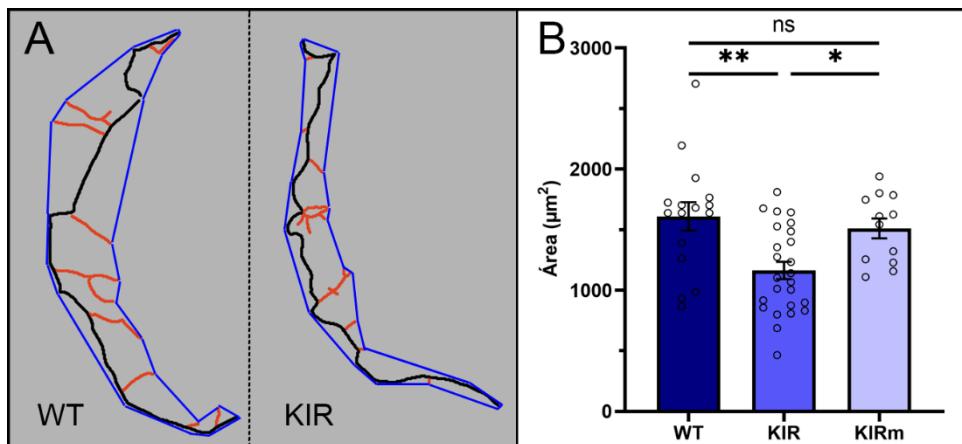


Figura 22: El silenciamiento de las NAs de la LL produce una disminución del área de cobertura en el cerebro medio a los 5 dpf. (A) Esqueletos representativos de la proyección axonal de una NA a 5 dpf que expresa DsRed (WT) o DsRed/hKir2.1 (KIR) desde una vista dorsal. Las líneas azules representan el polígono a partir del cual se midió el área de cobertura sobre el cerebro medio. (B) Área de cobertura de una NA WT, silenciada (KIR) y control (KIRm). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. ANOVA de una vía y test de Tukey post hoc. WT vs KIR: $**p=0.0018$; KIR vs KIRm: $*p=0.033$; WT vs KIRm: $p=0.776$.

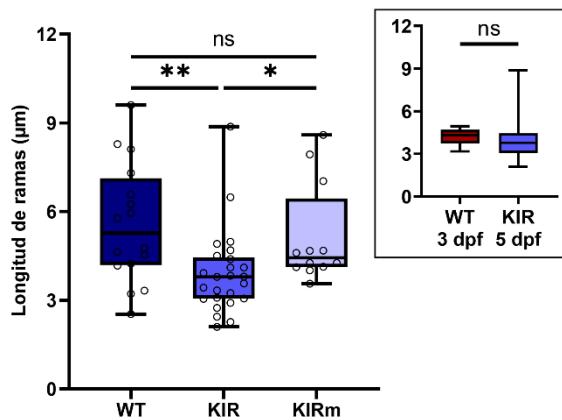


Figura 23: A los 5 dpf, los árboles axonales de las NAs silenciadas exhiben ramas más cortas que los controles. Longitud individual de las ramas del árbol axonal de NAs de 5 dpf que expresan DsRed (WT), hKir2.1 (KIR) y hKirMut2.1 (KIRm). Test de Kruskal-Wallis, Test de Dunn *post hoc*. **WT vs KIR**: ** $p=0.0069$; **KIR vs KIRm**: * $p=0.047$; **WT vs KIRm**: $p>0.999$. Anexo: Longitud individual de ramas del árbol axonal de NAs WT a 3 dpf y de NAs silenciadas a 5 dpf (KIR). Test de Mann-Whitney, $p=0.0869$. Gráfico de cajas mostrando la mediana, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa la mediana por neurona.

Cuando analizamos los árboles axonales de las NAs a 5 dpf encontramos que no existen diferencias significativas entre las WT y las silenciadas al comparar la cantidad de ramas totales (Figura 24A. WT: 13.0(5.0), $N_{WT}=16$; KIR: 14.0(10.0), $N_{KIR}=25$; KIRm: 14.5(7.0), $N_{KIRm}=12$, Test de Kruskal-Wallis, $p=0.418$), el número de ramas primarias (Figura 24C. WT: 10.5(4.5), $N_{WT}=16$; KIR: 11.0(4.5), $N_{KIR}=25$; KIRm: 12.0(5.3) μm , $N_{KIRm}=12$, Test Kruskal-Wallis, $p=0.383$) y el número de ramas secundarias (Figura 24D. WT: 2(4.0), $N_{WT}=16$; KIR: 2(6.0), $N_{KIR}=25$; KIRm: 3(6), $N_{KIRm}=12$; Test de Kruskal-Wallis, $p=0.798$). Sin embargo, al analizar la población de ramas primarias que presentan ramas secundarias, encontramos que las NAs silenciadas presentan un mayor porcentaje de ramas primarias que poseen más de dos ramas secundarias (Figura 24E. WT: 2=82.00%, >2=18.00%, $N_{WT}=17$; KIR: 2=61.54%, >2=38.46%, $N_{KIR}=26$; KIRm: 2=87.50%, >2=12.50%, $N_{KIRm}=16$, Test de Chi cuadrado).

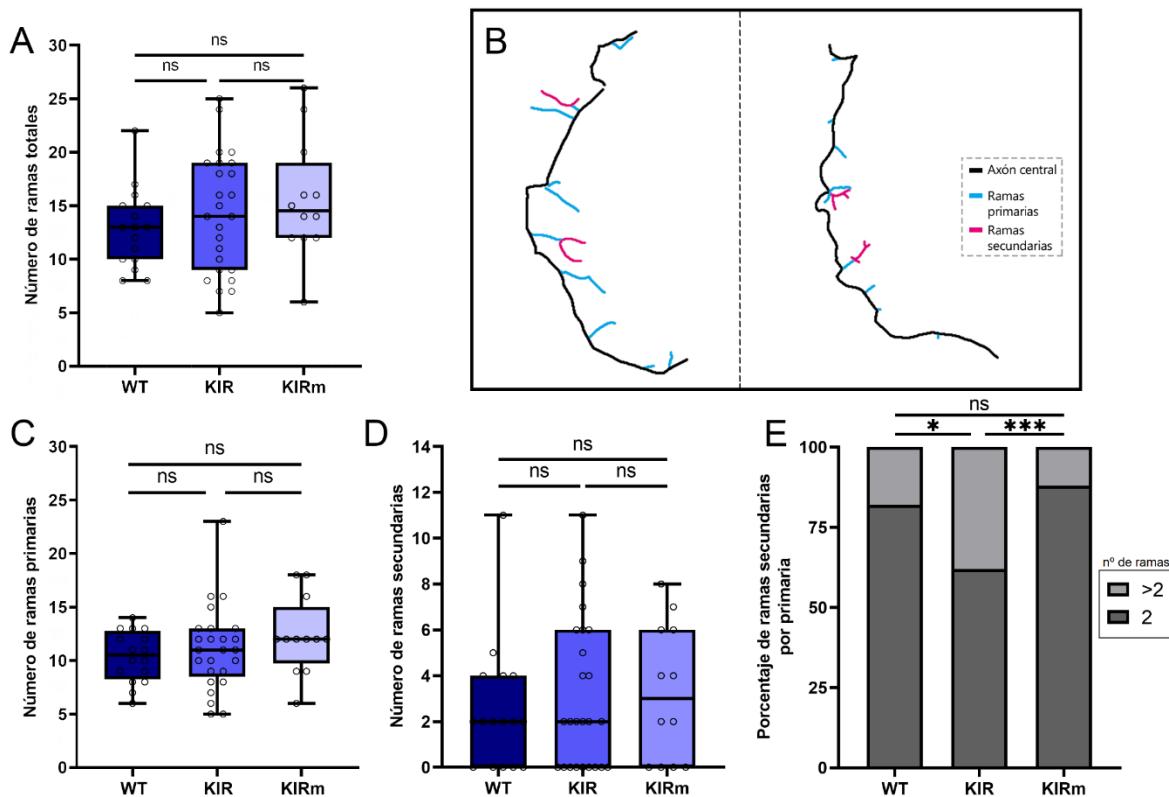


Figura 24: A los 5 dpf, la complejidad del árbol axonal de las NAs que expresan hKir2.1 se ve aumentada debido a una mayor densidad de ramas secundarias por rama primaria. (A) Número de ramas totales presentes en el árbol axonal de las NAs WT y silenciadas con Kir2.1 a los 5 dpf. (B) Categorización de las ramificaciones totales en primarias y secundarias sobre los esqueletos de las proyecciones centrales de las NAs, mostrando el axón central (negro), del mismo se extiende las ramas primarias (cian), y las ramas secundarias como bifurcaciones subsiguientes extendiéndose desde las primarias (magenta). (C) Cuantificación del número de ramas primarias por cada proyección central de las NAs. (D) Cuantificación del número de ramas secundarias por cada proyección central de las NAs. (E) Análisis de la distribución de ramas secundarias por cada rama primaria. El N total corresponde a la cantidad de ramas primarias que presentan al menos una bifurcación. (A, C, D) Gráficos de cajas muestran la mediana, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa a una neurona. Test de Kruskal-Wallis (A) $p=0.418$. (C) $p=0.383$. (D) $p=0.798$. (E) Test de Chi cuadrado, WT vs KIR: * $p=0.017$; KIR vs KIRm: *** $p=0.0007$; WT vs KIRm: $p=0.994$.

En resumen, la reducción en la longitud de las ramas presentes en el árbol axonal sería suficiente para explicar la disminución de la longitud total y del área de cobertura sobre el cerebro medio en aquellas neuronas que expresan el canal hKir2.1. Sin embargo, también encontramos grupos de ramas secundarias distribuidas con una mayor densidad sobre las ramas primarias que les dan origen.

En conclusión, al privar a las NAs de su capacidad de excitabilidad mediante la expresión de hKir2.1, encontramos una alteración del crecimiento de sus árboles axonales centrales tanto en estadios inmaduros como maduros de la LL. Por un lado, en el estadio inmaduro de 3 dpf, se observa un déficit de ramas, y, por otro lado, en el estadio maduro de 5 dpf, encontramos ramas de menor longitud, así como también ramas primarias bifurcadas de manera exacerbada, no consistente con el fenotipo WT.

Estudio de varicosidades en NAs silenciadas

Trabajos previos han descrito la presencia de varicosidades en NAs de LL (Valera et al., 2021) y de otros sistemas sensoriales (Meyer & Smith, 2006), las cuales colocalizan con marcadores presinápticos. Definimos a las varicosidades como engrosamientos que se visualizan en la membrana de las neuronas. En los registros adquiridos por *time-lapse imaging* a 5 dpf pudimos observar estas varicosidades como acumulación de la proteína fluorescente DsRed. Con el objetivo de entender si el silenciamiento de la AEE afecta la expresión de estos engrosamientos, cuantificamos el número de varicosidades presentes en las proyecciones centrales de NAs WT y silenciadas. En la Figura 25, podemos observar imágenes representativas de las proyecciones centrales para NAs WT y KIR en una larva de 5 dpf (Figura 25A, 25B). Trabajando con los esqueletos de dichas NAs, pudimos discriminar entre las varicosidades observadas sobre el axón central y aquellas observadas sobre el árbol axonal (Figura 25A', 25B').

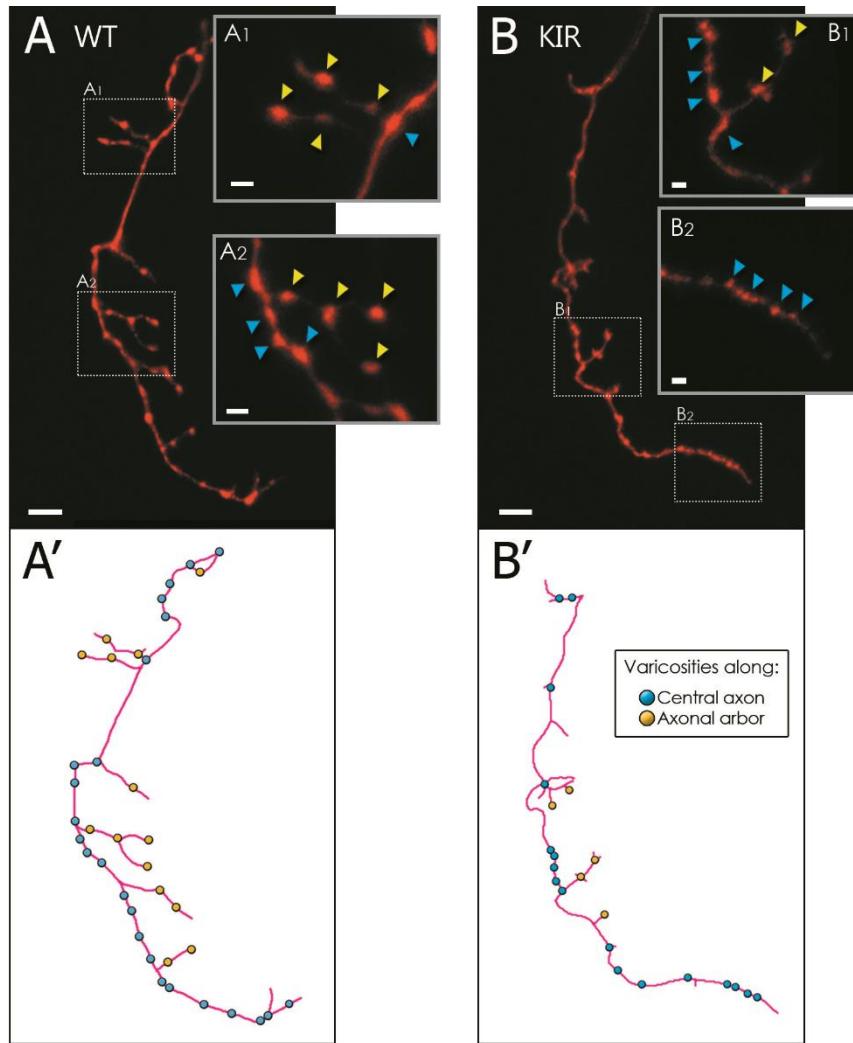


Figura 25: (A-B) Vista dorsal del cerebro medio de una NA a 5 dpf que expresa (A) DsRed (WT) y (B) DsRed/hKir2.1 (KIR). Barra de escala: 10 μ m. Los paneles A1-A2 y B1-B2 muestran con más detalle las varicosidades de las NA. Las puntas de flecha celestes y amarillas muestran aquellas varicosidades ubicadas en el axón central y en el árbol axonal, respectivamente. Barra de escala: 2 μ m. (A'-B') Esqueletos representativos de las imágenes en A y B. Los puntos celestes y amarillos corresponden a las varicosidades encontradas en el axón central y en el árbol axonal respectivamente.

Encontramos una disminución en el número total de varicosidades sobre las proyecciones centrales de las NAs silenciadas con respecto al WT (Figura 26A. WT: $0.145 \pm 0.0053 \mu\text{m}^{-1}$, $N_{\text{WT}}=18$; KIR: $0.113 \pm 0.0082 \mu\text{m}^{-1}$, $N_{\text{KIR}}=25$. Test de T, $**p=0.0041$). Al analizar únicamente las varicosidades del axón central, no observamos diferencias significativas entre NAs WT y silenciadas (Figura 26B. WT: $0.132 \pm 0.0064 \mu\text{m}^{-1}$, $N_{\text{WT}}=18$; KIR: $0.116 \pm 0.0084 \mu\text{m}^{-1}$, $N_{\text{KIR}}=25$. Test de T, $p=0.163$). Sin embargo, encontramos que las NAs silenciadas

presentaron una disminución en el número de varicosidades sobre el árbol axonal, respecto de las NAs WT (Figura 26C. WT: 0.169 ± 0.0076 , $N_{WT}=18$; KIR: 0.104 ± 0.0121 , $N_{KIR}=25$. Test de T, ***p=0.0002).

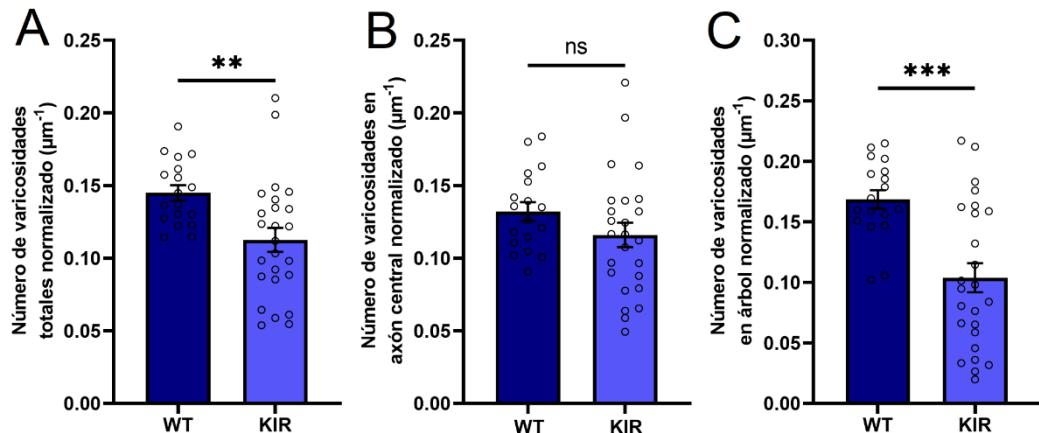


Figura 26: El número de varicosidades totales sobre las NAs silenciadas a los 5 dpf presentan una disminución, debido a una reducción en las varicosidades ubicadas en el árbol axonal. (A-C) Número de varicosidades normalizado para el tratamiento WT y KIR, ubicadas sobre (A) la proyección central total, (B) el axón central y (C) el árbol axonal. Cada medición fue normalizada a la longitud correspondiente para su comparación. Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. Test de T. $N_{WT}=18$, $N_{KIR}=25$. (A) **p=0.0041; (B) p=0.163; (C) ***p=0.0002.

Previamente, se demostró que existe una correlación entre la presencia de varicosidades en las puntas de las ramas y el arresto de la retracción, al incrementar la estabilidad de dichas ramas (Meyer & Smith, 2006). Cuantificamos la proporción de varicosidades ubicadas en los extremos de las ramas del árbol axonal y observamos una disminución en aquellos árboles silenciados (Figura 27. WT: 0.631(0.41), $N_{WT}=18$; KIR: 0.194(0.41), $N_{KIR}=25$. Test de Mann-Whitney, **p=0.001).

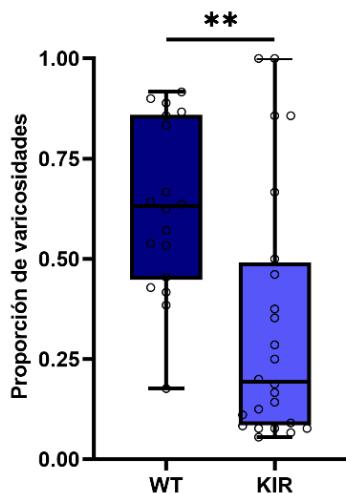


Figura 27: Se observa una disminución en la proporción de ramas axonales con presencia de varicosidades en sus extremos. Proporción de varicosidades ubicadas sobre los extremos de las ramas de los árboles axonales de las NAs a los 5 dpf para el tratamiento WT y KIR (nº de varicosidades / nº total de extremos). Gráfico de cajas mostrando la mediana, los valores máximos y mínimos y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa una neurona. Test de Mann-Whitney. $N_{WT}=18$, $N_{KIR}=25$. **WT vs KIR**: **p=0.001.

En conclusión, encontramos una deficiencia en el número de varicosidades ubicadas a lo largo del árbol axonal en NAs silenciadas y contabilizamos una menor proporción de varicosidades en los extremos de las ramas.

Estudio de la dinámica de crecimiento de las proyecciones centrales de NAs en desarrollo que sobreexpresan el canal de potasio hKir 2.1

Luego de haber hecho una caracterización morfológica de las NAs y sus varicosidades, decidimos estudiar la dinámica de crecimiento del árbol axonal de estas neuronas, para evaluar el rol que cumple la AEE en ambos estadios del desarrollo. Para ello, realizamos un seguimiento en el tiempo de las proyecciones centrales. Este análisis se llevó a cabo comparando los 5 tratamientos (3WT, 3KIR, 5WT, 5KIR y 5KIRm) en conjunto ya que no solo estamos interesados en comparar tratamientos dentro de cada estadio, sino que nos interesa poder detectar similitudes y diferencias entre los árboles WT a 3 dpf y los silenciados a 5 dpf.

Observamos cuatro eventos de motilidad presentes en el árbol axonal: por un lado, eventos de elongación y retracción (es decir, estiramiento y acortamiento) de ramas, y, por otro lado, eventos de formación y eliminación (es decir, aparición y desaparición) de ramas a lo largo de todo el registro (Figura 28).

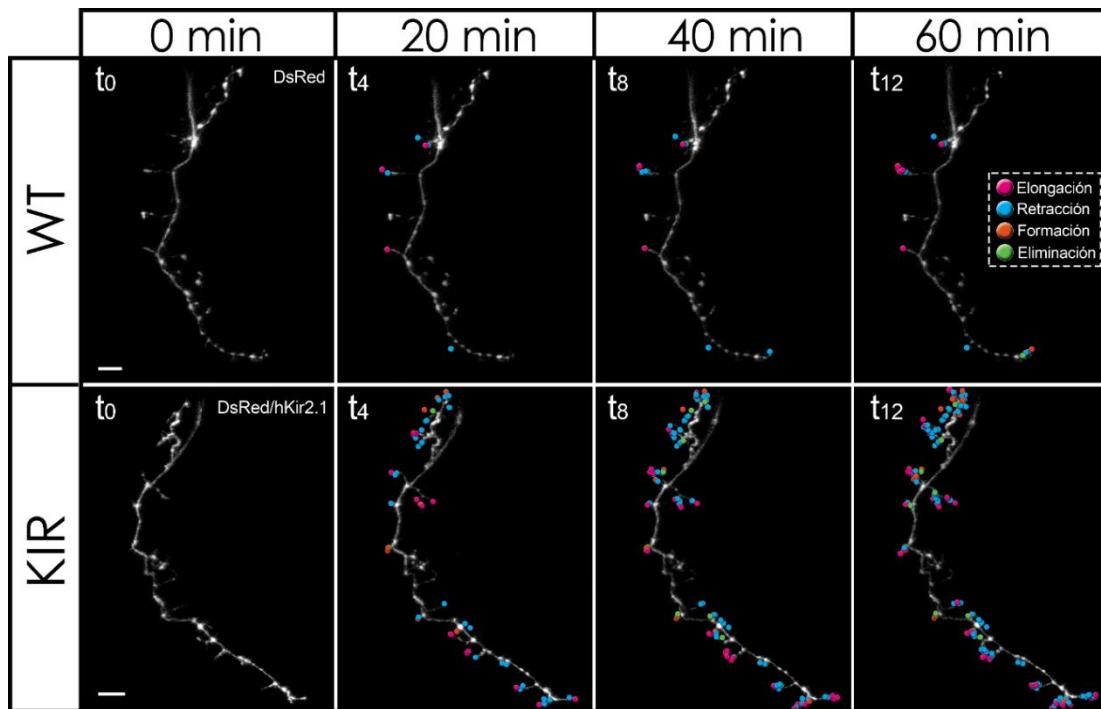


Figura 28: Serie de imágenes en vista dorsal de NAs a 5 dpf que expresan DsRed (WT) o DsRed/hKir2.1 (KIR). t₀, t₄, t₈ y t₁₂ corresponden a tiempos representativos del registro: 0, 20, 40 y 60 minutos, respectivamente. Los puntos coloreados representan eventos individuales de motilidad: elongación (magenta), retracción (cian), formación (rojo) y eliminación (verde). Los eventos detectados se marcaron individualmente en cada foto y se presentan solapados a medida que pasa el tiempo. Aquellas ramas donde no se encontraron eventos de motilidad durante toda la hora de registro, permanecen sin puntos. A t₁₂ se visualizan todos los eventos a lo largo del registro. Barra de escala: 10 μm.

El plugin *NeuronJ* (Meijering et al., 2004) dentro del software *ImageJ*, nos permitió medir la longitud individual de las ramas en cada tiempo y realizar el seguimiento de cada una de ellas. Calculamos la motilidad total normalizada por neurona, medido como la suma de la longitud total recorrida por la punta de las ramas y normalizada a la longitud de cada árbol axonal al comienzo del registro. Para este análisis se tomaron en cuenta la totalidad de ramas a t₀ y aquellas que se formaron a lo largo del registro.

Encontramos una exacerbación en la motilidad total normalizada en aquellas NAs silenciadas tanto a 3 como a 5 dpf (Figura 29A: 3WT: 2.64 ± 0.29 ; $N_{3WT}=8$; 3KIR: 3.89 ± 0.40 , $N_{3KIR}=5$; 5WT: 0.59 ± 0.22 , $N_{5WT}=6$; 5KIR: 2.00 ± 0.21 , $N_{5KIR}=9$; 5KIRm: 0.68 ± 0.20 , $N_{5KIRm}=9$. ANOVA de una vía, ****p<0.0001, Test de Tukey *post hoc*). Con el fin de entender si hay mayor cantidad de ramas en movimiento, definimos “ramas consistentes” como aquellas ramas que se ven en t_0 y no presentan ningún evento de motilidad a lo largo del registro y las cuantificamos para todos los tratamientos. Encontramos que el porcentaje de ramas consistentes por neurona disminuye abruptamente en NAs silenciadas a los 5 dpf, reduciéndose de un 70% a un 25% (Figura 29B. 3WT: $19.15 \pm 4.02\%$, $N_{3WT}=8$; 3KIR: $4.48 \pm 2.15\%$, $N_{3KIR}=5$; 5WT: $70.93 \pm 6.45\%$, $N_{5WT}=6$; 5KIR: $24.11 \pm 4.13\%$, $N_{5KIR}=9$; 5KIRm: $63.08 \pm 8.34\%$, $N_{5KIRm}=9$. ANOVA de una vía, ****p<0.0001, Test de Tukey *post hoc*).

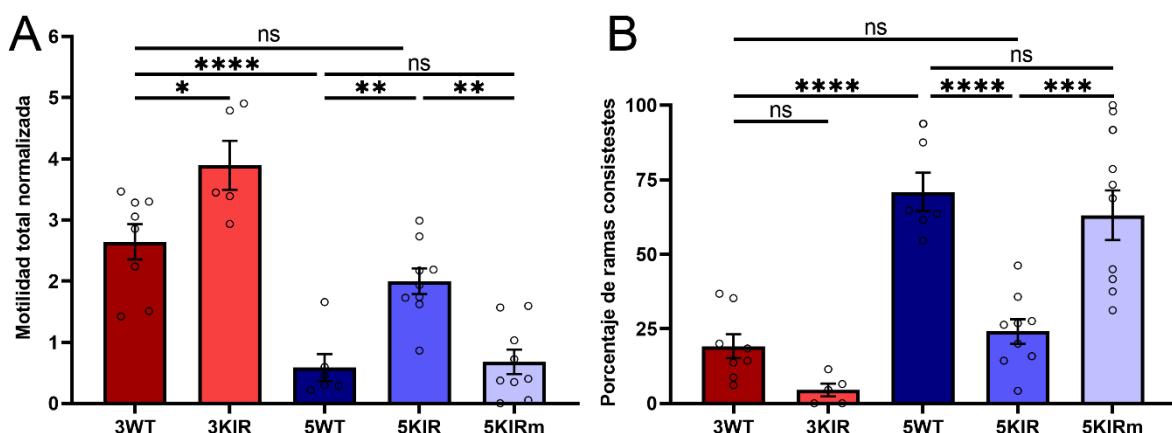


Figura 29: Las NAs silenciadas de la LL exhiben una motilidad exacerbada explicada, en parte, por una disminución del porcentaje de ramas consistentes. (A) Motilidad total normalizada al árbol axonal de cada una de las NAs al comienzo del registro y (B) porcentaje de ramas consistentes (aquellas que no presentan movimientos a lo largo de todo el registro) en NAs a 3 y 5 dpf que expresan DsRed (WT), DsRed/hKir2.1 (KIR) o el control (KIRm). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. ANOVA de una vía, test de Tukey *post hoc*. $N_{3WT}=8$; $N_{3KIR}=5$, $N_{5WT}=6$, $N_{5KIR}=9$, $N_{5KIRm}=9$. (A) **3WT vs 3KIR**: *p=0.026; **3WT vs 5WT**: ****p<0.0001; **5WT vs 5KIR**: **p=0.0044; **5KIR vs 5KIRm**: **p=0.0027; **3WT vs 5KIR**: p=0.329; **5WT vs 5KIRm**: p= 0.999. (B) **3WT vs 3KIR**: p=0.521; **3WT vs 5WT**: ****p<0.0001; **5WT vs 5KIR**: ****p<0.0001; **5KIR vs 5KIRm**: ***p=0.0001; **3WT vs 5KIR**: p=0.969; **5WT vs 5KIRm**: p= 0.889.

Nuestros resultados muestran que, como era esperado, las neuronas WT en el estadio inmaduro presentan árboles altamente mótiles, mientras que, en el estadio maduro, dicha motilidad desciende. Sin embargo, observamos que las NAs silenciadas presentan un incremento en la motilidad del árbol axonal en ambos estadios. El incremento de motilidad a 5 dpf está acompañado por un mayor porcentaje de ramas que sufren algún evento de motilidad, no así en el estadio de 3 dpf. Llamativamente, observamos una gran similitud entre los fenotipos de las NAs silenciadas a los 5 dpf y WT a 3 dpf. A partir de estos resultados, evidenciamos una desregulación en la dinámica de crecimiento de las NAs silenciadas con respecto a las WT en ambos estadios estudiados.

Análisis de los eventos de motilidad

Con el fin de observar cuáles son las implicancias de silenciar NAs sobre la dinámica de crecimiento de los árboles axonales centrales, analizamos los eventos de formación y eliminación de ramas, por un lado, y de elongación y retracción por otro, ya que ambos fenómenos involucran mecanismos diferentes.

Eventos de formación y eliminación

Para el estudio de los eventos de formación y eliminación, cuantificamos las tasas de eventos normalizadas a la longitud inicial del árbol axonal. Observamos un aumento de ambas tasas tanto a 3 dpf (Figura 30A. **Formación** (en μm^{-1}): 3WT: 0.261 ± 0.0386 ; 3KIR: 0.416 ± 0.0291 . Figura 30B. **Eliminación** (en μm^{-1}): 3WT: 0.211 ± 0.0319 ; 3KIR: 0.367 ± 0.0367 ; $N_{3\text{WT}}=8$, $N_{3\text{KIR}}=5$) como a 5 dpf (Figura 30A. **Formación** (en μm^{-1}): 5WT: 0.0480 ± 0.0143 ; 5KIR: 0.171 ± 0.018 ; 5KIRm: 0.0544 ± 0.0157 . Figura 30B. **Eliminación** (en μm^{-1}): 5WT: 0.0341 ± 0.0097 ; 5KIR: 0.143 ± 0.0158 ; 5KIRm: 0.0487 ± 0.0165 ; $N_{5\text{WT}}=6$, $N_{5\text{KIR}}=9$, $N_{5\text{KIRm}}=9$).

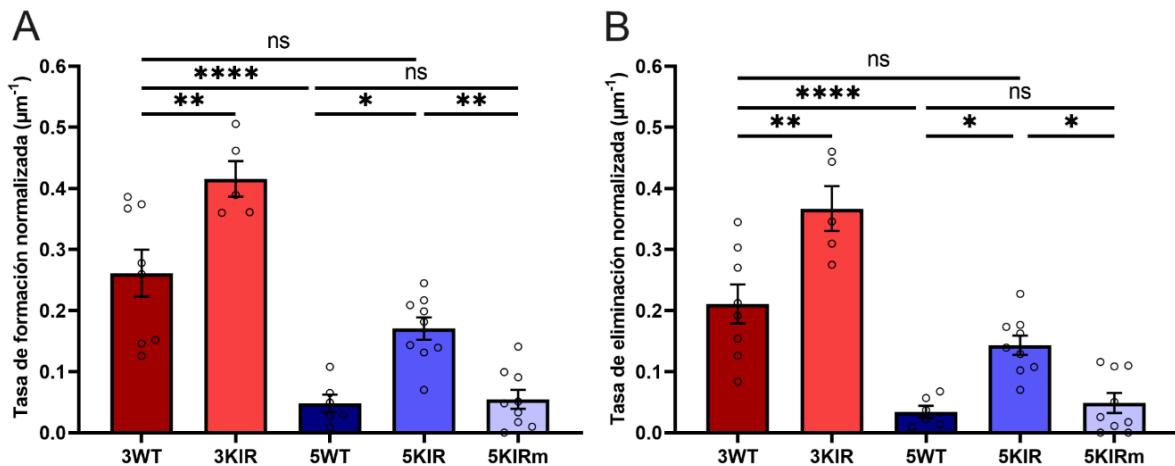


Figura 30: Tanto a 3 como a 5 dpf, las tasas de formación y eliminación se encuentran aumentadas en aquellas NAs silenciadas con respecto a su control. (A-B) Tasas de (A) formación y (B) eliminación normalizadas al árbol axonal de cada una de las NAs que expresan DsRed (WT), DsRed/hKir2.1 (KIR) o control (KIRm) a 3 y 5 dpf. Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. $N_{3\text{WT}}=8$, $N_{3\text{KIR}}=5$, $N_{5\text{WT}}=6$, $N_{5\text{KIR}}=9$, $N_{5\text{KIRm}}=9$. (A) ANOVA de una vía, ***p < 0.0001. Test de Tukey *post hoc*. 3WT vs 3KIR: **p = 0.0031; 3WT vs 5WT: ***p < 0.0001; 5WT vs 5KIR: *p = 0.0137; 5KIR vs 5KIRm: **p = 0.0082; 3WT vs 5KIR: p = 0.069; 5WT vs 5KIRm: p = 0.999. (B) ANOVA de una vía, ***p < 0.0001. Test de Tukey *post hoc*. 3WT vs 3KIR: **p = 0.0010; 3WT vs 5WT: ***p < 0.0001; 5WT vs 5KIR: *p = 0.0180; 5KIR vs 5KIRm: *p = 0.0232; 3WT vs 5KIR: p = 0.193; 5WT vs 5KIRm: p = 0.992.

Los eventos de eliminación pueden provenir tanto de ramas de reciente formación (las cuales poseerán un tiempo corto de vida) como de ramas preexistentes (vistas en t_0) que se retraen hasta desaparecer. En primer lugar, cuantificamos el tiempo de vida de aquellas ramas formadas durante los primeros 40 minutos de registro, es decir, cuánto tiempo transcurre desde su formación hasta su eliminación. Dividimos dicho tiempo de vida en 3 categorías: ramas que desaparecen antes de los 20 minutos desde su formación, aquellas que lo hacen entre los 20 y los 40 minutos y las que lo hacen luego de 40 minutos o no desaparecen. A 3 dpf, observamos que las NAs silenciadas presentan un incremento en el porcentaje de ramas nuevas que viven menos de 20 minutos, a expensas de una disminución en aquellas que viven más de 40 minutos (Figura 31A. (*en min*) <20= WT: 45.45(23.33)%, KIR: 65.12(23.58)%; 20-40= WT: 31.82(14.17)%, KIR: 20.93(16.26)%; >40= WT: 22.73(10.00)%, KIR: 12.50(8.03)%; $N_{\text{WT}}=7$, $N_{\text{KIR}}=5$). En cambio, a 5 dpf no vemos

diferencias significativas en ninguna de las categorías de tiempo de vida (Figura 31B. (en min) **<20**= WT: 60.00(53.57)%, KIR: 60.00(20.64)%; **20-40**= WT: 20.00(46.43)%, KIR: 28.57(38.10)%; **>40**= WT: 0.00(17.14)%, KIR: 14.29(11.43)%; $N_{WT}=5$, $N_{KIR}=9$). Vale destacar que el análisis en este estadio presenta una gran variabilidad ya que partimos de un número reducido de eventos de formación en neuronas maduras WT. Es por ello que se excluyeron del análisis aquellas neuronas que no presentaban ningún evento de formación en los primeros 40 minutos de registro.

Estos resultados indican que a los 3 dpf el silenciamiento de la AEE disminuye la estabilidad de las ramas recientemente formadas.

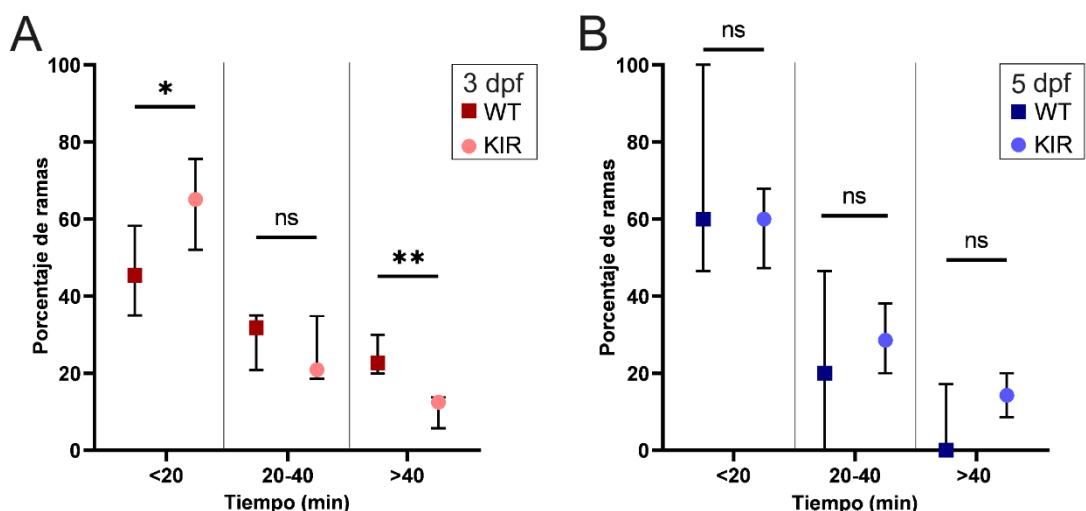


Figura 31: Las ramas recientemente formadas poseen un menor tiempo de vida en aquellas NAs silenciadas a 3 dpf. Porcentaje de ramas formadas durante los primeros 40 minutos de registro en NAs a (A) 3 y (B) 5 dpf que expresan DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR) en función de su tiempo de vida. Los puntos representan la mediana por neurona y las líneas representan los rangos intercuartílicos. Test de Mann-Whitney. (A) **<20**: * $p=0.0303$; **20-40**: $p=0.755$; **>40**: ** $p=0.0013$. $N_{WT}=7$, $N_{KIR}=5$ (B) **<20**: $p=0.668$; **20-40**: $p=0.626$; **>40**: $p=0.229$. $N_{WT}=5$, $N_{KIR}=9$.

Por otro lado, para entender si la eliminación de ramas preexistentes (vistas en t_0) están contribuyendo al aumento de la tasa de eliminación en las NAs silenciadas, cuantificamos el porcentaje de ramas persistentes (aquellas que encontramos en t_0 y que no desaparecen a

lo largo del registro). No observamos diferencias significativas entre NAs WT y KIR a los 3 dpf. Sin embargo, a los 5 dpf, encontramos que las NAs silenciadas exhibieron un menor porcentaje de ramas persistentes con respecto a las WT (Figura 32. 3WT: $68.64 \pm 4.33\%$, $N_{3WT}=8$; 3KIR: $63.75 \pm 6.69\%$, $N_{3KIR}=5$; 5WT: $94.74 \pm 2.97\%$, $N_{5WT}=6$; 5KIR: $76.43 \pm 2.73\%$, $N_{5KIR}=9$; 5KIRm: $89.91 \pm 3.74\%$, $N_{5KIRm}=9$. ANOVA de una vía, *** $p<0.0001$, Test de Tukey *post hoc*), evidenciando que una mayor parte de las ramas observadas en t_0 están siendo eliminadas.

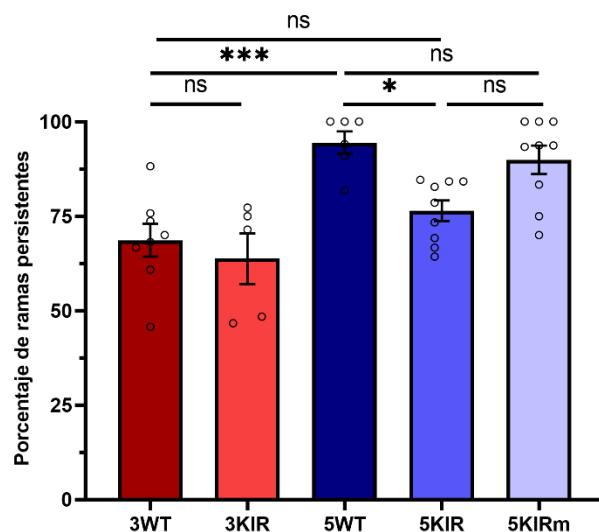


Figura 32: A los 5 dpf las NAs silenciadas exhiben una disminución en el porcentaje de ramas persistentes. Porcentaje de ramas persistentes (aquellas que encontramos en t_0 y no son eliminadas) en el árbol axonal de las NAs a 3 y 5 dpf expresando DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR) o control (KIRm). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. ANOVA de una vía, *** $p<0.0001$, Test de Tukey *post hoc*. **3WT vs 3KIR**: $p=0.931$; **3WT vs 5WT**: *** $p<0.0010$; **5WT vs 5KIR**: * $p=0.0265$; **5KIR vs 5KIRm**: $p=0.087$; **3WT vs 5KIR**: $p=0.582$; **5WT vs 5KIRm**: $p=0.928$.

Estos resultados sugieren que el incremento en los eventos de eliminación en NAs silenciadas se debe a distintos fenómenos en los dos estadios analizados. Por un lado, a 3 dpf, se observa una menor estabilidad de las ramas nuevas en las NAs silenciadas. En contraposición, a 5 dpf, el incremento en la tasa de eliminación se debe a la desaparición de ramas preeexistentes.

Eventos de elongación y retracción

Parte del incremento en la motilidad total normalizada (Figura 29A) se debe a un aumento en las tasas de formación y eliminación de ramas del árbol axonal. Sin embargo, nos preguntamos si parte de dicho aumento se explica, además, por un incremento en las tasas de elongación y retracción en ambos estadios de maduración. Para ello, cuantificamos los eventos de elongación y retracción a lo largo de la hora de registro, tomando en cuenta solo las ramas persistentes. En estadios inmaduros, no observamos diferencias en las tasas calculadas (Figura 33A. **Elongación** (en μm^{-1}): 3WT: 0.225 ± 0.015 ; 3KIR: 0.330 ± 0.053 .

Figura 33B. **Retracción** (en μm^{-1}): 3WT: 0.268 ± 0.019 ; 3KIR: 0.371 ± 0.048 ; $N_{3\text{WT}}=8$, $N_{3\text{KIR}}=5$). En cambio, a 5 dpf, encontramos un aumento de ambas tasas en las neuronas silenciadas con hKir2.1 (Figura 33A. **Elongación** (en μm^{-1}): 5WT: 0.0476 ± 0.014 ; 5KIR: 0.235 ± 0.026 ; 5KIRm: 0.074 ± 0.022 . Figura 33B. **Retracción** (en μm^{-1}): 5WT: 0.0646 ± 0.024 ; 5KIR: 0.259 ± 0.036 ; 5KIRm: 0.0818 ± 0.024 ; $N_{5\text{WT}}=6$, $N_{5\text{KIR}}=8$, $N_{5\text{KIRm}}=9$).

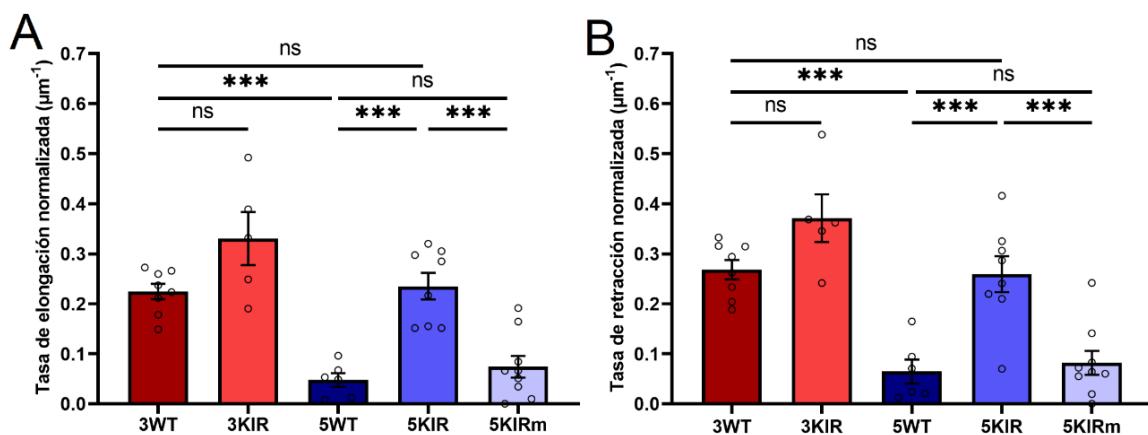


Figura 33: A 5 dpf, las tasas de elongación y retracción se encuentran aumentadas en aquellas NAs silenciadas con respecto a su control. (A-B) Tasas de (A) elongación y (B) retracción normalizadas al árbol axonal de cada una de las NAs al comienzo del registro a 3 y 5 dpf que expresan DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR) y su respectivo control (KIRm). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neurona. ANOVA de una vía, ***p<0.0001, test de Tukey post hoc. $N_{3\text{WT}}=8$; $N_{3\text{KIR}}=5$, $N_{5\text{WT}}=6$, $N_{5\text{KIR}}=8$, $N_{5\text{KIRm}}=9$. (A) **3WT vs 3KIR**: p=0.0793; **3WT vs 5WT**: ***p=0.0004; **5WT vs 5KIR**: ***p=0.0002; **5KIR vs 5KIRm**: p=0.0003; **3WT vs 5KIR**: p=0.998; **5WT vs 5KIRm**: p=0.948. (B) **3WT vs 3KIR**: p=0.182; **3WT vs 5WT**: ***p=0.0004; **5WT vs 5KIR**: ***p=0.0007; **5KIR vs 5KIRm**: ***p=0.0006; **3WT vs 5KIR**: p=0.999; **5WT vs 5KIRm**: p=0.999.

Nos preguntamos, además, si cada una de las ramas que presentan movimientos sufren, a su vez, más cantidad de eventos de elongación y retracción. Se calculó el número total de eventos por rama (n^o de elongaciones + n^o de retracciones) y a partir de estos datos se obtuvo el promedio por neurona. A 3 dpf, no observamos diferencias en el número total de eventos por rama (Figura 34A. 3WT: 4.61(1.64), $N_{3WT}=8$, 3KIR: 4.52(1.58), $N_{3KIR}=5$; Test de Mann-Whitney, $p=0.943$). En cambio, a 5 dpf, se observó un aumento en dicho parámetro en aquellas neuronas silenciadas con respecto a su control (Figura 34B. 5WT: 2.8(1.78), $N_{5WT}=5$, 5KIR: 4.55(2.03), $N_{5KIR}=9$; Test de Mann-Whitney, $*p=0.0190$). Además, determinamos la distancia promedio que recorre cada una de las ramas cuando exhibe algún evento de elongación o retracción. Sorpresivamente, encontramos que las ramas silenciadas a 5 dpf no replican el fenotipo inmaduro en este parámetro, exhibiendo distancias recorridas menores que las ramas del árbol WT a 3 dpf (Figura 34C. 3WT: 1.59(0.93) μm , $N_{3WT}=116$, 3KIR: 1.56(0.66) μm , $N_{3KIR}=80$; 5WT: 1.79(1.0) μm , $N_{5WT}=17$, 5KIR: 1.32(0.94) μm , $N_{5KIR}=97$, Test de Kruskal-Wallis, $*p=0.0337$. Test de Dunn *post hoc*).

Por otro lado, analizamos las distancias recorridas por las ramas persistentes dentro del cerebro medio (cada rama está relativizada a su propio punto de partida). Evidenciamos que a 3 dpf no hay diferencias cualitativas en el rango de distancias que recorren las ramas de NAs WT y KIR (Figura 35A). En cambio, a 5 dpf, observamos que las ramas persistentes WT se mueven por un espacio más acotado dentro del cerebro, mientras que en NAs silenciadas, este rango de movimiento se encuentra exacerbado, similar al que ocupa una NA inmadura (Figura 35B).

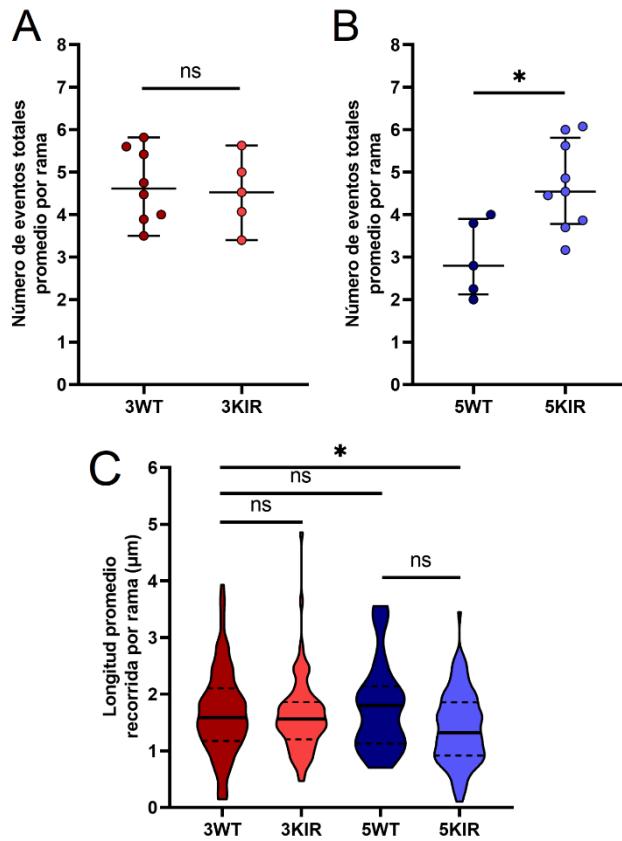


Figura 34: (A-B) Número total de eventos (elongación + retracción) observados por rama persistente, tomando en cuenta solo las ramas que tienen al menos un evento, a (A) 3 dpf y a (B) 5 dpf en NAs que expresan DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR). El gráfico muestra la mediana y los rangos intercuartílicos. Cada punto representa una neurona. (C) Longitud promedio recorrida por rama a 3 y 5 dpf en NAs que expresan DsRed(WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR). Los gráficos de violín muestran la mediana (línea continua), y los rangos intercuartílicos (líneas punteadas). (A-B) Test de Mann-Whitney (A) $N_{3WT}=8$, $N_{3KIR}=5$. **3WT vs 3KIR:** $p=0.943$; (B) $N_{5WT}=5$, $N_{5KIR}=8$. **5WT vs 5KIR:** * $p=0.0190$. (C) Test de Kruskal-Wallis, * $p=0.0337$. Test de Dunn *post hoc*. $N_{3WT}=116$, $N_{3KIR}=80$, $N_{5WT}=17$, $N_{5KIR}=97$. **3WT vs 3KIR:** $p>0.999$; **3WT vs 5WT:** $p>0.999$; **3WT vs 5KIR:** * $p=0.0254$; **5WT vs 5KIR:** $p=0.360$.

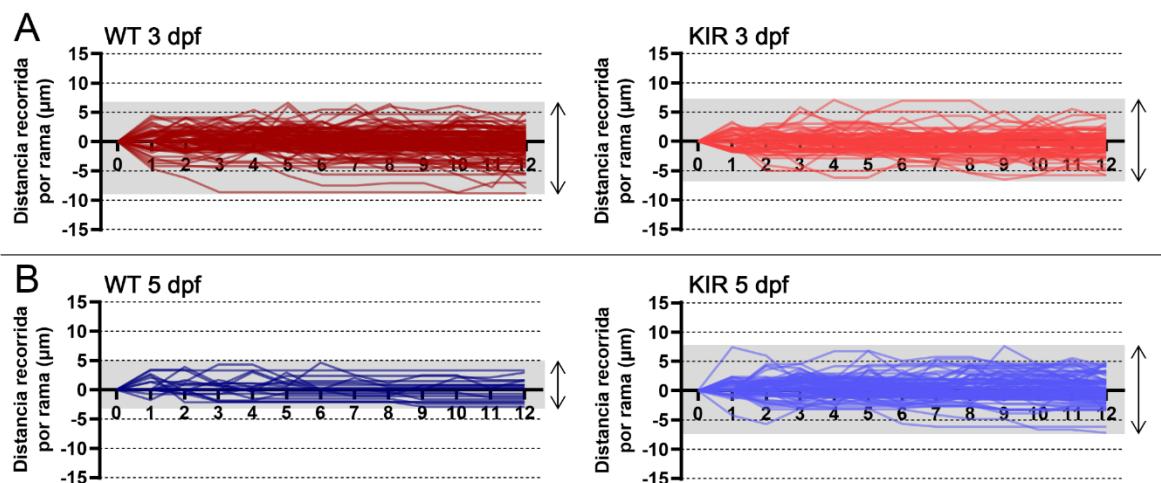


Figura 35: (A-B) Distancia recorrida por las ramas persistentes en función del tiempo (A) 3 y (B) 5 dpf en NAs que expresan DsRed (WT) o DsRed/hKir2.1(KIR). Las líneas coloreadas representan la diferencia de longitud encontrada en t_n con respecto a su posición en t₀ para cada rama. Las líneas con pendiente positiva corresponden a eventos de elongación, las líneas con pendientes negativas a eventos de retracción. Cada panel gris marca el rango de longitudes en la cual se mueven las ramas. $N_{3WT}=148$, $N_{3KIR}=87$, $N_{5WT}=72$, $N_{5KIR}=35$.

En resumen, a 3 dpf se observan igual cantidad de eventos de elongación y retracción por neurona. Además, cada rama exhibe la misma cantidad de movimientos y recorre las mismas longitudes promedio. En consecuencia, las distancias totales recorridas por cada rama en el cerebro son similares. En cambio, a 5 dpf, observamos que, si bien se producen movimientos más cortos en promedio, hay un aumento en la cantidad de eventos de elongación y retracción por neurona. Como consecuencia observamos que las ramas recorren una mayor distancia total sobre el cerebro medio.

Por último, decidimos analizar los movimientos de elongación y retracción de las ramas transientes, es decir, las que son formadas y/o eliminadas durante el registro. En el estadio inmaduro de 3 dpf no se encontraron diferencias significativas al comparar las longitudes promedio recorridas por las ramas WT y KIR. Sin embargo, a los 5 dpf observamos que la distancia promedio recorrida en cada evento es significativamente menor en las NAs silenciadas que en las NAs WT (Figura 36. 3WT: 1.88(0.94) μm , $N_{3\text{WT}}=348$; 3KIR: 1.89(0.88) μm , $N_{3\text{KIR}}=271$; 5WT: 2.04(1.14) μm , $N_{5\text{WT}}=34$; 5KIR: 1.49(0.94) μm , $N_{5\text{KIR}}=186$. Test de Kruskal-Wallis; ****p<0.0001. Test de Dunn *post hoc*). En este caso, la longitud promedio de las ramas silenciadas a 5 dpf también resultó ser significativamente menor que aquella exhibida por el WT inmaduro.

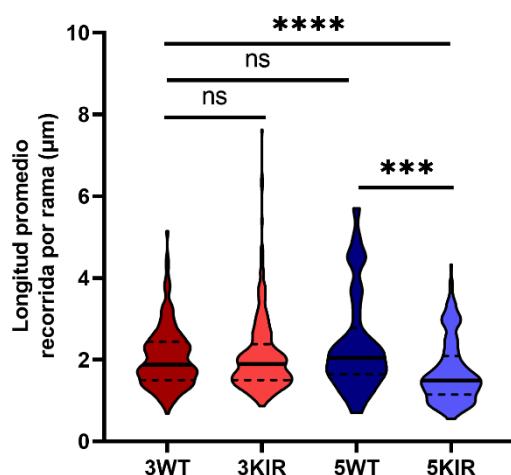


Figura 36: Longitud promedio recorrida por rama a 3 y 5 dpf en NAs que expresan DsRed (WT) y DsRed/hKir2.1 (KIR). Los gráficos de violín muestran la mediana (línea continua), y los rangos intercuartílicos (líneas punteadas). Test de Kruskal-Wallis; ****p<0.0001; Test de Dunn *post hoc*. $N_{3\text{WT}}=346$, $N_{3\text{KIR}}=271$, $N_{5\text{WT}}=34$, $N_{5\text{KIR}}=186$. **3WT vs 3KIR**: p>0.999; **3WT vs 5WT**: p>0.999; **3WT vs 5KIR**: ****p<0.0001; **5WT vs 5KIR**: ***p=0.0006.

El estudio de la dinámica de crecimiento de las proyecciones centrales de NAs de la LL para ambos estadíos del desarrollo proveen evidencias que nos permiten proponer que la AEE es crucial para el correcto crecimiento, arresto y estabilización de los árboles axonales de las NAs de la LL en desarrollo.

Discusión

El desarrollo del sistema de LL del pez cebra posee una temporalidad finamente caracterizada donde la inervación periférica de las NAs sobre las CCs comienza a establecerse entre los 3 y 4 dpf, permaneciendo inmadura hasta los 5 dpf (Metcalfe, 1985; Pujol-Martí & López-Schier, 2013), cuando los peces comienzan a exhibir comportamientos que reflejan el reconocimiento de estímulos externos (Kimmel et al., 1974; Obholzer et al., 2008; Zeddies & Fay, 2005).

Trabajos previos han demostrado que las NAs de la LL exhiben trenes de potenciales de acción (PA) espontáneos entre los 5 y 7 dpf transmitidos directamente a través la sinapsis en cinta desde las CCs de los NMs (Liao & Haehnel, 2012; Trapani & Nicholson, 2011). Aún no se conoce si estas neuronas exhiben actividad espontánea previo a la maduración de los contactos sinápticos periféricos. Además, aún no está claro qué implicancias tiene esta actividad en el desarrollo de sus árboles axonales.

En el primer capítulo de esta tesis se analizaron los fenotipos morfométricos y las dinámicas de crecimiento de las proyecciones axonales centrales de las NAs de la LLP del pez cebra. Se compararon los árboles axonales de NAs que exhibieron AEE con aquellos que, debido a la sobreexpresión de hKir2.1, habían perdido su excitabilidad. Nuestros resultados evidenciaron cambios en la arquitectura y dinámica de crecimiento de los árboles axonales silenciados, con respecto a los WT. Las comparaciones se realizaron en dos estadios distintos del desarrollo: a 3 dpf, instancia representativa de árboles inmaduros, y a 5 dpf, instancia donde el sistema se encuentra establecido.

Silenciamiento de las neuronas aferentes de la línea lateral

El canal de potasio humano hKir2.1 ha sido utilizado previamente por múltiples autores y ha demostrado ser eficiente en la supresión de la excitabilidad neuronal (Burrone, 2002; Duale

et al., 2001; Geraldes et al., 2014, 2016; Hocking et al., 2012; Holt et al., 1999; Hua et al., 2005; Johns et al., 1999; Plazas et al., 2013).

En las células excitables, el potencial de membrana puede cambiar rápidamente en respuesta a la apertura y cierre de canales iónicos dependientes del voltaje, produciendo PA. Entre subsecuentes PA, el potencial de membrana en reposo se mantiene constante mediante corrientes rectificadoras internas. Esto previene una formación prematura de PA que, de otro modo, podría provocar una activación neuronal caótica, contracción muscular inesperada o arritmia cardíaca, por nombrar algunas. La familia de los canales Kir es altamente ubicua y están involucrados en muchos procesos fisiológicos como la excitabilidad cardíaca (Kir2) y neuronal (Kir2, Kir3), liberación de insulina (Kir6), mantenimiento del tono muscular (Kir2) y la homeostasis del potasio (Kir1, Kir4) (De Boer et al., 2010). La sobreexpresión de Kir2.1 tiene efecto directo sobre el potencial de membrana de las células, llevándolo a valores cercanos al potencial de equilibrio del K^+ , alrededor de -75 mV (Burrone et al., 2002; Holt et al., 1999). Esto tiene como consecuencia un corrimiento en la fuerza iónica necesaria para llevar a cabo un PA, suprimiendo, de esta manera, la actividad espontánea en células excitables (Johns et al., 1999).

En este trabajo silenciamos la AEE mediante la sobreexpresión del canal de potasio hKir2.1 en NAs únicas. Para ello, se expresaron estocásticamente las construcciones SILL:Gal4 y UAS:DsRed::UAS:hKir2.1. La eficiencia del silenciamiento en animales inyectados con estas construcciones fue probada anteriormente en Plazas et al., 2013, donde mediante *Imaging de Ca*, demostraron que las neuronas de la espina dorsal que expresaban UAS:DsRed eran capaces de exhibir transientes de actividad y aquellas que expresaban UAS:DsRed::UAS:hKir2.1 permanecían silenciadas. Más aún, en otro trabajo, expresaron el canal hKir2.1 en neuronas ganglionares de la retina (NGR), y observaron que la proporción de neuronas que exhibían actividad bajó de un 41% en condiciones control, a un 6% en neuronas silenciadas con hKir2.1 (Hua et al., 2005).

Está reportado que el primordio I (PrimI) comienza a migrar hacia la zona caudal a las 20 hpf (acompañado por los axones periféricos de las NAs) (Ghysen & Dambly-Chaudière,

2007). Por otro lado, se ha demostrado que, bajo la dirección del *enhancer* SILL, los reporteros fluorescentes expresados en las NAs comienzan a detectarse a partir de las 24 hpf (Pujol-Martí et al., 2010) y que a los 2.5 dpf, las ramas anterior y posterior de las proyecciones centrales ya se encuentran establecidas en el cerebro medio, aunque recién están comenzando a extender sus ramificaciones axonales (Valera et al., 2021). Todas estas evidencias nos permiten proponer que el uso del *enhancer* SILL es una herramienta óptima para silenciar NAs únicas, a partir de la sobreexpresión del canal hKir2.1, en estadios tempranos de su desarrollo cuando las NAs están extendiendo sus árboles periféricos y centrales. De esta manera podremos responder los interrogantes arriba planteados.

La AEE es crucial para el correcto desarrollo de los árboles axonales de las NAs

Al sobreexpresar el canal hKir2.1, observamos que el silenciamiento de las NAs tuvo consecuencias sobre los árboles axonales de las proyecciones centrales. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la longitud de las ramas axonales principales (anterior y posterior) en ningún estadio.

A los 3 dpf, el fenotipo de las NAs silenciadas se caracterizó por tener menor cantidad de ramas en el árbol axonal con respecto al WT. Como consecuencia, tanto la longitud del árbol como el área de cobertura sobre el cerebro medio resultaron menores que los de una NA WT. A los 5 dpf, también encontramos disminuida la longitud del árbol axonal y el área, pero observamos que la complejidad del árbol era mayor debido a una exacerbación de ramas secundarias sobre las primarias (Figura 37). Este primer resultado sugiere que durante el desarrollo hay procesos de crecimiento o mantenimiento de las ramas axonales que no están siendo correctamente regulados a causa de la pérdida de excitabilidad.

Trabajos previos han demostrado que el silenciamiento de NGR únicas de pez cebra, a través de la expresión de hKir2.1, provoca un desarrollo anómalo de los árboles axonales

que proyectan al tectum óptico. A diferencia de lo observado en NAs, a los 3 dpf, cuando comienzan a extenderse las ramas axonales en las NGR, la expresión de hKir2.1 no generó árboles anómalos. En cambio, a los 5 dpf, los árboles axonales de las NGR presentaron menor longitud y complejidad (Hua et al., 2005).

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de hKir2.1 hiperpolariza el potencial de membrana, este tratamiento puede afectar tanto la capacidad de disparar PA, como la de exhibir despolarizaciones locales y liberar vesículas sinápticas. En el trabajo de Hua et al., 2005, los autores inhibieron la transmisión sináptica mediante la sobreexpresión de una versión mutante no funcional de la proteína VAMP (VAMPm) y replicaron los resultados obtenidos con hKir2.1. Sin embargo, la sobreexpresión de VAMPm no resultó en un bloqueo total de la actividad sináptica (Sørensen et al., 2002), sino en una fuerte reducción en la dinámica de secreción de las vesículas, ya que la proteína exógena está en constante competencia con la proteína VAMP endógena. En concordancia con nuestros resultados, la supresión de la actividad presináptica afecta el correcto desarrollo del árbol axonal.

Sorprendentemente, al expresar la cadena liviana de la toxina tetánica (TeNT-1c) en las NRG, la cual inhibe completamente la fusión vesicular, se observaron árboles axonales con igual complejidad, pero con una longitud exacerbada (Fredj et al., 2010). Estos resultados son la consecuencia de diferentes niveles de silenciamiento. Según los autores, neuronas con silenciamiento profundo, pero no absoluto, podrían experimentar procesos parecidos a la depresión a largo plazo o LTD (por sus siglas en inglés de “*long-term depression*”), donde se exhibe una señal débil desde la neurona presináptica que no es suficiente para disparar el proceso de sinaptogénesis. Al no afianzarse la sinapsis por potenciación a largo plazo o LTP (por sus siglas en inglés de “*long-term potentiation*”), las ramas quedan estables, se retraen y/o se eliminan. Para conocer en detalle qué parámetros están siendo afectados en las NAs debido al silenciamiento con hKir2.1, fue necesario estudiar la conectividad y la dinámica de crecimiento.

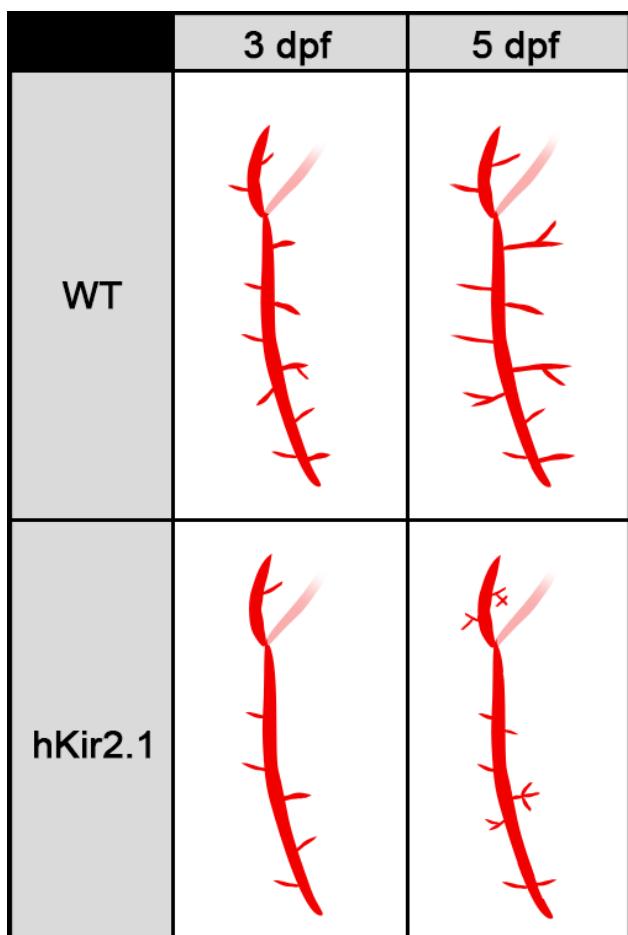


Figura 37: Diagrama representativo de los fenotipos observados en NAs WT y silenciadas con hKir2.1.

A los 3 dpf, en las NAs silenciadas con hKir2.1, observamos un árbol axonal más reducido, con menor número de ramas tanto primarias como secundarias, que se traduce en una menor área de cobertura sobre el cerebro medio. A los 5 dpf, en las NAs silenciadas con hKir2.1, observamos árboles más complejos cuyas ramas axonales son más cortas que el WT, pero se encuentran más ramificadas. Este fenotipo también resulta en una longitud de árbol más reducida y una menor área de cobertura sobre el cerebro medio.

Estudios previos han evidenciado fenotipos similares en arborizaciones dendríticas en desarrollo. Hocking et al., 2012, silenciaron NGR en *Xenopus laevis* con hKir2.1 y observaron mayor cantidad de puntos de ramificación de sus árboles dendríticos en estadios funcionales del sistema, volviéndose más complejos. Además, demostraron que la despolarización de las NGR bloquea el proceso de inducción de las dendritas. Estudios similares realizados en *Drosophila* evidenciaron el mismo fenómeno de aumento de la complejidad de los árboles dendríticos en neuronas del SNC ante la interrupción de la correcta actividad neuronal (Singh et al., 2010; Tripodi et al., 2008).

En resumen, nuestros resultados muestran que el silenciamiento de la AEE provoca anomalías en el crecimiento de los árboles axonales de las NAs, donde su complejidad y el territorio que ocupa sobre el cerebro medio se ven afectados. Nuestras evidencias sugieren

que la AEE juega un rol crucial en el correcto desarrollo de la arquitectura y la complejidad del árbol axonal de las NAs de la LLP.

La disrupción de la AEE tiene como consecuencia fallas en la conectividad sináptica dentro del núcleo octavolateralis en el cerebro medio

Para profundizar en el análisis morfológico de las NAs luego del silenciamiento con hKir2.1, decidimos estudiar las varicosidades presentes en el árbol axonal como medida indirecta de la conectividad con neuronas de segundo orden. En varios sistemas se han observado engrosamientos de la membrana neuronal, llamados varicosidades, a lo largo de los árboles axonales de neuronas sensoriales (Alsina et al., 2001; Edwards et al., 2007; Meyer & Smith, 2006; Nikolaou & Meyer, 2011), inclusive en el sistema de LLA y LLP (Valera et al., 2021). No obstante, estas varicosidades no son características de las neuronas sensoriales, también se han encontrado en otros sistemas como el hipocampo y la corteza (Agster et al., 2013; De Paola et al., 2003; Hatada et al., 2000). Varios autores encontraron una correlación positiva entre estos engrosamientos de la membrana y la acumulación de proteínas de la maquinaria presináptica (De Paola et al., 2003; Meyer & Smith, 2006; Ruthazer et al., 2007; Valera et al., 2021). Más aún, trabajos anteriores han observado que la dinámica de estas varicosidades es dependiente de actividad (De Paola et al., 2003; Muller & Nikolenko, 2003). Por otro lado, se conoce que el proceso de maduración de los árboles axonales y dendríticos es sinaptotrópico, es decir, que el establecimiento de la maquinaria sináptica es, a su vez, una señal para la formación de nuevas ramas desde los extremos establecidos (Meyer & Smith, 2006; Niell et al., 2004). Es por ello, que la formación de la sinapsis es determinante para el correcto crecimiento y complejización del árbol axonal.

En las NAs de la LL se ha descrito la presencia de varicosidades a lo largo de las proyecciones centrales, tanto en el axón central (las ramas principales que se establecen primero), como en el árbol axonal. También se ha demostrado la colocalización de las varicosidades con la proteína presináptica sinapsina 1 (Valera et al., 2021). Es por ello que tomamos la formación de varicosidades como un indicador de la conectividad de las NAs con sus destinos postsinápticos. Teniendo en cuenta lo reportado anteriormente, tiene sentido que estas varicosidades se comiencen a detectar luego de la maduración del árbol al presentar sinapsis maduras. A los 3 dpf, observamos árboles axonales tanto WT como KIR con una morfología característica de ramas inmaduras, ya que son homogéneamente finas y no presentan engrosamientos de membrana. Es por ello que solo analizamos las varicosidades del sistema maduro, a los 5 dpf, para realizar las comparaciones con las NAs silenciadas.

En el animal WT a 5 dpf, encontramos varicosidades bien determinadas, con gran acumulación de DsRed y de tamaños variables, algunas llegando a ser considerablemente extensas. Con la expresión de hKir2.1, observamos un menor número de varicosidades sobre los árboles axonales, aunque no sobre las ramas del axón central. En la Figura 25 mostramos cómo lucen las varicosidades detectadas para ambos tratamientos, y, si bien no logramos aún calcular el área de los engrosamientos, cualitativamente notamos una marcada disminución de tamaño.

Sorpresivamente, observamos que gran parte de la disminución en el número de varicosidades sobre el árbol axonal, se debía a una falta de varicosidades en las puntas de las ramas. Esto fue particularmente interesante, ya que nos dio el indicio de que muchas de las ramas axonales no tenían morfología de ramas maduras, las cuales, por lo general, poseen algún tipo de engrosamiento o hinchazón en sus puntas, como el fenotipo WT a 5 dpf.

En un proceso canónico de maduración, los árboles axonales inmaduros exhiben una gran cantidad de ramas nuevas, que en su mayoría se retraerán hasta desaparecer, y solo algunas llegarán a establecerse. Finalmente, el crecimiento axonal se guía por mecanismos

de “prueba y error” que suceden de manera simultánea y dependen del correcto establecimiento de las sinapsis (Figura 38) (Meyer & Smith, 2006).

Nuestros resultados concuerdan con el modelo sinaptotrópico ya que el silenciamiento de la AEE, resulta en la disminución del número de varicosidades encontradas en el árbol axonal, lo cual está relacionada con una falla en los procesos de sinaptogénesis que, a su vez, lideran el crecimiento axonal.

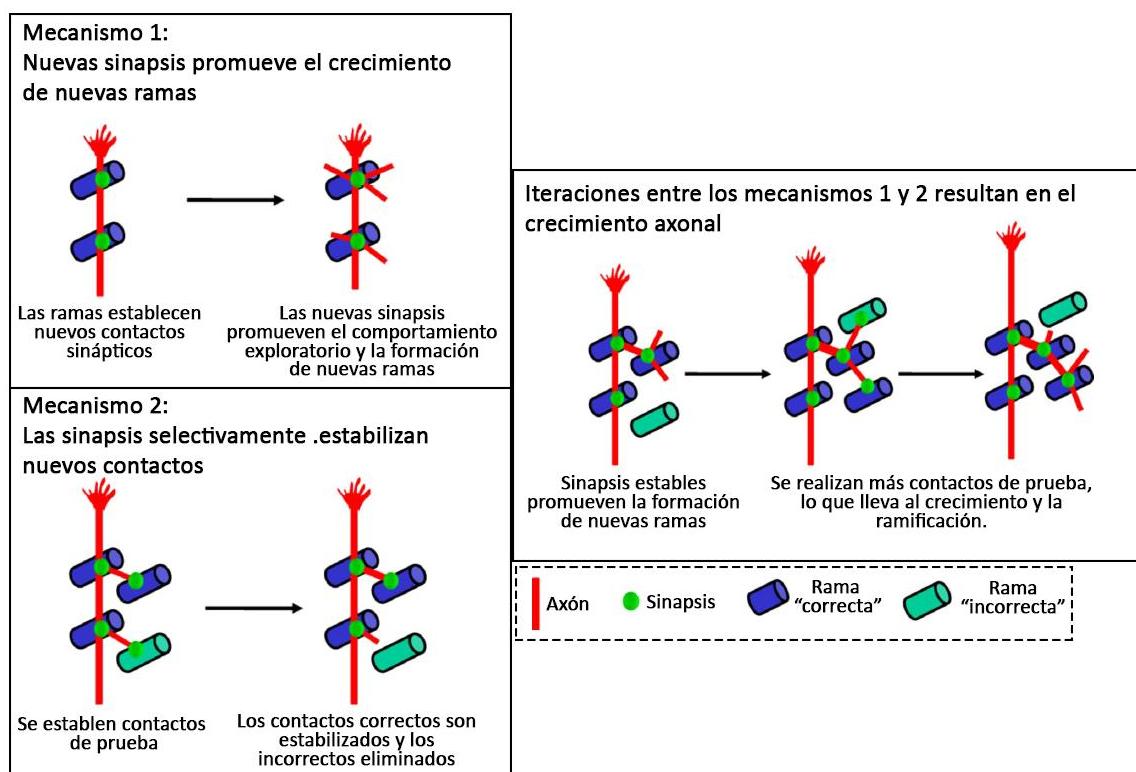


Figura 38: Modelo sinaptotrópico de crecimiento del árbol axonal para neuronas ganglionares de la retina. La sinapsis guía el crecimiento y promueve la formación de ramas nuevas. Estas ramas axonales nuevas sondan el ambiente en busca de contactos sinápticos. Si este contacto sináptico existe y es robusto, el crecimiento se ralentiza y eventualmente se estabiliza. Las ramas que no han encontrado destinos sinápticos se retraen y eventualmente desaparecen. Adaptado de Meyer & Smith, 2006.

La maduración de los árboles axonales de las NAs es dependiente de actividad

Al estudiar la dinámica de crecimiento de los árboles axonales, encontramos una exacerbación en la motilidad de las NAs silenciadas, tanto a los 3 como a los 5 dpf. Este aumento depende de diferentes factores en ambos estadios: a los 3 dpf solo encontramos aumentadas las tasas de formación y eliminación de ramas, mientras que a los 5 dpf, también aumentaron las tasas de elongación y retracción de ramas.

Está reportado que los árboles axonales de las neuronas sensoriales inmaduras son altamente mótiles, presentando extremos afinados con movimientos exploratorios como elongaciones y retracciones, mientras que los árboles maduros poseen bajas tasas de motilidad (Meyer & Smith, 2006; Niell et al., 2004; Nikolaou & Meyer, 2012). En concordancia con estos antecedentes, a los 3 dpf, las NAs WT exhibieron ramas con altas tasas de eventos de elongación y retracción, y al llegar a los 5 dpf, estas tasas disminuyeron considerablemente. Luego del silenciamiento, solo a los 5 dpf se observó un aumento en las tasas de elongación y retracción de las ramas, es decir, los árboles se mostraron más inestables que su control. Dicho aumento está directamente relacionado a la falta de varicosidades en los extremos de las ramas, ya que encontramos que aquellas ramas que presentan puntas afinadas mostraban más movimientos. Como el crecimiento axonal está liderado por el establecimiento de las sinapsis, no nos resulta sorprendente que, en un modelo que exhibe fallas en la conectividad, encontremos mayor inestabilidad. Nuestros resultados coinciden con los de Fredj et al., 2010, donde observaron que, al bloquear la actividad presináptica en NGR, los árboles axonales exhibieron mayor motilidad, en especial la elongación de sus ramas, y debido a ello, sus árboles resultaron más extensos. Por el contrario, Hua et al., 2005, al silenciar las NGR con hKir2.1 observaron una menor tasa de eventos de motilidad. Estos resultados son controversiales, sin embargo, la diferencia con nuestros hallazgos podría explicarse por, al menos, tres razones. Primero, al ser sistemas sensoriales distintos, pueden necesitar diferentes patrones de actividad mínima para

establecer sus contactos sinápticos o ralentizar el crecimiento del árbol axonal. Segundo, al utilizar diferentes abordajes experimentales para la expresión del plásmido de hKir2.1, puede haber distintos niveles de silenciamiento, más aún, teniendo en cuenta que la expresión de hKir2.1 en el trabajo de Hua et al., 2005, comienza luego de las 48 hpf y, en nuestro trabajo, el comienzo de la expresión es en estadios más tempranos. Por último, al poseer diferentes destinos postsinápticos, podrían estar participando otros factores moduladores del crecimiento axonal.

Un aspecto a tener en cuenta al estudiar neuronas glutamatérgicas es el efecto de este neurotransmisor sobre el crecimiento del árbol axonal. Está reportado que el glutamato actúa como modulador del crecimiento axonal y de la plasticidad sináptica en numerosos sistemas (Chang & Camilli, 2001; Gan, 2003; Schmitz et al., 2009; Fernández-Montoya et al., 2017; Mattson, 2008). En terminales presinápticos del hipocampo y de neuronas sensoriales se ha encontrado que el glutamato es un inhibidor del crecimiento axonal dependiente de receptores AMPA ubicados en la presinapsis (Chang & Camilli, 2001; Fredj et al., 2010; Schmitz et al., 2009). Sin embargo, aún no existen evidencias del efecto del glutamato sobre las NAs de la LL en el desarrollo.

Por otro lado, trabajos preliminares no presentados en esta tesis indican que existirían múltiples fallas en el establecimiento de contactos entre las NAs silenciadas y los NMs. No nos resulta llamativo que las NAs, además de tener fallas en la conectividad a nivel central, tengan fallas en los contactos periféricos. En la LLP del pez cebra, los contactos sinápticos que establecen las NAs en la periferia son dependientes de la actividad espontánea de las CCs (Fauchere et al., 2010). Se comparó la dinámica de crecimiento de los terminales dendríticos de las NAs que contactan a las CCs en animales WT y en aquellos portadores de una mutación de pérdida de función en el canal MET de las CCs. En estos mutantes, las CCs de la LL, del aparato vestibular y del oído no son capaces de expresar actividad (Gleason et al., 2008). Los terminales dendríticos cercanos a estas CCs mostraron altos índices de motilidad y extremos afinados, evidenciando una falta de madurez de los contactos sinápticos (Fauchere et al., 2010). Teniendo en cuenta que para el estadio de 5

dpf, la actividad expresada en los somas de las NAs se origina en las CCs (Trapani & Nicolson, 2011), la actividad espontánea y, eventualmente, evocada, podría promover mecanismos de potenciación del tipo LTP a nivel central que contribuirían al establecimiento de las sinapsis entre las NAs y las neuronas de segundo orden.

Además, encontramos que los parámetros de motilidad exhibidos por los árboles axonales de las NAs silenciadas a 5 dpf replicaron los valores hallados a los de 3 dpf en animales WT. Nuevamente, en el trabajo de Fredj et al., 2010, obtuvieron resultados similares, donde la motilidad del árbol axonal WT a 3 dpf presentaba valores similares al silenciado a 5 y 7 dpf. Más aún, en la Figura 35 mostramos que a 5 los dpf, las ramas axonales del árbol WT achican su rango de navegación sobre el cerebro medio, mientras que las ramas silenciadas vuelven a ocupar un área de búsqueda mayor, similar al de las ramas inmaduras de 3 dpf. Nuestros resultados van en concordancia con los antecedentes reportados en otros sistemas sensoriales, sugiriendo que la maduración de los árboles axonales de las NAs es dependiente de actividad.

La complejidad de los árboles axonales en estadios tempranos está modulada por la actividad espontánea

Al analizar la dinámica de crecimiento de las NAs silenciadas, evidenciamos una exacerbación tanto en los eventos de formación como de eliminación, en ambos estadios estudiados. Existen evidencias que la formación y eliminación de las ramas (tanto las recientemente formadas como las establecidas), son procesos cruciales durante el desarrollo de los sistemas sensoriales, que definirán la conectividad sináptica y darán lugar al correcto establecimiento y mantenimiento de los mapas sensoriales (Clause et al., 2014; Kandler et al., 2009; Li et al., 2022; McLean et al., 2007; Redolfi et al., 2021; Yu et al., 2004). Nuestros resultados muestran que, a los 3 dpf, el silenciamiento de la AEE resulta en un incremento en las tasas de los eventos de formación y eliminación. Sin embargo, las ramas

formadas recientemente presentaron un tiempo de vida más corto que en el WT, es decir, que fueron eliminadas más rápidamente. Este aumento en la eliminación de ramas recientemente formadas tiene como consecuencia árboles menos complejos, comparado con el WT, ya que exhiben menor número de ramas tanto primarias como secundarias. De manera similar, a los 5 dpf, los árboles silenciados también exhibieron una mayor cantidad de eventos de formación y eliminación de ramas. Sin embargo, el tiempo de vida de las ramas recientemente formadas no tuvo diferencias con respecto al WT. En este caso, el aumento en la eliminación se debió a la eliminación de ramas preexistentes al inicio del registro.

La iniciación del crecimiento de las ramas tanto dendríticas como axonales está regulado por factores de crecimiento exógenos, siendo BDNF (“*Brain derived neurotrophic factor*”), FGF (“*Fibroblast growth factor*”) y NGF (“*Nerve growth factor*”) (Kalil et al., 2014) los más ubicuos en el sistema nervioso. Hay evidencias de que FGF2 y BDNF estimulan la ramificación de árboles axonales de neuronas corticales en cultivo (Szebenyi et al., 2001). Más aún, la aplicación de BDNF es suficiente para inducir la formación de ramas en árboles axonales de NGR en *Xenopus* (Cohen-Cory et al., 2009) y promueve la extensión rápida de nuevas ramas (Alsina et al., 2001). Sin embargo, la estabilización de las ramas formadas depende de transientes intracelulares de Ca^{2+} (Gomez & Zheng, 2006).

En línea con estos antecedentes, nuestros resultados muestran que, a los 3 dpf, el silenciamiento de la AEE afecta la estabilidad de las ramas recientemente formadas, pero no su protrusión desde axón, sugiriendo que la actividad no es necesaria para que se inicie el proceso de formación de ramas en las NAs. Por el contrario, la AEE estaría participando como un factor inhibitorio de los eventos de formación. A los 5 dpf, este fenómeno no revierte, ya que observamos mayor tasa de eventos de formación en NAs silenciadas que lleva a exhibir árboles más complejos. Nuevamente, nuestros resultados sugieren que el arresto del crecimiento de ramas nuevas depende de actividad.

Fredj et al., 2010, silenció la actividad presináptica de las NRG en desarrollo y observó el mismo fenómeno. Sorpresivamente, cuando también se silenciaron las neuronas vecinas, el

fenómeno observado se revirtió, evidenciando una competencia por el territorio dependiente de actividad. Si bien en el trabajo de Hua et al., 2005, los autores encontraron menor tasa de eventos de formación y eliminación, también observaron que el fenotipo se revertía al silenciar neuronas vecinas.

A partir de nuestros resultados planteamos la hipótesis de que el árbol silenciado a 3 dpf presenta un déficit en la cantidad de ramas, debido a que se encuentra en desventaja frente a otras neuronas que sí exhiben actividad, en la competencia por el territorio. A medida que el sistema va madurando, esta competencia puede disminuir, ya que parte del sistema se va a estar ensamblando, con gran parte del territorio tomado por neuronas WT. Como consecuencia, a los 5 dpf observamos un aumento en la complejidad ya que aún sigue fallando el arresto del crecimiento por falta de excitabilidad.

Por otro lado, el análisis de las longitudes promedio recorridas por las ramas persistentes (aquellas que se ven durante todo el registro) y transientes (recientemente formadas o a punto de ser eliminadas) nos da una idea de la velocidad del movimiento que exhiben al elongarse o retraerse, ya que se mide la distancia recorrida entre una adquisición y la próxima, 5 minutos más tarde. Nuestros resultados muestran que las ramas transientes silenciadas de 5 dpf recorren distancias más cortas en promedio que las NAs WT. Más aún, encontramos que tanto las ramas persistentes como las transientes de los árboles silenciados a 5 dpf, presentan movimientos más reducidos con respecto a las ramas del árbol inmaduro. Estas diferencias nos resultaron llamativas porque, hasta el momento, todos los parámetros de dinámica de crecimiento del árbol silenciado a 5 dpf imitaban los parámetros obtenidos a 3 dpf en árboles WT. Estos resultados sugieren que a 5 dpf, la velocidad del movimiento exhibido por las ramas estaría modulado por actividad. La estabilización de las ramas durante el crecimiento depende del ciclo de polimerización y despolimerización de los microtúbulos, de los haces de actina y de la interacción entre ambos (Lowery & Van Vactor, 2009). Existen evidencias de que las proteínas GTPasas de la familia Rho regulan el ensamblado y la organización de los filamentos de actina en los extremos en crecimiento y son activadas por el Ca^{2+} como segundo mensajero a través de

la activación de la quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II (CaMKII). Por ejemplo, RhoA es un regulador positivo de la ramificación axonal dependiente de la actividad en neuronas corticales (Gomez & Zheng, 2006). Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para entender a qué se deben estos cambios en la motilidad de las ramas silenciadas.

Rol del Ca^{2+} en el crecimiento axonal

Existen evidencias de que el Ca^{2+} cumple un rol bimodal sobre la motilidad axonal. Por un lado, las fluctuaciones locales y agudas de Ca^{2+} parecerían inhibir el crecimiento de las ramas axonales (Gomez & Spitzer, 1999, 2000; Gu et al., 1994). Por otro lado, la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3 desde los reservorios internos es necesaria para mantener la concentración de Ca^{2+} dentro de un rango óptimo para el correcto crecimiento de las ramas axonales (Takei et al., 1994). Por lo tanto, distintos niveles de Ca^{2+} parecen regular distintos eventos celulares que conducen a efectos opuestos sobre la motilidad de las ramas axonales en crecimiento.

Independientemente de la concentración o la temporalidad de las transiciones de Ca^{2+} , existe una complejidad adicional en estos mecanismos. Aunque se han observado señales locales de Ca^{2+} en los conos de crecimiento de las ramas axonales, aún se desconoce la naturaleza precisa de los cambios funcionales de Ca^{2+} que coordinan la motilidad. Por ejemplo, las señales endógenas de Ca^{2+} , que a su vez activan algunos efectores, podrían ocurrir dentro de microdominios o nanodomíniros, lo que podría ser importante para la transducción de diferentes señales localizadas. Los nanodomíniros y microdominios (transientes de Ca^{2+} generados por el influjo a través de canales únicos o agrupados en *clusters*) generan señales localizadas en las células que dependen del movimiento de Ca^{2+} a través del citoplasma, y están limitadas por mecanismos homeostáticos, como los *buffers* citoplasmáticos, las bombas y transportadores de membrana, que afectan el curso temporal y la magnitud de la señal (Augustine et al., 2003). Muchos de estos eventos de señalización

local de Ca^{2+} son indetectables con técnicas estándar de imágenes de fluorescencia, aunque se ha demostrado experimentalmente que median importantes procesos fisiológicos (Bolsover, 2005). Es decir, existe una selectividad de las señales de Ca^{2+} que está restringida a la cercanía de sus efectores río abajo. El Ca^{2+} regula las proteínas que participan en la organización y movimiento de los filamentos de actina, la formación de sitios de adhesión y el tráfico de vesículas (Brown & Bridgman, 2004; Chang & Di Camilli, 2001). Además de la regulación del citoesqueleto, el Ca^{2+} también regula la síntesis y degradación de proteínas localmente en los conos de crecimiento en respuesta a las señales gatilladas por moléculas guías (Spira et al., 2001; Zheng & Poo, 2007). Sin embargo, señales de Ca^{2+} más extensas también promueven la repulsión local en el extremo de las ramas haciéndolas desviar de su eje de crecimiento (Gomez et al., 2001). De esta manera, las señales de Ca^{2+} pueden promover la repulsión o estabilización dependiendo de extensión en el espacio intracelular.

Las vías de señalización molecular en las neuronas en desarrollo son inmensamente complejas, esenciales para la conformación de un sistema funcional final. Este proceso involucra una serie de interacciones dinámicas y precisas que permiten el correcto establecimiento de las redes neuronales. Recientemente, se ha reconocido que la actividad neuronal no solo es un componente adicional, sino un agente crucial en la correcta ejecución de muchos de estos procesos. La comprensión del papel de la actividad requiere enfoques cada vez más precisos y detallados. Para abordar estas cuestiones, es fundamental utilizar modelos experimentales que sean relativamente simples y fáciles de manipular. Estos modelos deben permitir el uso de herramientas genéticas y farmacológicas, así como estudios *in vivo* que faciliten la observación detallada y controlada de los fenómenos en cuestión. En este contexto, el modelo de LLP de pez cebra se presenta como una opción altamente efectiva para el estudio de la actividad neuronal en el desarrollo de sistemas sensoriales.

En nuestro estudio, hemos demostrado que en las NAs de la LLP del pez cebra, la disrupción de la excitabilidad neuronal lleva a anomalías significativas en el correcto ensamblado,

arquitectura y maduración de los árboles axonales. Estos hallazgos subrayan la importancia de la actividad neuronal en el desarrollo morfológico y funcional de los sistemas sensoriales, y destacan la relevancia del pez cebra como modelo para futuras investigaciones en este campo.

Conclusiones

- El silenciamiento de la AEE en NAs únicas tiene como consecuencia alteraciones en el crecimiento de los árboles axonales centrales, tanto en estadios inmaduros como maduros de la LL, exhibiendo un déficit en el área de cobertura sobre el cerebro medio.
- Los árboles axonales silenciados presentaron alteraciones en el número de varicosidades, sugiriendo que la AEE es necesaria para el establecimiento de las conexiones con neuronas de segundo orden en el cerebro medio.
- El silenciamiento de la AEE afecta los procesos de elongación y retracción, alterando la estabilidad y maduración de las ramas de los árboles axonales de las NAs.
- La complejidad de los árboles axonales de las NAs en desarrollo está modulada por la AEE, ya que esta es necesaria tanto para el arresto de la formación de ramas como para el mantenimiento de las mismas en estadios inmaduro y maduro de la LL.

CAPÍTULO 2: Caracterización de los patrones de actividad eléctrica espontánea en células ciliadas de la línea lateral en desarrollo y su modulación

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron individuos transgénicos dobles Tg[Brn3c:Gal4;UAS:GcAMP7a] (Xiao & Baier, 2007; Muto et al., 2013) que expresan el sensor de calcio (Ca^{2+}) genéticamente codificado GCaMP7a en CCs. Brn3c es una región promotora reconocida por el factor de transcripción POU4f3, proteína de la familia de los dominios POU, altamente conservada en vertebrados. En el pez cebra, el factor de transcripción POU4f3 se expresa específicamente en CCs maduras del oído y en neuromastos (DeCarvalho et al., 2004). Por último, GCaMP7a es una proteína de la familia de los GECIs (por sus siglas en inglés *genetically encoded calcium indicators*) que funciona como un sensor biológico de Ca^{2+} . La proteína GCaMP está formada por una fusión entre la proteína fluorescente GFP, calmodulina (CaM) y el péptido M13. GFP es una proteína fluorescente que, al ser irradiada por un láser de entre $\lambda = 470$ y $\lambda = 500$ nm, emite luz en un rango de $\lambda = 510$ a $\lambda = 550$ nm. CaM es una proteína que tras unir Ca^{2+} , cambia su conformación y puede asociarse al péptido M13. Cuando esto sucede, GFP se activa y emite fluorescencia, de lo contrario, permanece inactiva. Finalmente, este mecanismo, de manera poblacional, depende directamente de la concentración de Ca^{2+} . Debido a ello, cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por GCaMP7a nos permite inferir cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} .

Los estadios elegidos para la caracterización de los patrones de actividad espontánea fueron de 3, 4, 5 y 6/7 dpf y aquellos a los que se les realizó incubación con drogas fueron de 3 y 6/7 dpf.

Preparación de larvas para el registro *in vivo* de imágenes de Ca^{2+}

Las larvas Tg[Brn3c:Gal4;UAS:GcAMP7a] fueron seleccionadas a los 3 ó 4 dpf bajo una lupa de epifluorescencia (MZ10F, Leica), buscando la expresión de GCaMP7a en la vesícula ótica y los neuromastos.

El día de registro, las larvas fueron anestesiadas con metasulfonato de tricaina 0,02% en E3, colocados de manera lateral y fijados con sujetadores de alambre de tungsteno de 0.05 mm de diámetro sobre una cámara de registro de 5 ml de capacidad con un piso de SYLGARD® 184 (Sigma-Aldrich). Se realizaron dos incisiones para fijar a las larvas: una en la cabeza (entre el ojo y la vesícula ótica) y otra en la cola (entre los neuromastos primarios

LI.4 y LI.5) tal como indica la Figura 39. Previamente a la fijación de las larvas, las puntas de los alambres de tungsteno fueron afiladas con un sistema de oxido-reducción formado por un circuito cerrado entre una batería de 9V y una solución de NaOH 5M, con el fin de lograr un extremo de entre 0,025 y 0,035 mm de diámetro (Lukasz & Kindt, 2018).

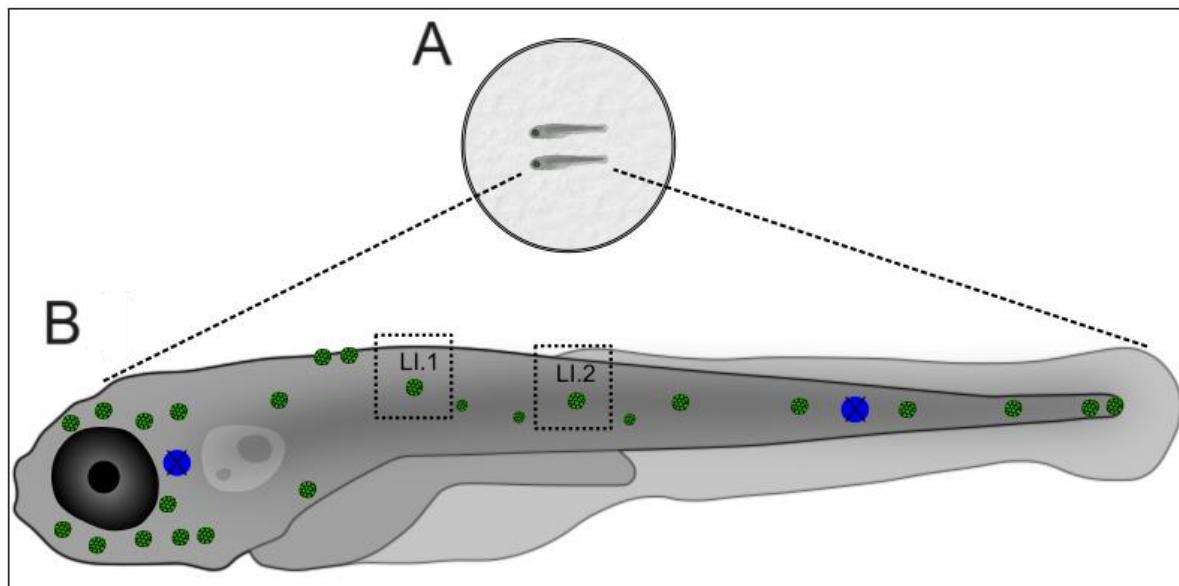


Figura 39: (A) Esquema de la cámara de registro utilizada para la adquisición *in vivo* de imágenes de Ca^{2+} , compuesta por un piso de SYLGARD® donde las larvas de 3 a 7 dpf fueron ubicadas de a dos individuos por registro. (B) Representación de una larva de 5 dpf, donde se observan los neuromastos en verde. Las larvas se fijaron con sujetadores de alambre de tungsteno previamente afilados en dos ubicaciones a lo largo del cuerpo (puntos azules). Los registros de Ca^{2+} se realizaron sobre los neuromastos primarios LI.1 y LI.2 (cuadrados punteados).

Para suprimir el movimiento del pez durante el registro de imágenes, se inyectó, 1.5 o 3 nl (para larvas 3-5 dpf y 6-7 dpf, respectivamente) de α -bungarotoxina (α -BTX) 300 μM dentro del corazón (Lukasz & Kindt, 2018). α -BTX es una toxina que se une irreversiblemente al receptor colinérgico nicotínico muscular, inhibiendo el movimiento de los músculos esqueléticos (Nirthanan & Gwee, 2004). Por otro lado, α -BTX bloquea al nAChR $\alpha 9$ presente en la sinapsis eferente de la LL del pez cebra (Carpaneto 2021), pero dicha unión es reversible (Trapani & Nicolson, 2010). Por estos motivos, esta técnica resulta adecuada para realizar estudios en la LL sin afectar el funcionamiento normal de las CCs.

Estudio de la actividad eléctrica espontánea a través de imágenes de Ca²⁺ (Imaging de Ca)

Los estadios elegidos para el estudio de actividad eléctrica en las células ciliadas del neuromasto fueron de 3 a 7 dpf. En todos los casos, los registros se realizaron sin aplicación de estímulos para captar la actividad espontánea de las CCs, en el medio *Neuronal Buffer* (NB) (en mM: NaCl 140; KCl 2; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; HEPES buffer 10, pH 7.3) (Lukasz & Kindt, 2018).

Se registraron únicamente los neuromastos LI.1 y LI.2 por individuo (Figura 4X). Luego de localizar el neuromasto a estudiar, se eligió un plano focal que permitió visualizar la mayor cantidad de CCs posible (Figura 40A). Todas las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Leica TCS SPE con un objetivo de inmersión en agua 40X y NA = 0.8. La configuración de adquisición se estableció mediante el software LAS X (Leica Application Suite X) y el eje X,Y,t se fijó con una profundidad de intensidad de fluorescencia de 12 bits. Se iluminó a la larva con un láser de $\lambda = 488$ nm y se tomó 1 imagen cada 0.243 seg (4.11 Hz) durante 5 minutos. El espectro de emisión detectado fue entre $\lambda = 500$ y $\lambda = 550$ nm y la resolución de cada una de estas imágenes fue de 128 x 128 píxeles.

Procesamiento de las imágenes

Las imágenes de fluorescencia fueron procesadas utilizando la distribución FIJI del software ImageJ (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012).

Debido a la presencia de movimientos peristálticos lentos en el intestino del pez (que no son bloqueados con la aplicación de α -BTX en el corazón), la preparación sufrió ligeros desplazamientos en el eje dorsoventral (eje Y de la adquisición), que fueron corregidos previo al análisis de las imágenes de fluorescencia mediante la aplicación del *plugin Template Matching*. Dicho *plugin* permite realizar un alineamiento de una estructura definida por su intensidad de luz con una resolución subpixel para lograr una imagen estable. Los neuromastos que, luego de ser corregidos, presentaron alguna fluctuación en el eje Z fueron descartados.

En cada adquisición se identificaron las CCs y se las estudió individualmente, delimitando regiones de interés (ROIs) con la herramienta de selección a mano alzada (Figura 40B, 40C). Se evitó el solapamiento de dichos ROIs mediante la comparación de los perfiles de fluorescencia de manera individual.

El fondo, o *background* (*bg*), es una porción de la adquisición donde no hay moléculas fluorescentes y solo aporta ruido al sistema en estudio. Por ello, para el procesamiento de las fluctuaciones de Ca^{2+} , a cada ROI se le restó el valor del *bg* a su respectiva imagen.

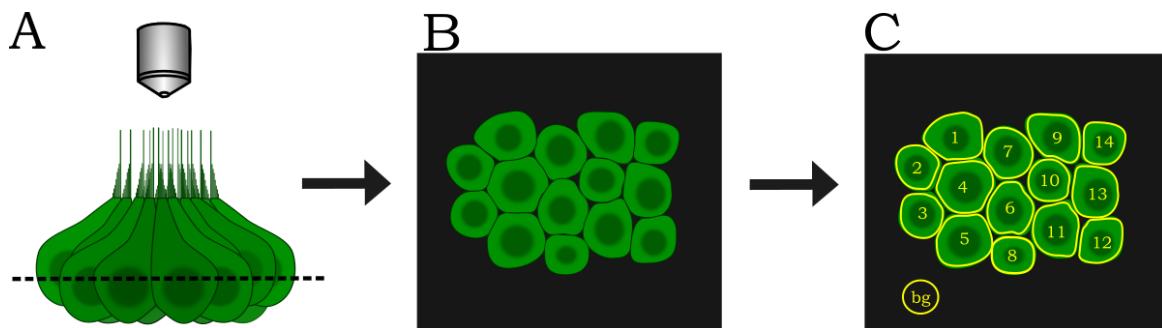


Figura 40: (A) Vista lateral de las CCs de un neuromasto expresando el sensor de Ca^{2+} GCaMP7a. Para la adquisición, el objetivo está ubicado en la parte dorsal del neuromasto. (B) Vista del plano elegido en el microscopio confocal donde se observa un corte transversal de las CCs en verde. El núcleo de la célula está representado como un círculo más oscuro ya que la proteína GCaMP7a se encuentra en el citosol de la célula. (C) Regiones de interés (líneas amarillas) con su respectiva identificación, marcando el número de CCs (1 - 14, en el ejemplo) y el *background* (*bg*).

Luego, se observó el perfil de fluorescencia del neuromasto completo para observar si había un decaimiento general de la actividad causado por la pérdida de la capacidad poblacional de las moléculas de GCaMP7a de emitir fluorescencia (*bleaching*). De ser necesario, se aplicó el *plugin Bleach correction* en la configuración *Exponencial fit* (Miura, K., 2020), el cual ajusta el decaimiento a una ecuación exponencial del tipo $y = a * e^{-bx} + c$ y permite corregir la caída tal como vemos en la Figura 41.

Luego de la corrección por *bleaching*, se obtuvo la intensidad de fluorescencia promedio de cada ROI (*f*). La intensidad de fluorescencia promedio del *bg* (f_{bg}) se obtuvo a partir de la adquisición original. Se calculó el valor de fluorescencia promedio (*F*) final para cada ROI, siendo $F = f - f_{bg}$. Las imágenes correspondientes a los primeros 10 puntos temporales (*frames*) fueron removidas del análisis, quedándonos con una serie temporal de 1247 valores (≈ 300 seg).

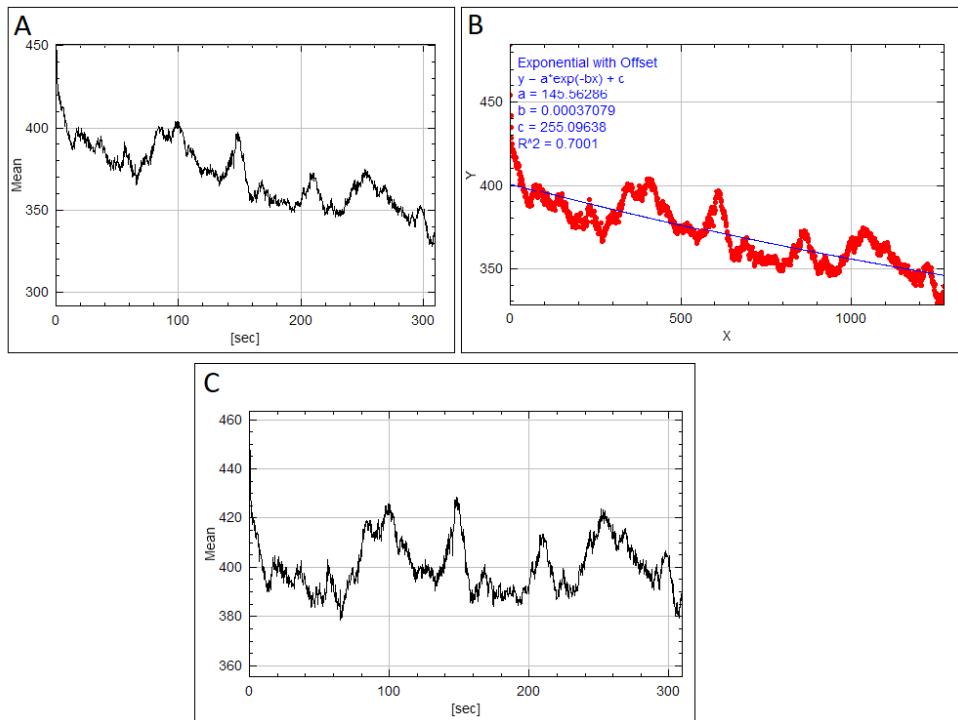


Figura 41: (A) Gráfico de intensidad de fluorescencia en función del tiempo antes de la corrección por decaimiento. (B) La herramienta *Bleach Correction* ajusta una curva exponencial (línea azul) al perfil original (puntos rojos). (C) Perfil de fluorescencia normalizado luego de la corrección.

Determinación de una línea de base dinámica (F_0)

Una de las mayores dificultades de este análisis fue elegir una línea de base (F_0) óptima con la cual normalizar los valores de actividad ($\Delta F/F_0$) para posteriormente compararlos. En términos generales, al analizar adquisiciones de actividad eléctrica evocada, F_0 se suele calcular sobre un segmento del registro anterior al estímulo; sin embargo, dada la naturaleza de las señales estudiadas en esta tesis (actividad espontánea), el primer tramo de la adquisición tiene las mismas probabilidades de tener actividad que cualquier otro punto del registro. Es decir, no podemos utilizar un punto específico en el tiempo para definir F_0 .

Dada la compleja dinámica que presentaron los registros de las transiciones espontáneas de Ca^{2+} en CCs, se optó por implementar el programa *Toolbox* de código abierto en lenguaje Matlab (Romano S. et al., 2017), que ofrece una serie de algoritmos de segmentación, procesamiento y detección que se adapta a distintas series de datos según la necesidad del usuario. Dicho programa nos permitió discriminar entre la actividad generada por la CC y la fluorescencia basal para cada ROI en función del tiempo ($F_0(t)$). Para estimar $F_0(t)$, se calculó el percentil 5 de fluorescencia F utilizando una ventana temporal móvil ($T_{wd} = 1.5$ seg) que se deslizó a lo largo de toda la duración de los registros. De esta manera, se obtuvo una

estimación robusta y suavizada de la línea de base de fluorescencia a lo largo del tiempo, que fue crucial para la posterior discriminación de actividad con diferentes perfiles temporales más rápidos.

Estimación del ruido del sistema y umbral de detección

Para realizar la estimación del ruido de fluorescencia basal (σ), el *Toolbox* primero realiza un ajuste Gaussiano de los valores negativos de $\Delta F/F_0$ para cada registro individual de CC (Figura 42A). Estas fluctuaciones negativas son dominadas por el ruido de registro (ya que la actividad exhibida por la CC induce fluctuaciones positivas), por lo que la desviación estándar σ de la gaussiana ajustada nos permite caracterizar una escala de magnitud del ruido de cada registro de CC. Esta escala de ruido por sí sola no fue suficiente para estimar un umbral estático que nos permita detectar la actividad de forma robusta. Por lo tanto, se decidió inferir un umbral sobre la dinámica temporal de los registros. Para ello, con el valor de σ de cada CC se realizó una transformación z-score de los registros de fluorescencia de todos las CCs, lo que permite adaptar cada registro de CC a su nivel de ruido individual. Para analizar la dinámica temporal del conjunto de datos, se toma un punto temporal “i” de cada registro transformado en z-score, y se lo compara con el subsiguiente “i+1” (Figura 42B). Los puntos que se ubican lejos de la distribución de ruido (una distribución gaussiana bivariada de z-score con varianza 1 y media 0) son considerados “actividad” (Figura 42C). Esta metodología permite entonces detectar, de forma adaptada a las características propias de cada registro, dinámicas temporales que no pueden ser explicadas por un ruido gaussiano. Para clasificar los puntos del registro que tienen menor probabilidad de ser parte de la población de ruido y que por consiguiente serán tomados como actividad (puntos en la región amarilla de la Figura 42B), se estableció un umbral de confianza de 99% en base a las distribuciones de probabilidad inferidas en la Figura 42C.

Como resultado, el *Toolbox* nos devuelve dicho umbral dinámico de detección en forma de matriz de 0 y 1 (*raster*), representando ausencia y presencia de actividad, respectivamente.

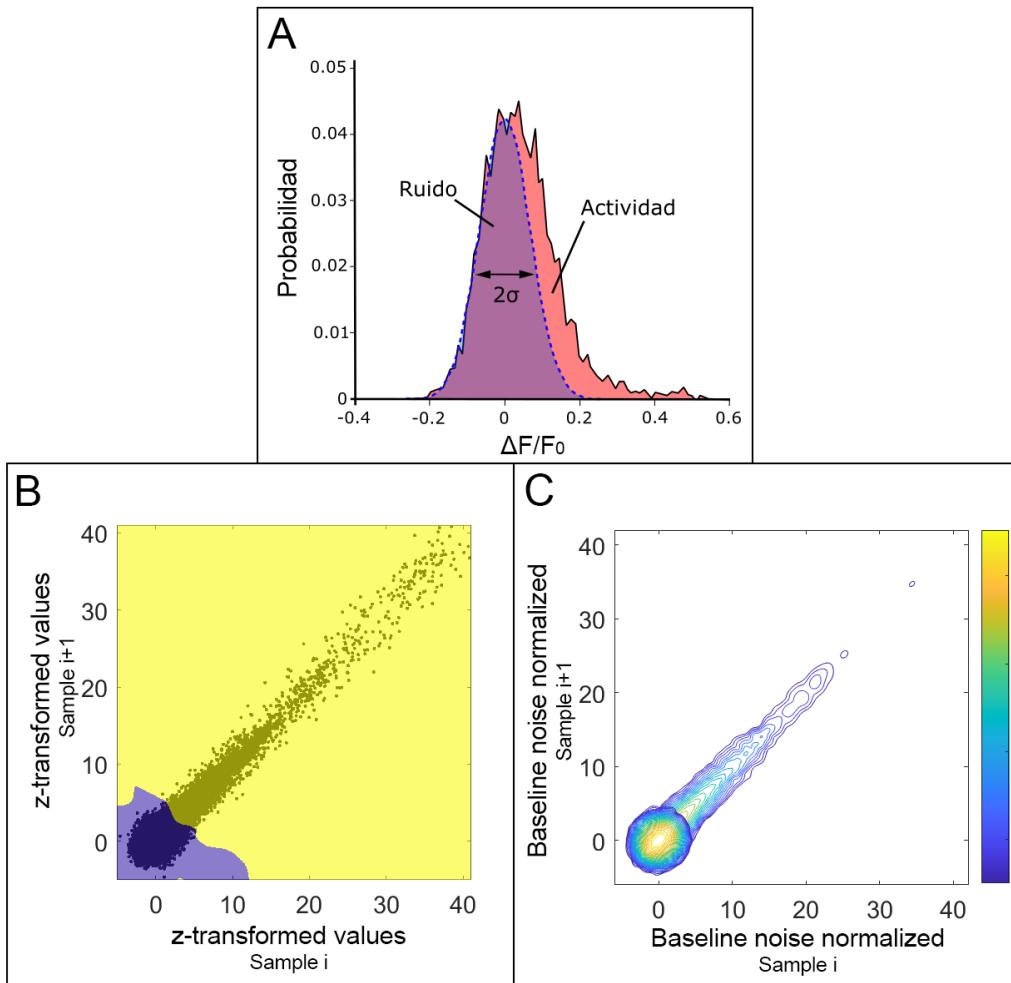


Figura 42: (A) Histograma representativo de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) para un ROI. La línea negra muestra la distribución de los valores reales de $\Delta F/F_0$ y la línea azul punteada muestra un ajuste Gaussiano de los valores negativos de $\Delta F/F_0$ para la estimación de σ . Los valores de $\Delta F/F_0$ correspondientes al solapamiento de las dos curvas (zona violeta) se definieron como ruido. El área rosada incluye los valores de actividad (Adaptado de Romano S. et al., 2017). (B) Gráfico de dispersión de la diferencia de intensidad de fluorescencia en un punto del tiempo (i) con su punto subsiguiente (i+1). (C) Mapa de densidad de probabilidad del modelo de ruido (distribución arredondeada centrada en el origen) superpuesto sobre el mapa de densidad de probabilidad para los puntos en B (que muestra una cola que se extiende a lo largo de la diagonal, donde se encuentran los registros de actividad que no pueden ser explicados por el ruido). La escala de pseudocolor representa el valor de probabilidad para dicha distribución.

Determinación de la magnitud promedio de actividad

La magnitud promedio, en todos los casos, se determinó como el área bajo la curva de aquellos valores de $\Delta F/F_0$ que representaron actividad, dividido por el tiempo total del registro. Para dicho cálculo, se sumaron los valores de $\Delta F/F_0$ cuyo *raster* era equivalente a 1.

Para el estudio de magnitud total promedio se realizó una primera rectificación de cada registro con una $Twd = 15$ seg. Las CCs consideradas activas fueron aquellas cuya magnitud total fue $> 1.5\%$. El porcentaje de CCs activas por NM se determinó dividiendo la suma de las CCs activas por el número total de CCs por NM.

Discriminación de las señales de Ca^{2+} con diferentes perfiles temporales

Eventos rápidos (o picos): Los registros originales obtenidos de las adquisiciones de imágenes de Ca^{2+} (Figura 43A) se procesaron en el *Toolbox* definiendo una $Twd = 1.5$ seg (Figura 43B). El $F_0(t)$ obtenido fue utilizado para el cálculo de $\Delta F/F_0$. A partir de esta normalización, el programa nos devolvió la detección de eventos individuales de Ca^{2+} por CC (Figura 43C) con su respectiva amplitud y duración. Para minimizar el ruido generado por registros con baja fluorescencia basal, decidimos quedarnos con picos cuya duración fue mayor a 1 segundo (es decir, más de 3 adquisiciones). De esta manera, mediante códigos personalizados en Python, se determinó la frecuencia de eventos rápidos de Ca^{2+} para cada tratamiento (número de eventos dividido por el tiempo total de registro), la amplitud y duración de picos promedio por CC. Dichos valores fueron promediados para obtener un sólo valor de cada parámetro por NM. La función de $F_0(t)$, por otro lado, fue guardada para el procesamiento y posterior estudio de las señales lentas.

Eventos lentos (u olas): La función de $F_0(t)$ obtenida anteriormente fue utilizada como registro de señales lentas (ya sin presencia de picos). Se procesó en el *Toolbox* nuevamente, definiendo una $Twd = 15$ seg para rectificar la señal y a partir de ello, se obtuvo un nuevo $F_0(t)$ (Figura 43D), el cual se utilizó para normalizar la señal y realizar la detección de actividad (Figura 43E). A partir de estos resultados se calculó la magnitud promedio como se explicó anteriormente.

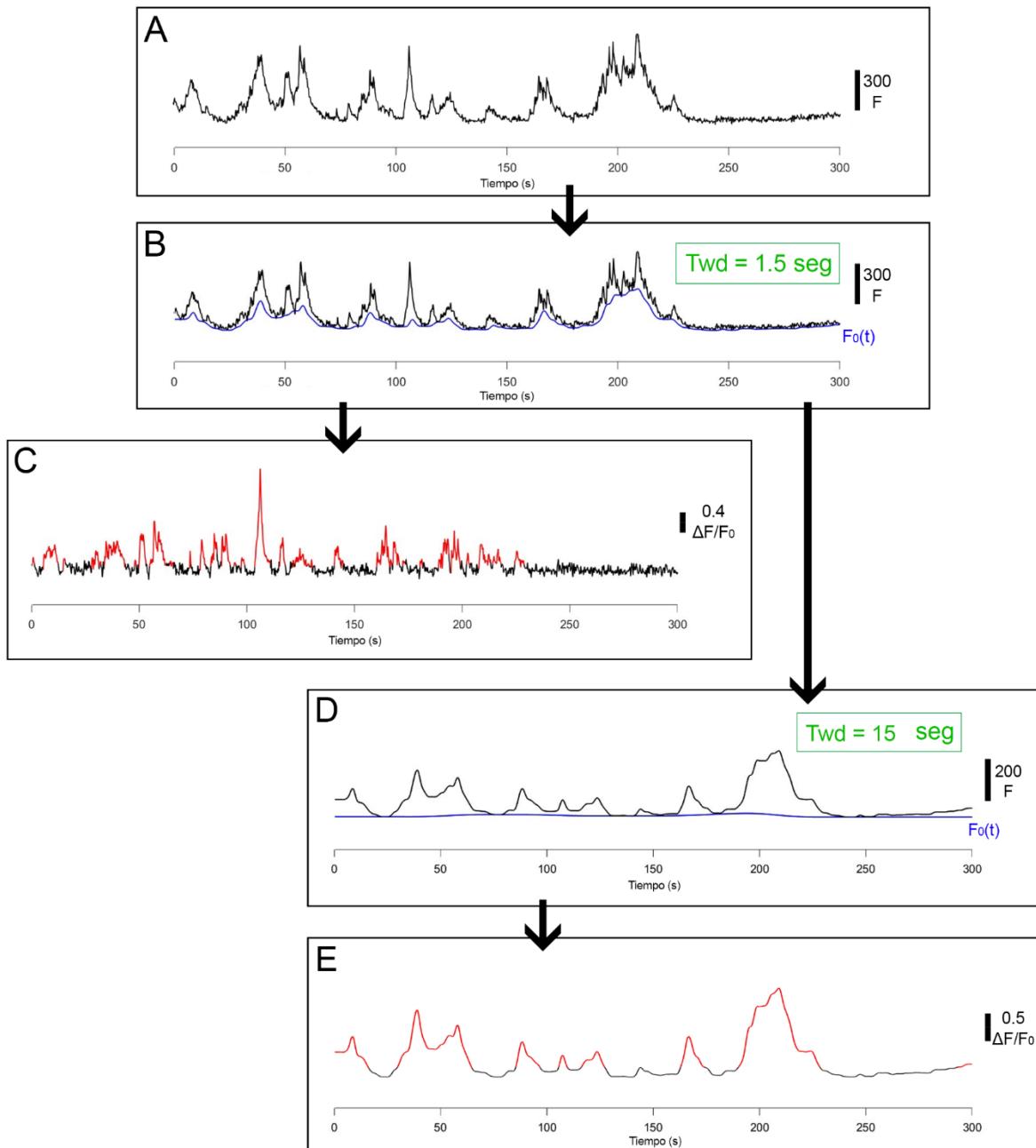


Figura 43: Representación del procesamiento de los registros de *imaging de Ca*. (A) Perfil de fluorescencia (F) representativo en función del tiempo de una CC conteniendo eventos de actividad de distintas frecuencias. (B) Procesamiento del registro original en el *Toolbox* con una $Twd = 1.5$ seg. Se muestra el $F_0(t)$ (línea azul) utilizado para el cálculo de $\Delta F/F_0$ para eventos rápidos. (C) Perfil de fluorescencia normalizado ($\Delta F/F_0$) en función del tiempo para eventos rápidos. (D) El $F_0(t)$ obtenido con $Twd = 1.5$ seg (línea azul en B) fue utilizado para estudiar las fluctuaciones lentas de Ca. Estos datos fueron procesados en el *Toolbox* con una $Twd = 15$ seg. (E) Perfil de fluorescencia normalizado ($\Delta F/F_0$) en función del tiempo para eventos lentos. (C, E) Las líneas rojas representan aquellas porciones del registro consideradas como activas.

Estudio farmacológico de la modulación de la actividad eléctrica espontánea

Las adquisiciones para evaluar modulación de la actividad eléctrica espontánea fueron hechas con drogas disueltas en la solución de registro NB. Para facilitar la entrada de los compuestos de interés a las CCs de peces cebra intactos, se suplementó el medio NB con dimetilsulfóxido (DMSO) 0.1% (Xiong et al., 2016). El DMSO se utilizó solo en el momento de las adquisiciones ya que la exposición prolongada, aún a concentraciones de hasta 0.01%, altera la actividad locomotora de las larvas si es suministrada desde estadios tempranos del desarrollo (Chen et al., 2011). En todos los casos, las adquisiciones fueron realizadas en ausencia y en presencia de la droga de manera consecutiva.

En primer lugar, las larvas fueron preincubadas en NB + DMSO 0,1% por 5 minutos y a continuación se realizó una primera adquisición en ausencia de droga. Posteriormente, se agregó la droga en estudio en el medio NB + DMSO 0,1% y las larvas fueron incubadas en dicha solución durante 15 minutos. Finalmente, se realizó la adquisición en presencia de la droga. La duración total del protocolo arriba descrito fue de aproximadamente 1 hora por placa de registro.

Con el fin de comparar los niveles de Ca registrados en ausencia y en presencia de la droga en el mismo neuromasto, se utilizaron los mismos parámetros de adquisición (intensidad del láser, apertura del *pinhole*, potencia del fotomultiplicador y factor de zoom digital) en ambos registros.

Drogas

Las siguientes sales y drogas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Argentina): NaCl, CaCl₂, KCl, MgSO₄, HEPES, isradipina, DMSO. Apamina y α -bungarotoxina fueron adquiridas de Alomone Labs®. MRS 2500 y PPADS fueron adquiridas de Tocris Bioscience®. Las concentraciones utilizadas de α -bungarotoxina, apamina, PPADS, MRS2500 e isradipina fue de 10 μ M.

Unidades experimentales y análisis estadístico

Para los experimentos con NB: $N_{3dpf} = 173$ células (21 NM), $N_{4dpf} = 120$ células (12 NM), $N_{5dpf} = 110$ células (8 NM), $N_{6-7dpf} = 130$ células (9 NM).

Para los registros control con DMSO: $N_{3dpf} = 56$ células (10 NM), $N_{7dpf} = 47$ células (5 NM).

Para la incubación con: α -bungarotoxina: $N_{3dpf} = 50$ células (12 NM), $N_{6-7dpf} = 178$ células (12 NM); apamina: $N_{6-7dpf} = 45$ células (4 NM); MRS 2500: $N_{6-7dpf} = 45$ células (7 NM); PPADS: $N_{6-7dpf} = 49$ células (6 NM); isradipina: $N_{3dpf} = 36$ células (6 NM), $N_{7dpf} = 40$ células (3 NM).

El cálculo de frecuencia de eventos y los valores de magnitud promedio por NM se realizaron a través de códigos personalizados escritos en Python.

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.0. Para las comparaciones estadísticas pareadas entre dos grupos se utilizó el test pareado de T, en los tratamientos cuyos datos cumplían con una distribución normal y homogeneidad de varianzas según el test de Fisher. Para datos que no cumplían estos supuestos, se aplicó el test de Wilcoxon (o *Wilcoxon signed-rank test*).

Por otro lado, para la comparación no pareada de más de dos grupos se realizó el test de ANOVA de una vía en todos los casos. A los datos que no cumplieron con el test de homogeneidad de varianzas de Bartlett, se les aplicó la corrección de Welch al análisis. Para las pruebas *post hoc* de comparaciones múltiples se aplicó el test de Tukey, para datos que cumplieron con los test de homogeneidad de varianzas, o el test Games-Howell, para datos que no cumplieron con el test de homogeneidad de varianzas.

La significancia estadística se reporta en todos los casos con un $\alpha < 0.05$.

Resultados

Caracterización de los patrones de actividad eléctrica espontánea expresada en CCs de LL en desarrollo

Con el objetivo de caracterizar los patrones de AEE que exhiben las CCs en distintos estadios del desarrollo, realizamos adquisiciones *in vivo* en larvas intactas de 3, 4, 5 y 6/7 dpf que expresan el sensor de calcio (Ca^{2+}) genéticamente codificado GCaMP7a en el citosol de las CCs maduras de los NMs y detectamos las fluctuaciones transitorias de calcio presentes en el sistema. Analizamos las regiones de interés (ROIs) de cada una de las CCs que componen el NM (ver “Materiales y Métodos”) y fuimos capaces de encontrar AEE en todos los estadios estudiados (Figura 44).

Cuantificamos la magnitud total promedio de las señales de Ca^{2+} , en NMs de 3 a 7 dpf y encontramos un máximo a los 4 dpf seguido por una bajada a los 5 dpf. (Figura 45A. ($\% \Delta F/F_0$), **3 dpf**: 2.42 ± 0.29 , $N_{3\text{dpf}}=21$; **4 dpf**: 4.43 ± 0.47 , $N_{4\text{dpf}}=12$; **5 dpf**: 1.97 ± 0.31 , $N_{5\text{dpf}}=8$; **6/7 dpf**: 4.15 ± 1.06 , $N_{6/7\text{dpf}}=9$; ANOVA de una vía con corrección de Welch, ** $p=0.0023$). Este aumento en la magnitud se debe, en parte, a que a los 4 dpf los NMs presentan un mayor número de células activas, evidenciando un mayor reclutamiento de CCs por NM (Figura 45B, **3 dpf**: 0.41 ± 0.040 , $N_{3\text{dpf}}=21$; **4 dpf**: 0.56 ± 0.034 , $N_{4\text{dpf}}=12$; **5 dpf**: 0.38 ± 0.047 , $N_{5\text{dpf}}=8$; **6/7 dpf**: 0.40 ± 0.062 , $N_{6/7\text{dpf}}=9$; ANOVA de una vía con corrección de Welch, * $p=0.0157$).

Además, al analizar los registros hechos sobre las CCs a distintos días, encontramos que los aumentos transitorios en la concentración intracelular de Ca^{2+} están compuestos por 2 tipos de eventos con dinámicas temporales diferentes. Por un lado, observamos señales de Ca^{2+} caracterizadas por subidas y bajadas suaves, de varios segundos de duración, a las cuales denominamos transientes lentos u olas de Ca^{2+} . Por otro lado, evidenciamos eventos más rápidos, caracterizados por un aumento y un decaimiento más pronunciado de la señal

de Ca^{2+} , a los cuales denominamos transientes rápidos o picos de Ca^{2+} . Debido a que las señales rápidas encontradas en estas células no fueron descritas anteriormente, analizamos los dos componentes del registro por separado discriminando sus frecuencias (Figura 46).

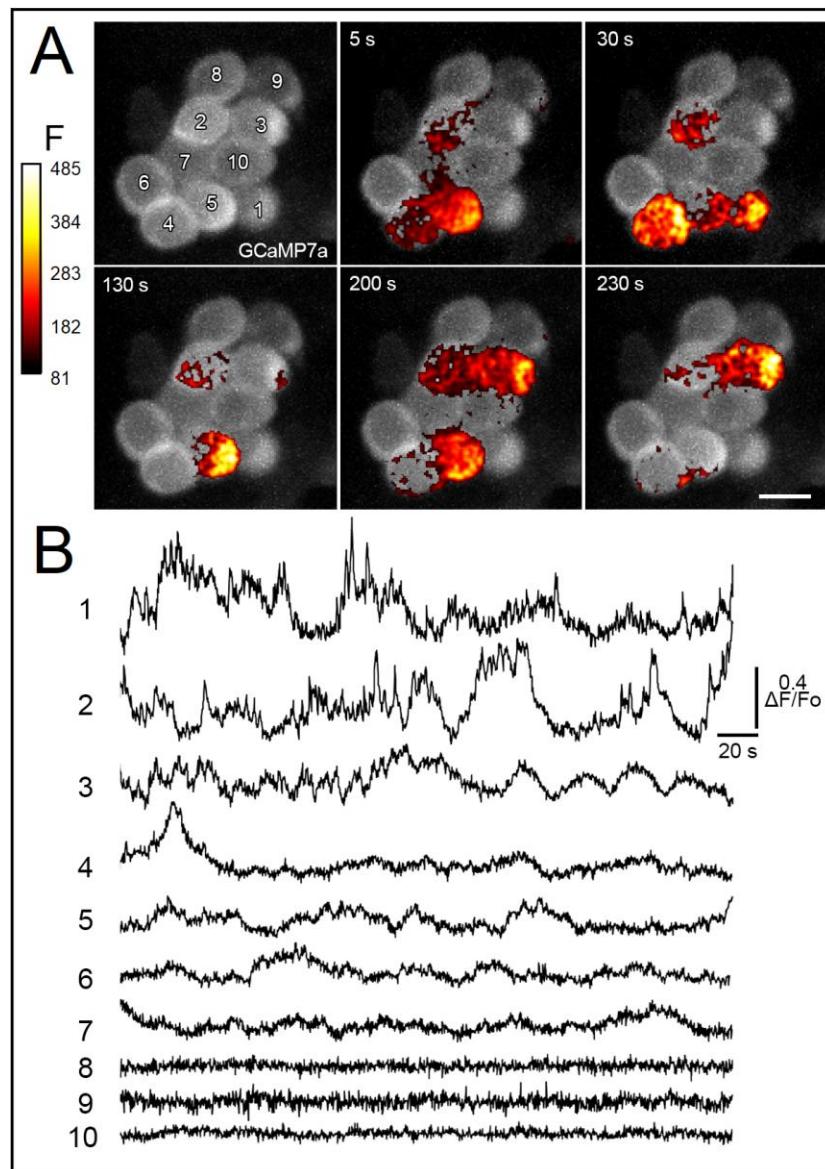


Figura 44: Registro representativo de las transiciones de Ca^{2+} detectadas en un NM a 3 dpf. (A) Serie de imágenes a distintos tiempos de un NM que expresa GCaMP7a en CCs (gris). Cada célula está identificada con un número. Las elevaciones en la concentración de Ca^{2+} están representadas por un *heatmap* en escala de pseudocolor donde los colores más oscuros corresponden a valores de fluorescencia menores y los más claros a valores de fluorescencia mayores (panel izquierdo). Barra de escala: 5 μm . (B) Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} normalizados ($\Delta F/F_0$) para cada CC enumerada en A.

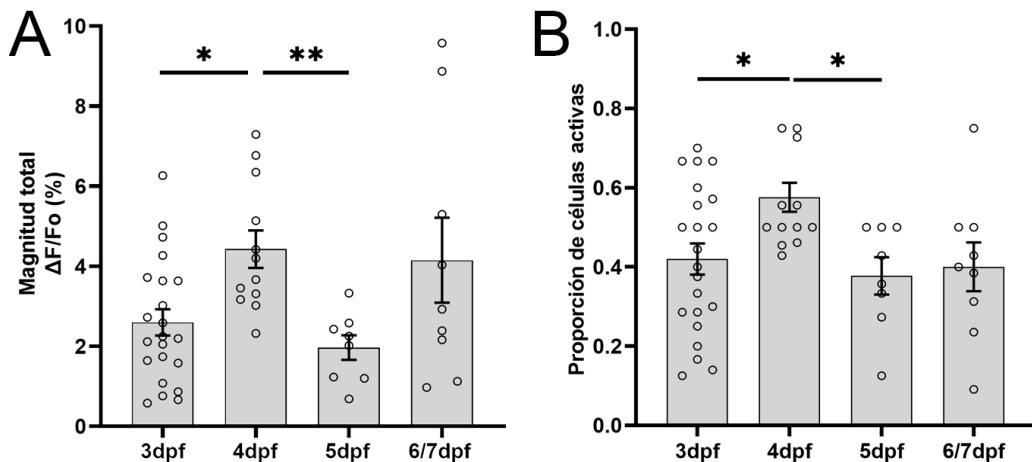


Figura 45: A los 4 dpf, los NM s exhiben un máximo en la magnitud de AEE explicada, en parte, por un aumento en la proporción de CCs activas. (A) Magnitud total promedio de la actividad detectada a distintos tiempos del desarrollo. (B) Proporción de células activas (aquellas que presentan una magnitud $> 1.5\%$). Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa un neuromasto. (A) ANOVA de una vía con corrección de Welch, ** $p=0.0023$, test de Games-Howell *post hoc*. **3 vs 4**: * $p=0.020$; **4 vs 5**: ** $p=0.0019$; **5 vs 6/7**: $p=0.261$. (B) ANOVA de una vía con corrección de Welch, * $p=0.0115$, test de Tamhane *post hoc*. **3 vs 4**: * $p=0.020$; **4 vs 5**: * $p=0.0241$; **5 vs 6/7**: $p=0.988$.

Nos preguntamos si estos componentes de la actividad espontánea que exhiben las CCs varían a lo largo del desarrollo. Procesamos los registros discriminando los eventos lentos y rápidos (ver “Materiales y Métodos”) y calculamos la magnitud promedio para cada caso. La magnitud promedio de los transientes lentos presentó un perfil similar a la magnitud total, exhibiendo un máximo a los 4 dpf que luego desciende a los 5 dpf (Figura 47A. (% $\Delta F/F_0$), **3 dpf**: 3.28 ± 0.28 , $N_{3dpf}=21$; **4 dpf**: 5.65 ± 0.54 , $N_{4dpf}=12$; **5 dpf**: 2.38 ± 0.46 , $N_{5dpf}=8$; **6/7 dpf**: 4.98 ± 0.91 , $N_{6/7dpf}=9$; ANOVA de una vía con corrección de Welch, ** $p=0.0014$). Al analizar la magnitud promedio de los transientes rápidos, observamos un aumento a los 4 dpf, que se sostiene hasta los 6/7 dpf (Figura 47B. (% $\Delta F/F_0$), **3 dpf**: 0.25 ± 0.045 , $N_{3dpf}=21$; **4 dpf**: 0.68 ± 0.11 , $N_{4dpf}=12$; **5 dpf**: 0.36 ± 0.092 , $N_{5dpf}=8$; **6/7 dpf**: 0.52 ± 0.13 , $N_{6/7dpf}=9$; ANOVA de una vía con corrección de Welch, * $p=0.0228$).

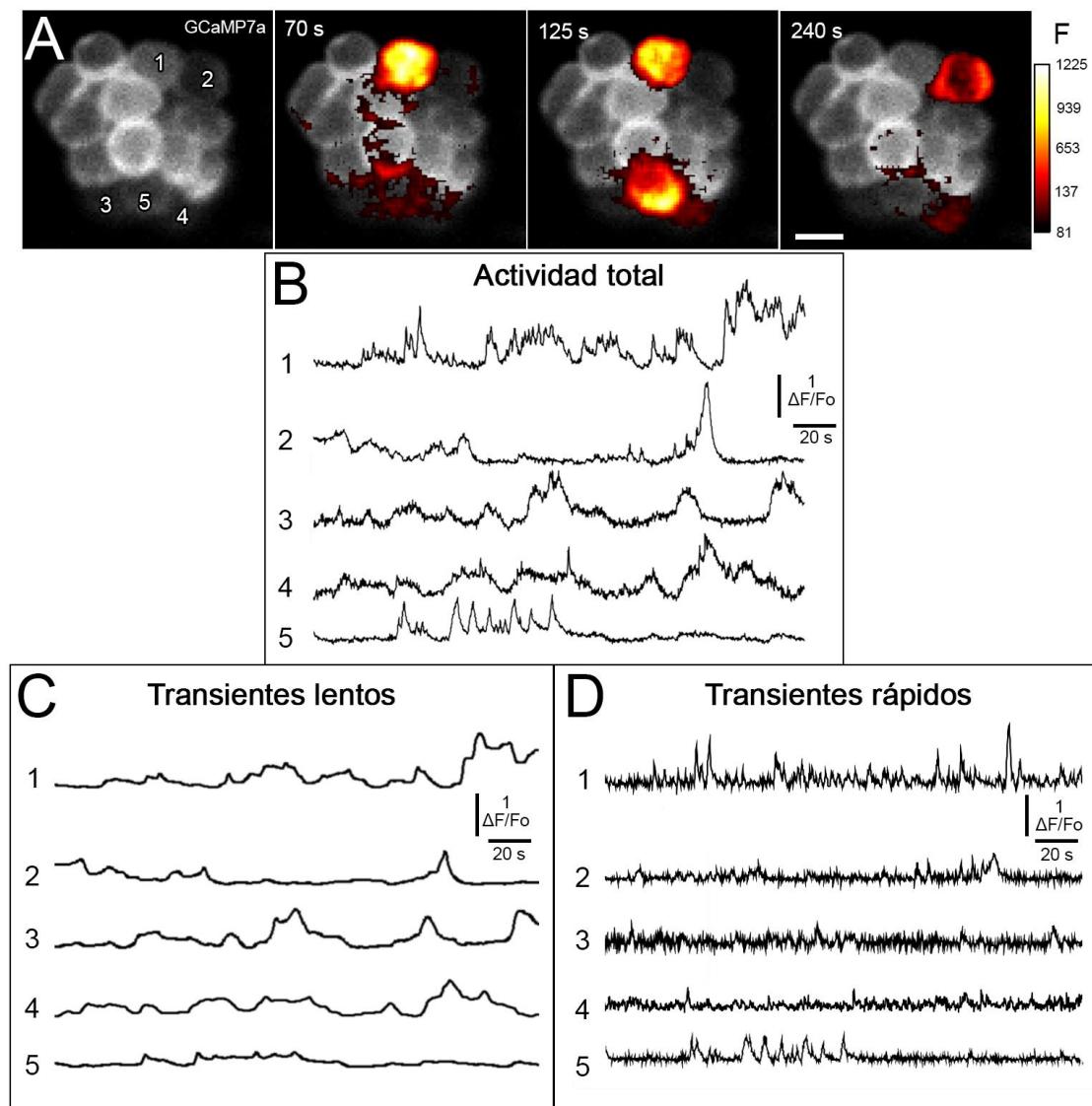


Figura 46: Serie de imágenes representativas a distintos tiempos de un NM a 6 dpf que expresa GCaMP7a en CCs (gris). Las elevaciones transitorias de Ca^{2+} están representadas por un *heatmap* en escala de pseudocolor siendo los colores más oscuros valores de fluorescencia menores y los más claros valores de fluorescencia mayores (panel derecho). Cada CC está identificada por un número. Barra de escala: 5 μm . (B-D) Curvas temporales de la actividad de Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$) para cada CC enumerada en A. (B) Perfil de actividad total de Ca^{2+} . (C) Perfil del componente lento de la actividad de Ca^{2+} . (D) Perfil del componente rápido de la actividad de Ca^{2+} .

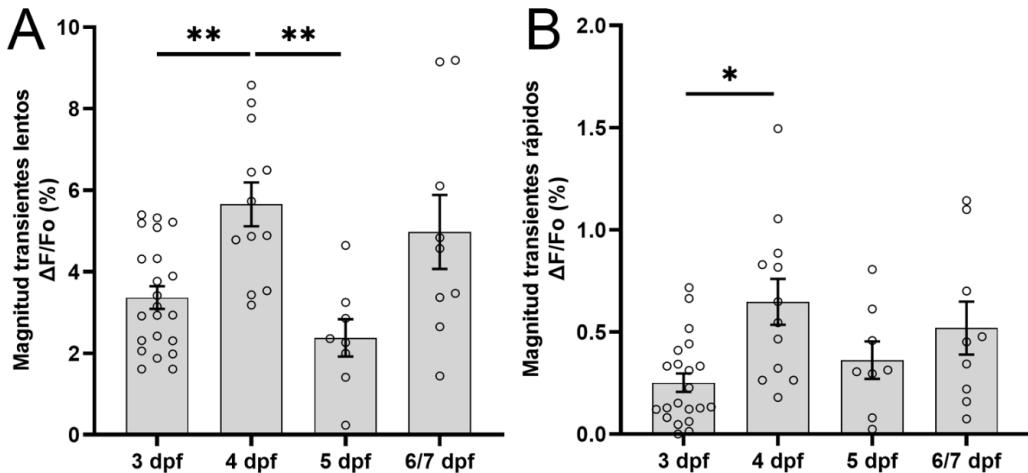


Figura 47: El aumento de la magnitud de AEE en CCs a los 4 dpf está dado por el aumento en la magnitud de transientes tanto lentos como rápidos. (A-B) Magnitud promedio de transientes (A) lentos y (B) rápidos a distintos tiempos del desarrollo expresada en porcentaje. Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa una neuromasto. (A) ANOVA de una vía con corrección de Welch, ** $p=0.0014$. Test de Games-Howell *post hoc*. **3 vs 4**: ** $p= 0.0053$; **4 vs 5**: ** $p=0.0011$; **5 vs 6/7**: $p=0.102$. (B) ANOVA de una vía con corrección de Welch, * $p=0.0228$. Test de Games-Howell *post hoc*. **3 vs 4**: * $p= 0.0244$; **4 vs 5**: $p=0.236$; **5 vs 6/7**: $p=0.759$.

Con el fin de caracterizar más en profundidad el componente rápido de la AEE, calculamos la frecuencia, amplitud y duración promedio de los eventos rápidos por NM, a distintos días del desarrollo. No encontramos diferencias significativas ni en la frecuencia (Figura 48A, (eventos/s), **3 dpf**: 0.0073 ± 0.0012 , $N_{3\text{dpf}}=21$; **4 dpf**: 0.011 ± 0.0015 , $N_{4\text{dpf}}=12$; **5 dpf**: 0.011 ± 0.0027 , $N_{5\text{dpf}}=8$; **6/7 dpf**: 0.0076 ± 0.0013 , $N_{6/7\text{dpf}}=9$; ANOVA de una vía, $p=0.288$) ni en la duración promedio de los eventos rápidos en los estadios estudiados (Figura 48B, (seg), **3 dpf**: 2.08 ± 0.095 , $N_{3\text{dpf}}=20$; **4 dpf**: 2.07 ± 0.102 , $N_{4\text{dpf}}=12$; **5 dpf**: 2.02 ± 0.078 , $N_{5\text{dpf}}=8$; **6/7 dpf**: 2.42 ± 0.15 , $N_{6/7\text{dpf}}=9$; ANOVA de una vía con corrección de Welch, $p=0.162$). Sin embargo, encontramos un aumento significativo en la amplitud promedio por NM a los 4 dpf (Figura 48C, ($\Delta F/F_0$)), **3 dpf**: 0.172 ± 0.011 , $N_{3\text{dpf}}=21$; **4 dpf**: 0.264 ± 0.020 , $N_{4\text{dpf}}=12$; **5 dpf**: 0.164 ± 0.010 , $N_{5\text{dpf}}=8$; **6/7 dpf**: 0.278 ± 0.045 , $N_{6/7\text{dpf}}=9$; ANOVA de una vía con corrección de Welch, ** $p=0.001$).

En resumen, nuestros resultados evidenciaron la presencia de AEE en las CCs de la LLP en estadios tempranos del desarrollo, desde los 3 hasta los 7 dpf. Dentro de los registros obtenidos de las transiciones de Ca^{2+} , se diferenciaron 2 tipos de eventos con patrones temporales diferentes, los cuales fueron analizados por separado. Encontramos un máximo de magnitud promedio de actividad a los 4 dpf explicado por un aumento en el reclutamiento de células activas y en la magnitud promedio de transientes tanto lentos como rápidos por NM. Además, evaluamos los transientes rápidos de Ca^{2+} a lo largo del desarrollo y observamos un aumento en la amplitud promedio de estos eventos por NM a los 4 dpf, mientras que de la frecuencia y duración permanecieron constantes.

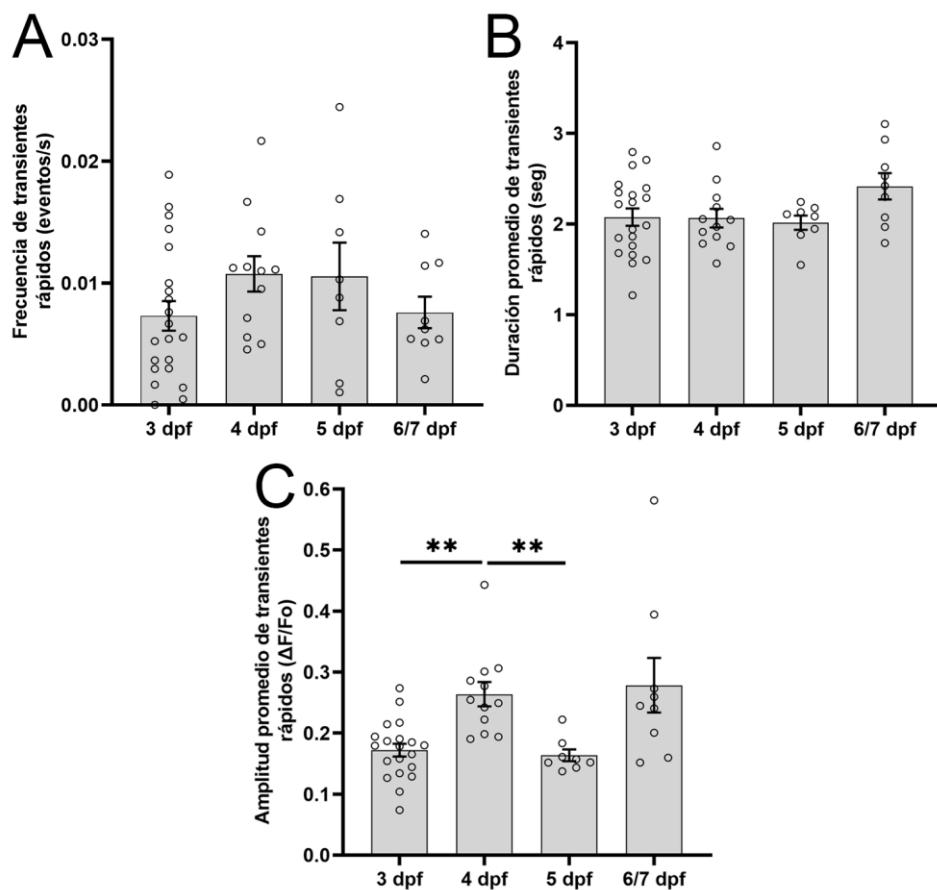


Figura 48: La amplitud promedio de los transientes rápidos de Ca^{2+} aumenta a los 4 dpf, mientras que la frecuencia y la duración promedio se mantienen constantes entre los 3 y los 7 dpf. (A) Frecuencia, (B) duración promedio y (C) amplitud promedio de transientes rápidos de Ca^{2+} . Las barras representan la media de los datos \pm SEM y cada punto representa un NM. (A) ANOVA de una vía, $p=0.281$. (B) ANOVA de una vía con corrección de Welch, $p=0.162$. (C) ANOVA de una vía con corrección de Welch, ** $p=0.001$. Test de Games-Howell post hoc. 3 vs 4: ** $p= 0.0041$; 4 vs 5: ** $p=0.002$; 5 vs 6/7: $p=0.127$.

Modulación de la actividad eléctrica espontánea expresada por las CCs de la línea lateral en desarrollo

La AEE expresada en CCs inmaduras ha sido estudiada en el sistema auditivo de mamíferos. Dicha actividad es crucial tanto para la supervivencia neuronal como para la formación, el refinamiento y el mantenimiento de los mapas tonotópicos. Trabajos anteriores han demostrado la importancia de la señalización tanto colinérgica como purinérgica en la modulación de la AEE expresada por las CCs en desarrollo (Babola et al., 2021; Ceriani et al., 2019; Clause et al., 2014; Holman et al., 2019; Kersbergen et al., 2022; Tritsch et al., 2007).

Con el objetivo de determinar si el sistema colinérgico y/o purinérgico modulan la AEE expresada por las CC de la LLP en desarrollo, realizamos experimentos de *imaging de Ca* en presencia de drogas antagonistas colinérgicas o purinérgicas a 6/7 dpf. En este estadio, el sistema de LLP se encuentra maduro y exhibiendo eventos de AEE. Todos los registros se realizaron en presencia de DMSO 0.1% (ver “Materiales y Métodos”).

El primer paso consistió en realizar experimentos control en presencia de DMSO 0.1% a 3 y 7 dpf, con el fin de descartar posibles cambios en los parámetros de interés a lo largo del tiempo durante el cual se ejecutó el protocolo (Figuras 49 y 50, Tabla 1). No observamos cambios en ninguno de los parámetros estudiados.

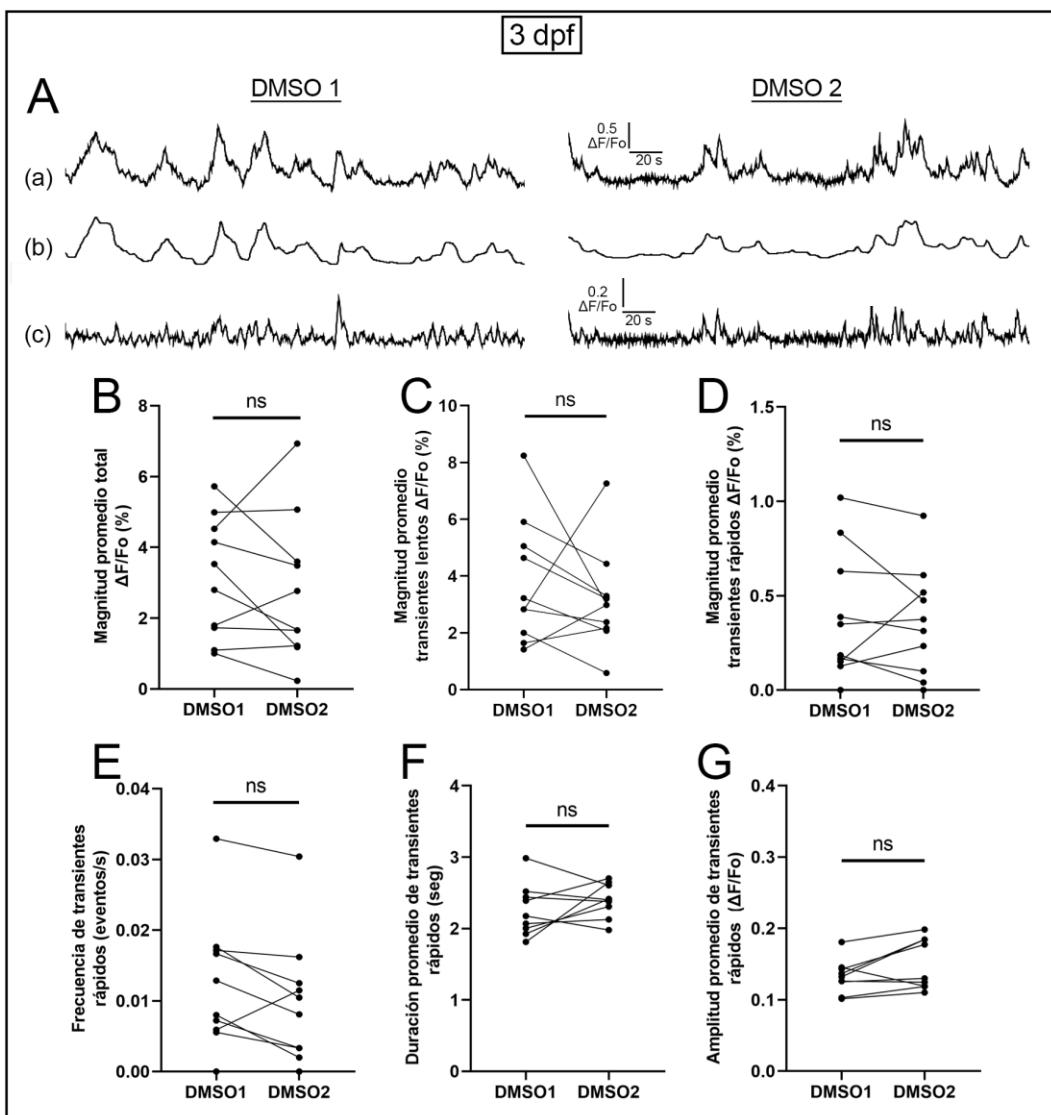


Figura 49: El DMSO 0.1% no afecta las señales de Ca^{2+} expresadas en CCs de la LL a 3 dpf. (A) Registros representativos de *Imaging de Ca* en una CC que expresa GCaMP7a a 3 dpf. (a) Perfil de actividad total en una CC sin estimulación externa, (b-c) perfil de los componentes de actividad correspondientes a los transientes lentos y rápidos. DMSO 1 y DMSO 2 refiere a dos adquisiciones de la misma CC con un intervalo de 20 minutos entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de transientes rápidos. Cada punto representa un NM. Test de Wilcoxon, (B) $p=0.557$, (C) $p=0.375$, (D) $p=0.570$, (E) $p=0.0742$. $N=10$ (F-G) Test pareado de T, (F) $p=0.306$, (G) $p=0.0718$. $N=9$.

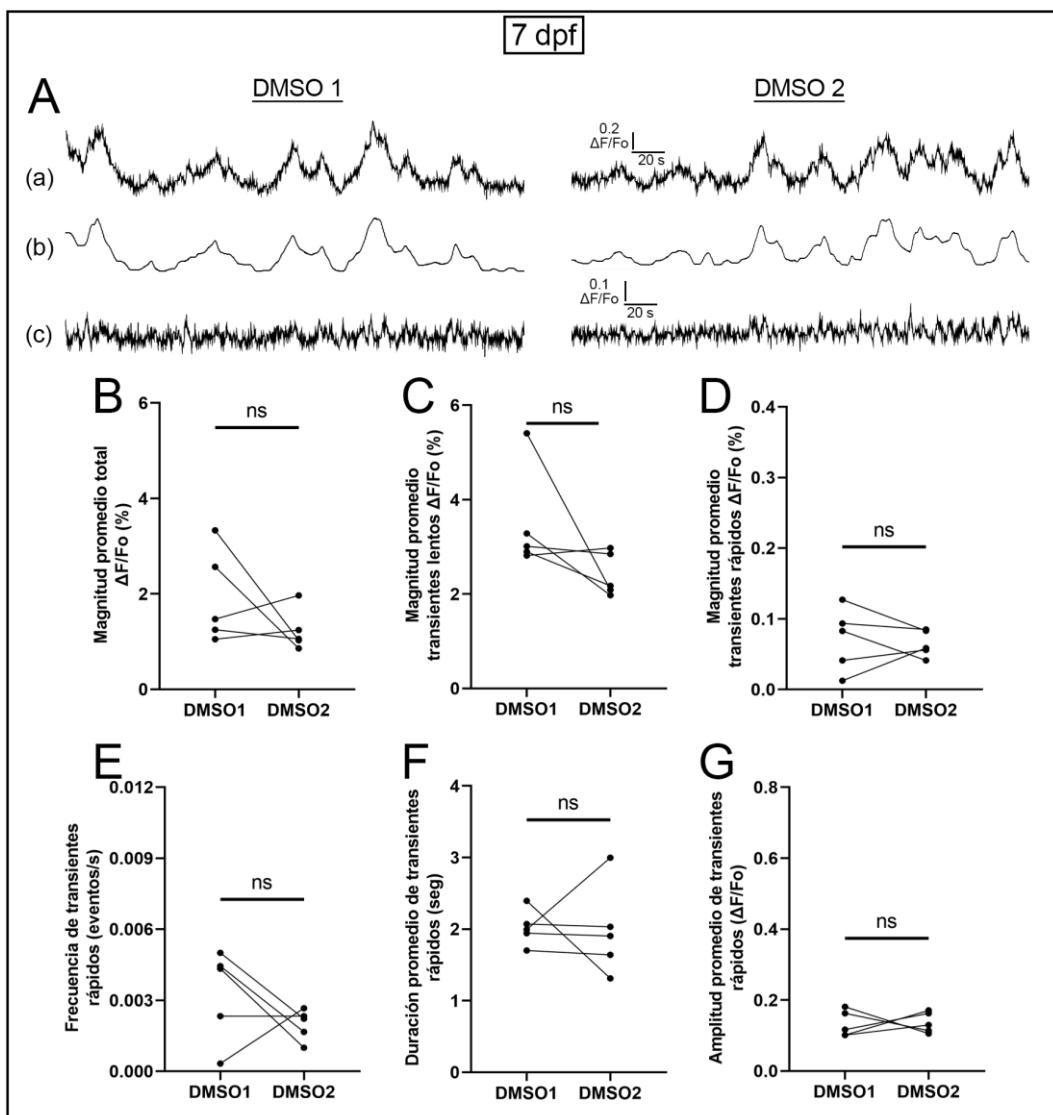


Figura 50: El DMSO 0.1% no afecta las señales de Ca^{2+} expresada en CCs de la LL a 7 dpf. (A) Registros representativos de *Imaging de Ca* en una CC que expresa GCaMP7a a 7 dpf. (a) Perfil de actividad total en una CC sin estimulación externa, (b-c) perfil de los componentes de actividad correspondientes a los transientes lentos y rápidos. DMSO 1 y DMSO 2 refiere a dos adquisiciones de la misma CC con un intervalo de 20 minutos entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de transientes rápidos. Cada punto representa un NM. (B-G) Test de Wilcoxon, (B) $p=0.625$, (D) $p=0.125$, (D) $p>0.999$, (E) $p=0.2502$, (F) $p=0.438$, (G) $p>0.999$. N=5.

	3 dpf			7 dpf		
	DMSO 1	DMSO 2	p valor	DMSO 1	DMSO 2	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	3.16 (2.89)	2.22 (2.75)	0.557 (ns)	1.47 (0.80)	1.06 (0.66)	0.625 (ns)
Magnitud Lentos (% $\Delta F/F_0$)	3.02 (3.36)	2.99 (1.44)	0.375 (ns)	3.01 (1.49)	2.17 (0.88)	0.125 (ns)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	0.267 (0.534)	0.344 (0.455)	0.570 (ns)	0.083 (0.083)	0.059 (0.035)	>0.999 (ns)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0104 (0.011)	0.00928 (0.0104)	0.0742 (ns)	0.0043 (0.0033)	0.0022 (0.0011)	0.250 (ns)
Duración promedio rápidos (seg)	2.26 \pm 0.12*	2.40 \pm 0.08*	0.306 (ns)	2.00 (0.41)	1.90 (1.04)	0.438 (ns)
Amplitud promedio rápidos ($\Delta F/F_0$)	0.133 \pm 0.008*	0.150 \pm 0.012*	0.0718 (ns)	0.117 (0.070)	0.130 (0.057)	>0.999 (ns)

Tabla 1: Parámetros de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} exhibidas por CCs a los 3 y 7 dpf, en presencia DMSO 0.1%. Los valores corresponden a las Figuras 49 y 50 (ítems B a G) y representan a la mediana de los datos con sus respectivos rangos intercuartílicos, excepto aquellos que están marcados con un asterisco que representan a la media \pm SEM. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

Con estas evidencias, demostramos que, la exposición a DMSO 0.1% no afecta los parámetros estudiados de la AEE expresada por las CCs de LLP en desarrollo.

Se ha reportado que el canal $\text{Ca}_{v}1.3$, presente en la presinapsis de las CCs, es necesario para que se lleven a cabo los eventos de AEE en la zona basolateral, aunque su mecanismo de participación aún se desconoce. Por otro lado, las deflexiones de los haces ciliares en zona apical de las CCs también exhiben fluctuaciones de Ca^{2+} locales. La aplicación de drogas antagonistas del canal $\text{Ca}_{v}1.3$ resultan en el silenciamiento de la actividad basolateral a los 3 dpf, sin embargo, no tiene efectos sobre la actividad apical (Zhang & Kindt, 2022).

Para corroborar que la AEE detectada es dependiente de los canales $\text{Ca}_{v}1.3$, realizamos experimentos de *Imaging de Ca* en animales de 3 y 7 dpf en presencia de isradipina, un antagonista específico de los canales $\text{Ca}_{v}1.3$. Observamos que la AEE fue completamente silenciada luego de la incubación, evidenciando que tanto a 3 (Figura 51, Tabla 2) como a 7

dpf (Figura 52, Tabla 3), el canal $\text{CaV}1.3$ es necesario para las transiciones espontáneas de Ca^{2+} . Si bien el bajo número de NM s estudiados a 7 dpf, no hizo posible realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos, vimos una clara disminución hacia valores cercanos a 0.

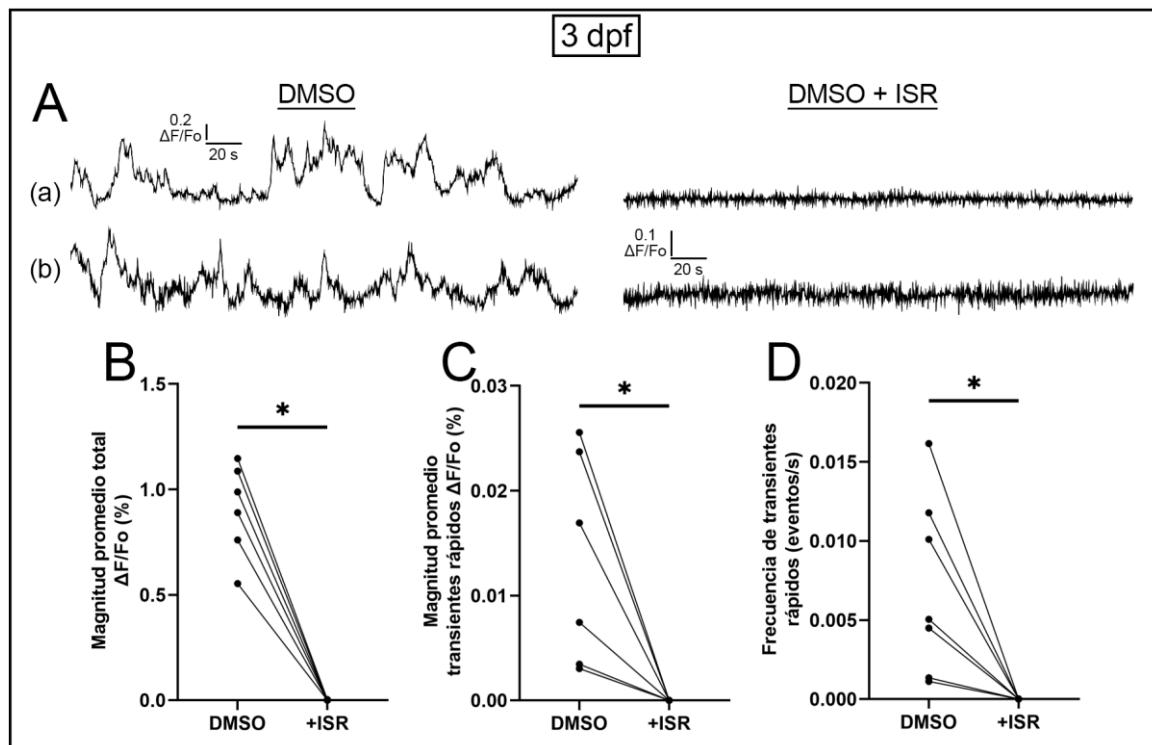


Figura 51: El bloqueo de los canales $\text{CaV}1.3$ bloquea completamente las señales de Ca^{2+} exhibidas en CCs de la LL a 3 dpf. (A) Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} en dos CCs que expresan GCaMP7a (a, b), antes y después de la aplicación de α -BTX. DMSO y DMSO+ISR refiere a dos adquisiciones de las mismas CCs con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-C) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total y (C) de transientes rápidos expresada en porcentaje (D) Cuantificación de la frecuencia de transientes rápidos. La concentración de ISR utilizada fue de 10 μM . Cada punto representa un NM. (B-D) Test de Wilcoxon, (B) * $p=0.0313$, (D) * $p=0.0313$, (D) * $p=0.0156$. N=6.

	3 dpf		
	DMSO	DMSO + ISR	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	0.94 (0.39)	0.00 (0.00)	0.0313 (*)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	0.0122 (0.021)	0.00 (0.00)	0.0313 (*)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0050 (0.01)	0.00 (0.00)	0.0156 (*)

Tabla 2: Parámetros de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} exhibidas por CCs a los 3 dpf, en ausencia y en presencia de ISR. Los valores corresponden a la Figura 51 (items B a D) y representan a la mediana de los datos, con sus respectivos rangos intercuartílicos. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

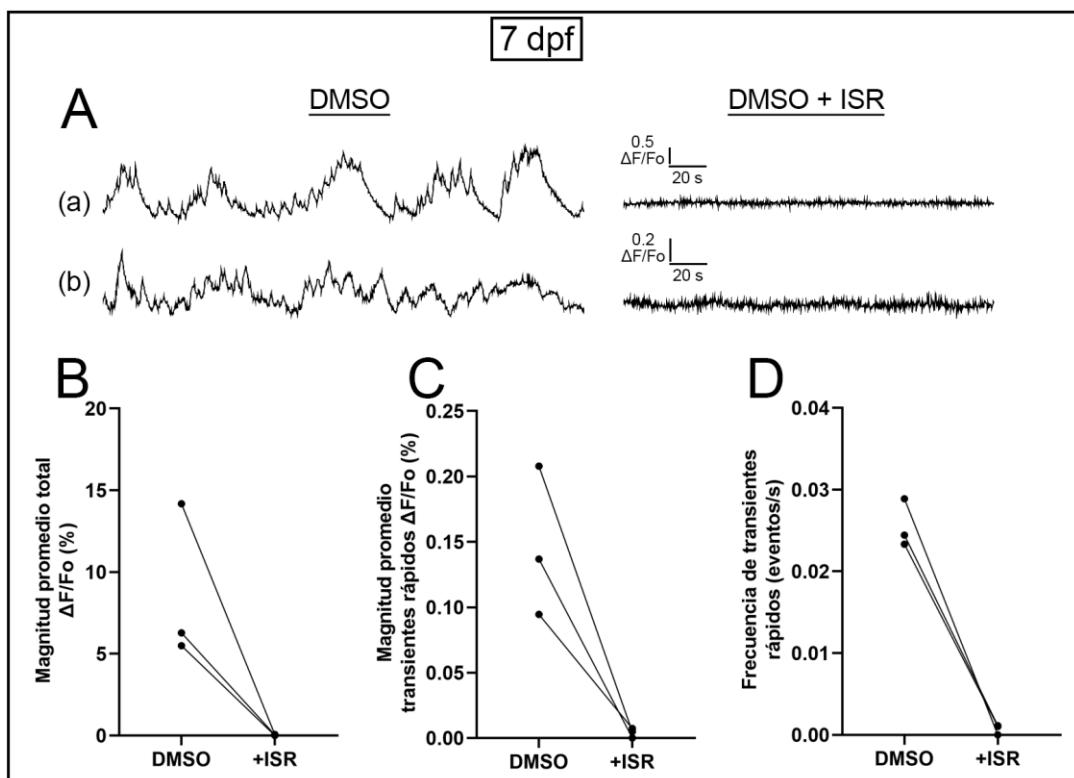


Figura 52: El bloqueo de los canales $\text{Ca}_{v1.3}$ bloquea completamente las señales de Ca^{2+} exhibidas en CCs de la LL a 3 dpf. (A) Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} en dos CCs que expresan GCaMP7a (a, b), antes y después de la aplicación de α -BTX. DMSO y DMSO+ISR refiere a dos adquisiciones de las mismas CCs con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-C) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total y (C) de transientes rápidos expresada en porcentaje (D) Cuantificación de la frecuencia de transientes rápidos. La concentración de ISR utilizada fue de 10 μM . Cada punto representa un NM. N=3.

	7 dpf	
	DMSO	DMSO + ISR
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	6.28 (8.68)	0.047 (0.069)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	0.137 (0.113)	0.005 (0.007)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0244 (0.006)	0.001 (0.001)

Tabla 3: Parámetros de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} exhibidas por CCs a los 7 dpf, en ausencia y en presencia de ISR. Los valores corresponden a la Figura 52 (items B a D) y representan a la mediana de los datos, con sus respectivos rangos intercuartílicos.

Modulación de la AEE mediada por el sistema eferente

La transmisión sináptica eferente está mediada por el nAChR $\alpha 9$, el cual está acoplado funcionalmente al canal de K^+ Ca^{2+} -dependiente SK (Carpaneto et al., 2021). Trabajos previos han reportado la presencia de AEE en neuronas eferentes (NEs) colinérgicas de la LLP a los 3 dpf (Zhang & Kindt, 2022). Los autores analizaron el efecto de antagonistas del receptor $\alpha 9$, α -bungarotoxina (α -BTX) y del canal SK, apamina (APA), sobre las señales lentas de AEE expresada por CCs a los 3 dpf. Sus resultados evidenciaron que la AEE no es modulada por el sistema eferente a los 3 dpf. Sin embargo, aún no se conoce aún si existe alguna participación de este sistema sobre los picos de Ca^{2+} a 3 dpf y/o en estadios más tardíos del desarrollo.

Con el objetivo de responder esos interrogantes, comenzamos por realizar experimentos de *Imaging de Ca* en presencia de α -BTX. A los 3 dpf, no encontramos diferencias significativas, en ninguno de los parámetros estudiados (Figura 53, Tabla 4) al comparar los registros en ausencia y en presencia del antagonista de los nAChRs $\alpha 9$. Por un lado, nuestros resultados concuerdan con lo reportado anteriormente (Zhang & Kindt, 2022), ya que no observamos cambios en las transiciones lentas de Ca^{2+} . Asimismo, no se observaron cambios en los parámetros analizados correspondientes a los componentes rápidos del sistema, sugiriendo

que el sistema eferente no está involucrado en la regulación de la AEE de las CCs de la LLP a los 3 dpf.

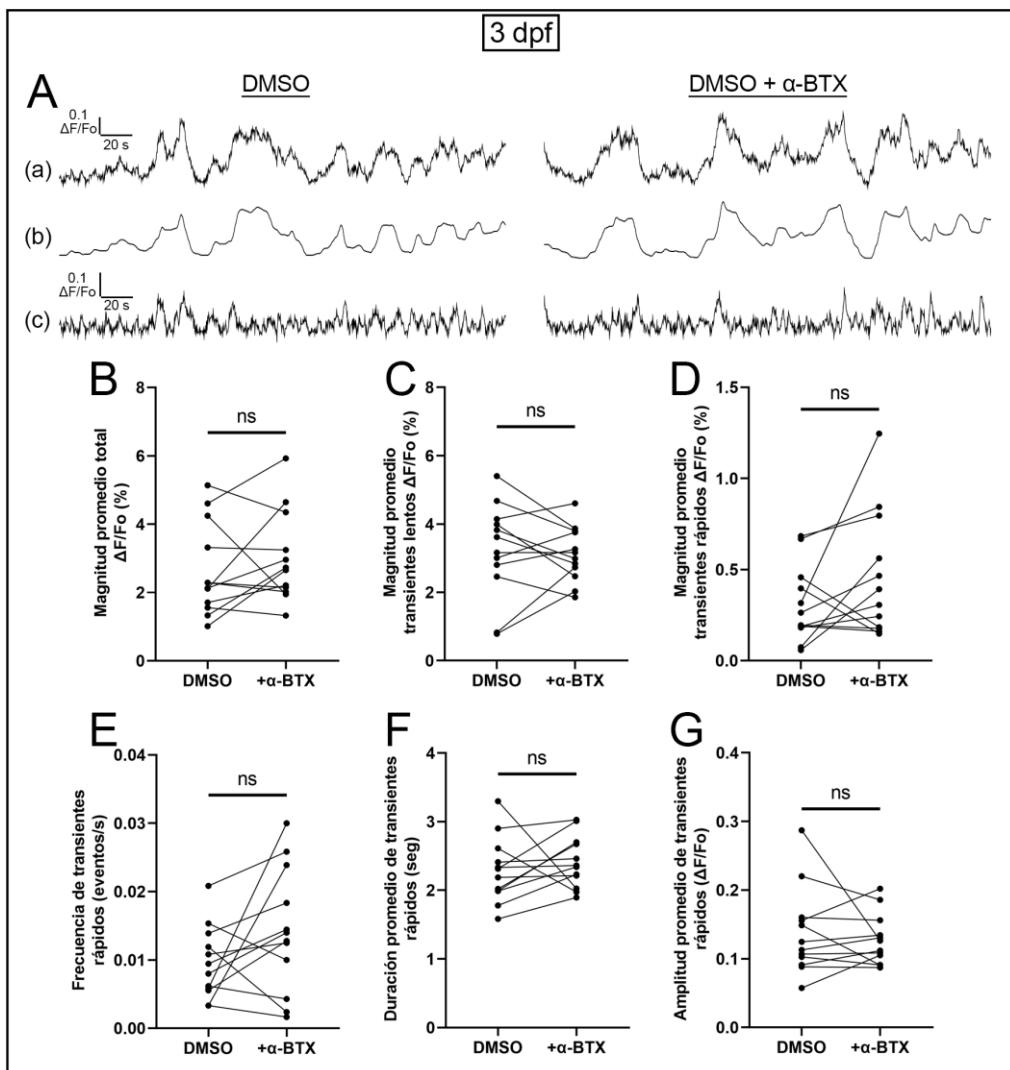


Figura 53: El bloqueo de los nAChRs $\alpha 9$ no afecta las señales de Ca^{2+} exhibidas en CCs de la LL a 3 dpf. (A) Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} en una CC que expresa GCaMP7a, antes y después de la aplicación de α -BTX. (a) Perfil de la actividad total en una CC sin estimulación externa, (b-c) perfil de los componentes de actividad correspondientes a los transientes de Ca^{2+} lentos (b) y rápidos (c). DMSO y DMSO+ α -BTX refiere a dos adquisiciones de la misma CC con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de los transientes rápidos. La concentración de α -BTX utilizada fue de 10 μM . Cada punto representa un NM. (B-G) Test de Wilcoxon, (B) $p=0.380$, (D) $p=0.622$, (D) $p=0.151$, (E) $p=0.181$, (F-G) Test pareado de T, (F) $p=0.472$, (G) $p=0.529$. N=12.

	3 dpf		
	DMSO	DMSO + α BTX	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	2.21 (2.42)	2.69 (2.02)	0.380 (ns)
Magnitud Lentos (% $\Delta F/F_0$)	3.39 (1.56)	3.08 (1.25)	0.622 (ns)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	0.229 (0.259)	0.349 (0.559)	0.151 (ns)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0087 (0.0078)	0.0134 (0.0169)	0.181 (ns)
Duración promedio rápidos (seg)	2.28 \pm 0.14*	2.41 \pm 0.11*	0.472 (ns)
Amplitud promedio rápidos ($\Delta F/F_0$)	0.138 \pm 0.018*	0.127 \pm 0.011*	0.529 (ns)

Tabla 4: Parámetros de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} exhibidas por CCs a los 3 dpf, en ausencia y en presencia de α -BTX. Los valores corresponden a la Figura 53 (items B a G) y representan a la mediana de los datos, con sus respectivos rangos intercuartílicos, excepto aquellos que están marcados con un asterisco que representan a la media \pm SEM. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

En cambio, a los 6/7 dpf, la aplicación de α -BTX provocó una marcada disminución de la AEE (Figura 54, Tabla 5). Se observó un descenso de la magnitud promedio de la actividad total en todos los NM estudiados (Figura 54B), así como sus componentes de transientes lentos y rápidos (Figura 54C, 54D). Si bien en los transientes lentos se observa una disminución parcial de la magnitud promedio, los transientes rápidos caen abruptamente, llegando a valores muy cercanos a 0. Esto se refleja en la frecuencia de picos detectados, cuyo valor medio equivale a 1 ó 2 picos por NM durante los 5 minutos de registro (Figura 54E). También encontramos diferencias en la duración promedio de transientes rápidos por NM, no así en la amplitud promedio (Figura 54F y 54G).

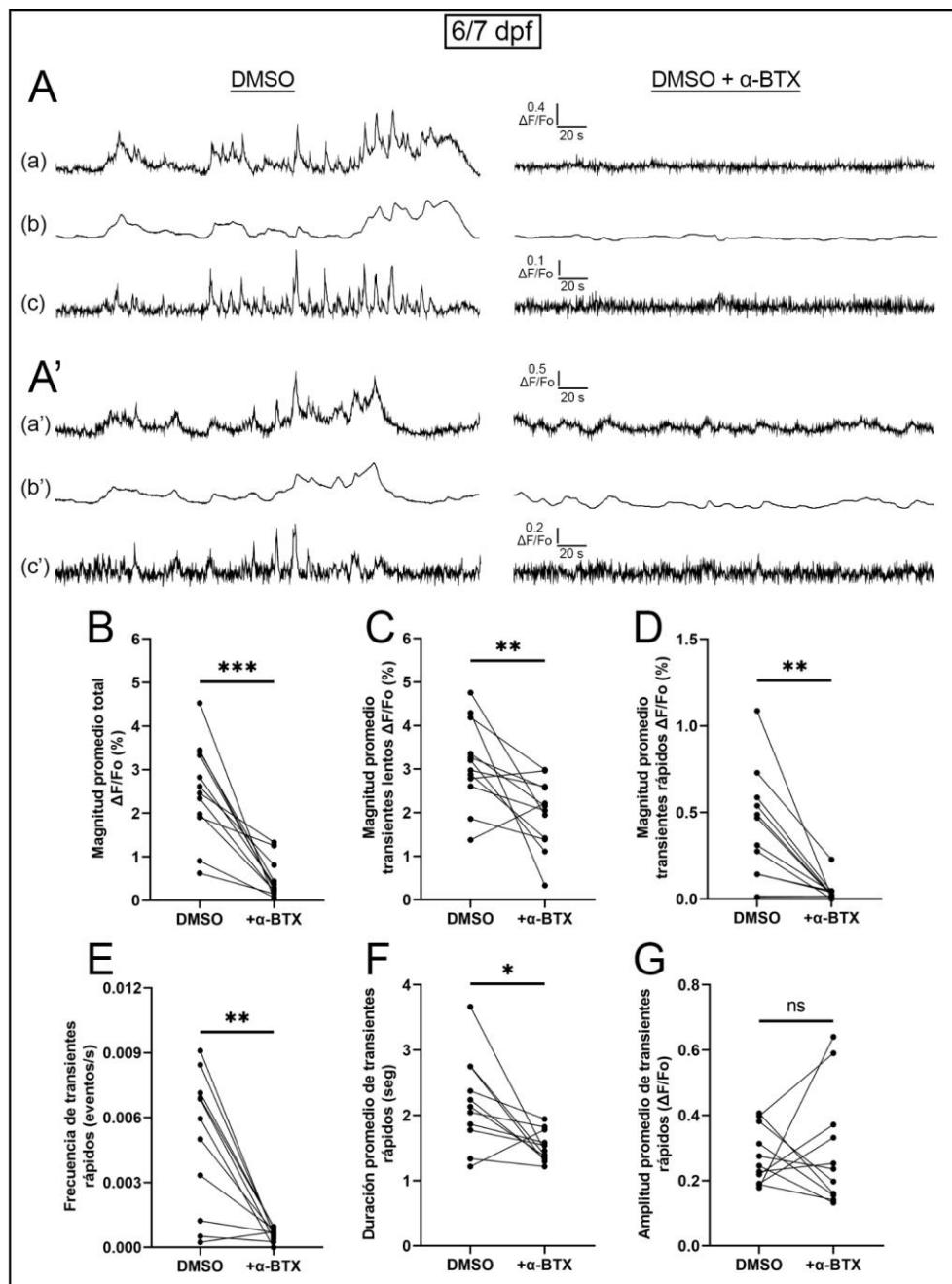


Figura 54: El bloqueo de los nAChRs $α9$ resulta en una disminución de las señales de Ca^{2+} exhibidas en CCs de la LL a 6/7 dpf. (A-A') Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} en dos CCs que expresan GCaMP7a, antes y después de la aplicación de $α$ -BTX. (a-a') Perfiles de actividad total en dos CCs sin estimulación externa, (b-c) perfiles de los componentes actividad correspondientes a los transientes lentos (b) y rápidos (c). DMSO y DMSO+ $α$ -BTX refiere a dos adquisiciones de las mismas CCs con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de transientes rápidos. La concentración de $α$ -BTX utilizada fue de $10 \mu M$. Cada punto representa un NM. (B-G) Test de Wilcoxon, (B) $***p=0.0005$, (D) $**p=0.0093$, (D) $**p=0.0015$, (E) $**p=0.0015$, N=12. (F) $*p=0.0137$, (G) $p=0.966$. (F-G) N=11.

	6/7 dpf		
	DMSO	DMSO + α BTX	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	2.54 (0.47)	0.27 (0.55)	0.0005 (***)
Magnitud Lentos (% $\Delta F/F_0$)	3.087 (1.33)	2.099 (1.20)	0.0093 (**)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	0.389 (0.431)	0.0239 (0.027)	0.0015 (**)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.00641 (0.0063)	0.0006842 (0.00076)	0.0015 (**)
Duración promedio rápidos (seg)	2.13 (0.98)	1.46 (0.45)	0.0137 (*)
Amplitud promedio rápidos ($\Delta F/F_0$)	0.246 (0.190)	0.236 (0.220)	0.966 (ns)

Tabla 5: Parámetros de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} exhibidas por CCs a los 6/7 dpf, en ausencia y en presencia de α -BTX. Los valores corresponden a la Figura 54 (ítems B a G) y representan a la mediana de los datos con sus respectivos rangos intercuartílicos. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

Examinamos en detalle cada una de las CCs que mostraron transientes rápidos de Ca^{2+} antes y después de la aplicación de α -BTX a 6/7 dpf. Se observó que después de la aplicación de α -BTX, el número de CCs que exhibieron este tipo de eventos se redujo a un 44%, pasando de 59 a 26 CCs (Figura 55). Esta disminución explica, en parte, la reducción en la magnitud promedio de picos de AEE tras la aplicación de α -BTX. En resumen, tras el bloqueo de los nAChRs α 9 a 6/7 dpf, el 56% de las CCs que exhibieron eventos rápidos, se silenciaron completamente, mientras que el 44% restante exhibió una disminución en la duración de los mismos. Nuestros resultados presentan evidencias de que la vía eferente colinérgica de la LL modula la AEE expresada por las CCs a través de la activación del receptor α 9, a los 6/7 dpf.

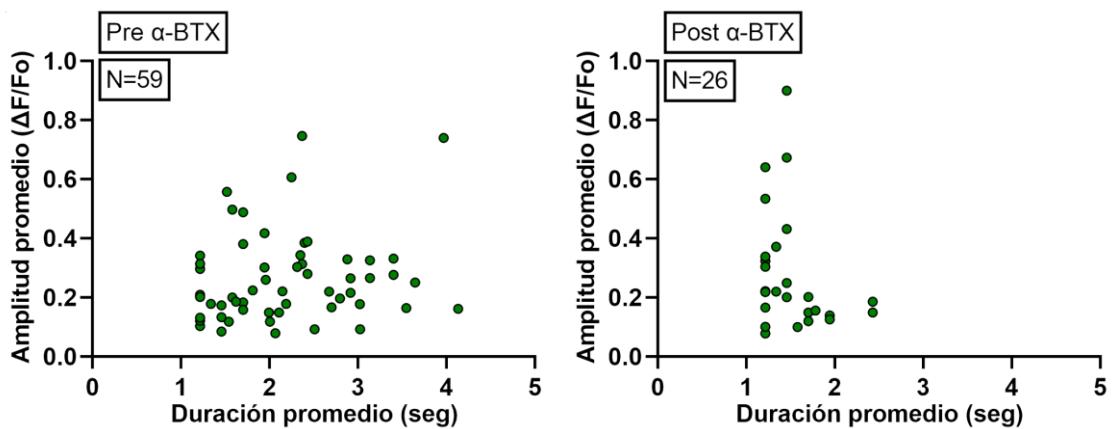


Figura 55: Gráficos de amplitud promedio en función de la duración promedio de transientes rápidos de Ca^{2+} por CC, antes y después de la incubación con α -BTX a 6/7 dpf. Cada punto representa a una CC que exhibe este tipo de eventos.

Con el fin de entender si el canal SK podría estar contribuyendo a la modulación de la AEE de las CCs, realizamos registros en presencia de APA a los 6/7 dpf. No encontramos diferencias significativas en los transientes de Ca^{2+} al comparar los registros antes y después de incubar con APA (Figura 56, Tabla 6). Estudiando las CCs que presentan eventos rápidos de manera individual, no evidenciamos una reducción en el número, en la amplitud o en la duración promedio (Figura 57).

A pesar de no haber encontrado cambios luego de la incubación con APA, no podemos descartar la participación del canal SK en la modulación de la AEE dado que tenemos un bajo número de NM registrados en este experimento.

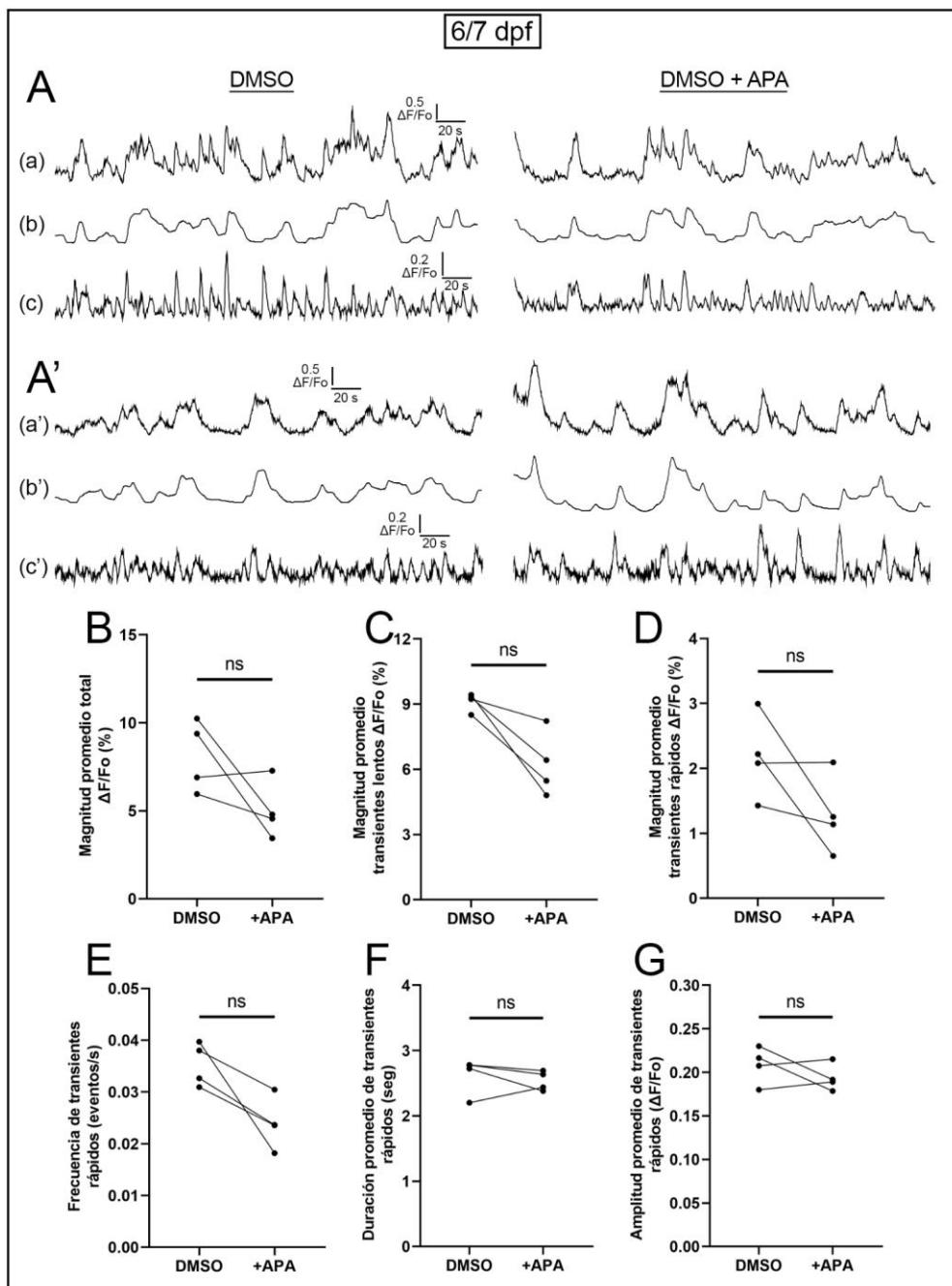


Figura 56: El bloqueo de los canales SK no afecta las señales de Ca^{2+} exhibidas en CCs de la LL a 6/7 dpf. (A-A') Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} en dos CCs que expresan GCaMP7a, antes y después de la aplicación de APA. (a-a') Perfiles de actividad total en dos CCs sin estimulación externa, (b-c) perfil de los componentes de actividad correspondientes a los transientes de Ca^{2+} lentos (b) y rápidos (c). DMSO y DMSO+APA refiere a dos adquisiciones de las mismas CCs con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de transientes rápidos. La concentración de APA utilizada fue de 10 μM . Cada punto representa un NM. (B-G) Test de Wilcoxon, (B) $p=0.250$, (D) $p=0.125$, (D) $p=0.250$, (E) $p=0.125$, (F) $p=0.625$, (G) $p=0.625$. N=4.

	6/7 dpf		
	DMSO	DMSO + APA	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	8.14 (3.84)	4.67 (2.94)	0.250 (ns)
Magnitud Lentos (% $\Delta F/F_0$)	9.27 (0.71)	5.95 (2.80)	0.125 (ns)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	2.15 (1.21)	1.196 (1.11)	0.250 (ns)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0353 (0.0079)	0.0236 (0.0092)	0.125 (ns)
Duración promedio rápidos (seg)	2.75 (0.45)	2.54 (0.28)	0.625 (ns)
Amplitud promedio rápidos ($\Delta F/F_0$)	0.212 (0.039)	0.190 (0.028)	0.625 (ns)

Tabla 6: Parámetros de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} exhibidas por CCs a los 6/7 dpf, en ausencia y en presencia de APA. Los valores corresponden a la Figura 56 (items B a G). Los valores representan a la mediana de los datos con sus respectivos rangos intercuartílicos. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

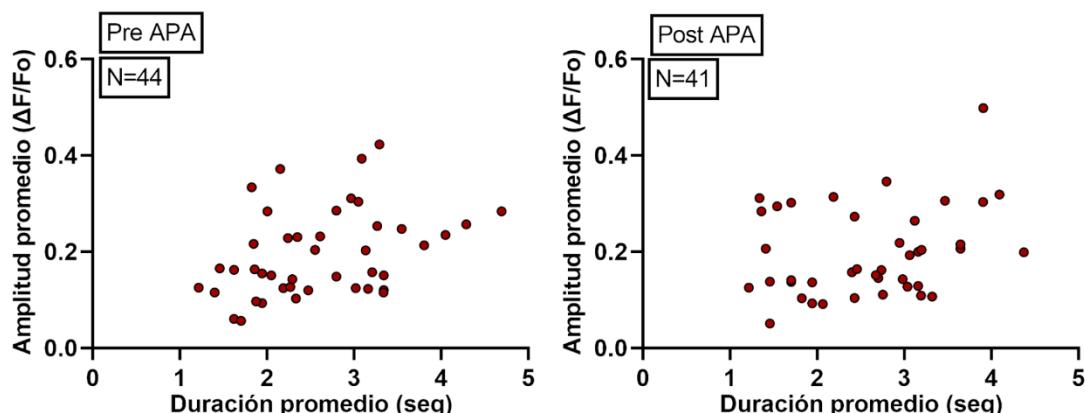


Figura 57: Gráficos de amplitud promedio en función de la duración promedio de transientes rápidos de Ca^{2+} por CC antes y después de la incubación con APA a 6/7 dpf. Cada punto representa a una CC que exhibe este tipo de eventos.

Modulación de la AEE mediada por señalización purinérgica

Numerosos estudios han evidenciado la importancia de la señalización mediada por ATP en la activación, el mantenimiento y la sincronización de la AEE que exhibe el sistema auditivo de mamíferos en el desarrollo (Babola et al, 2020, 2021; Ceriani et al., 2019; Tritsch et al., 2007). Se conoce que, previo a la audición, la señalización de ATP extracelular, liberado espontáneamente por las células de soporte del órgano de Kölliker, inicia y modula la AEE coordinada de las CCI (Ceriani et al., 2019). Esta actividad está mediada por dos receptores purinérgicos altamente ubicuos de la familia P2: los receptores P2ry₁, presentes en las células de soporte, y los receptores P2rx presentes en CCI de la cóclea (Huang et al., 2006; Tritsch et al., 2007).

En el pez cebra, estudios previos demostraron que, a los 3 dpf, la señalización purinérgica mediada por P2ry₁ es necesaria para la expresión de AEE en células de soporte, pero no en CCs en la LLP (Zhang & Kindt, 2022). Aún se desconoce si el ATP regula la AEE expresada por las CCs en estadios más tardíos del desarrollo a través de estos receptores. Además, tampoco se conoce si la señalización purinérgica mediada por el receptor P2rx regula la AEE expresada por las CCs. Para responder estas preguntas, realizamos experimentos de *Imaging de Ca* antes y después del bloqueo de los receptores P2ry₁ y P2rx y analizamos su efecto sobre los transientes de Ca²⁺.

Con el fin de realizar el bloqueo del receptor P2ry₁, utilizamos el antagonista MRS2500 (Abbracchio et al., 2006) (Figura 58, Tabla 7). Evidenciamos una disminución en la magnitud promedio total de la AEE por NM (Figura 58B). La magnitud promedio de los componentes lentos y rápidos de actividad descienden significativamente, de manera parcial, igual que la frecuencia de transientes rápidos de Ca²⁺ (Figura 58C, 58D, 58E). El análisis de los eventos rápidos detectados por NM, no muestra cambios en la duración promedio de los picos (Figuras 58F), pero sí evidencia una disminución en la amplitud promedio de los mismos (Figura 58G).

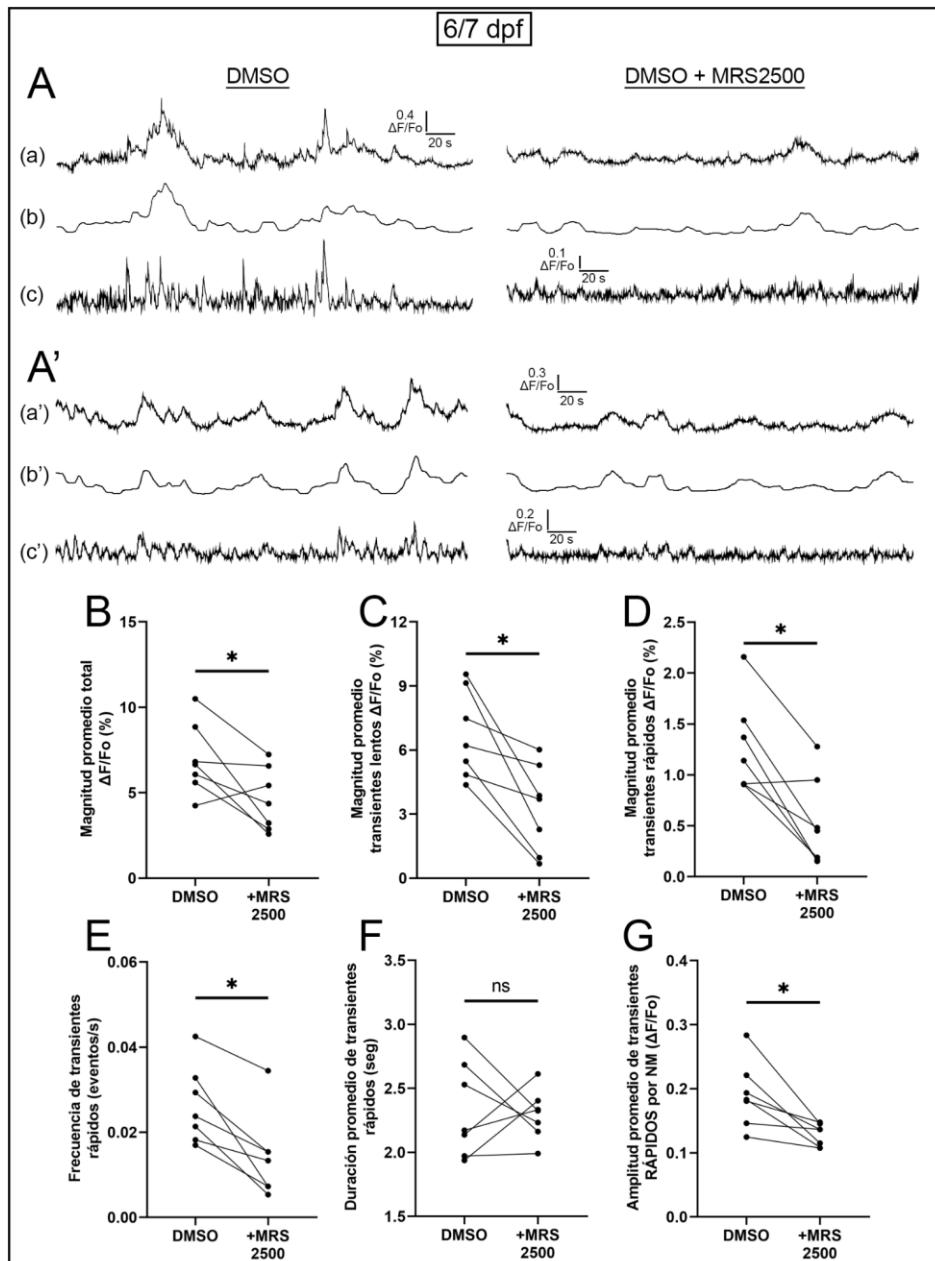


Figura 58: El bloqueo del receptor P2ry₁ resultó en una disminución en la magnitud de señales de Ca^{2+} exhibidas en las CCs de la LL a 6/7 dpf. (A-A') Registros representativos de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} en dos CCs que expresan GCaMP7a, antes y después de la incubación con MRS2500. (a-a') Perfiles de actividad total en dos CCs sin estimulación externa, (b-c) perfiles de los componentes actividad correspondientes a los transientes lentos y rápidos de las mismas CCs en a y a'. DMSO y DMSO+MRS2500 refiere a dos adquisiciones de las mismas CCs con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de transientes rápidos. La concentración de MRS2500 utilizada fue de 10 μM . Cada punto representa un NM. (B-G) Test de Wilcoxon, (B) *p=0.0469, (D) *p=0.0156, (D) *p=0.0313, (E) *p=0.0156, (F-G) Test pareado de T, (F) p=0.824, (G) *p=0.0156. N=7.

	6/7 dpf		
	DMSO	DMSO + MRS2500	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	6.65 (3.25)	4.37 (3.70)	0.0469 (*)
Magnitud Lentos (% $\Delta F/F_0$)	6.21 (4.30)	3.70 (4.33)	0.0156 (*)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	1.140 (0.631)	0.451 (0.788)	0.0313 (*)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0238 (0.0174)	0.0133 (0.0072)	0.0156 (*)
Duración promedio rápidos (seg)	$2.33 \pm 0.14^*$	$2.29 \pm 0.073^*$	0.824 (ns)
Amplitud promedio rápidos ($\Delta F/F_0$)	$0.190 \pm 0.0196^*$	$0.128 \pm 0.0065^*$	0.0156 (*)

Tabla 7: Valores obtenidos a partir de los experimentos en presencia de MRS2500 a 6/7 dpf. Estos resultados corresponden a los gráficos expuestos en la Figura 58 (items B a G). Los valores representan a la mediana de los datos con sus respectivos rangos intercuartílicos, excepto aquellos que están marcados con un asterisco que representan a la media \pm SEM. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

Al analizar individualmente a las CCs que exhibieron transiciones rápidas de Ca^{2+} a lo largo del registro, no observamos cambios significativos en el número de células que exhibieron este tipo de eventos antes y después de la incubación con MRS2500 (Figura 59). Además, la disminución de amplitud promedio por NM se ve reflejada en que las CCs poseen transientes con menor amplitud. En contraposición a lo que sucede a 3 dpf, nuestros resultados sugieren que a 6/7 dpf el receptor P2ry₁ está involucrado en la modulación de la AEE de las CCs de la LLP.

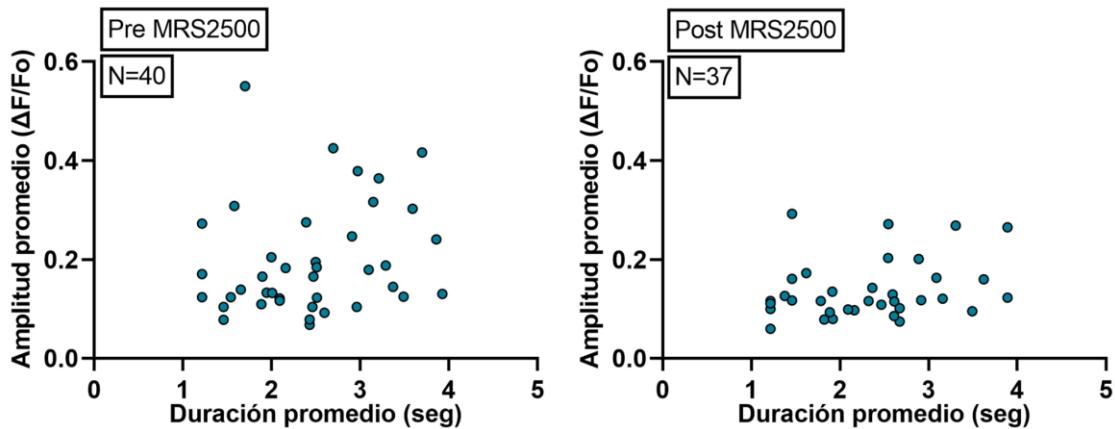


Figura 59: Gráficos de amplitud promedio en función de la duración promedio de transientes rápidos de Ca^{2+} antes y después de la incubación con MRS2500 a 6/7 dpf. Cada punto representa a una CC que exhibe este tipo de eventos.

Luego, realizamos registros en presencia del antagonista de los receptores P2rx, PPADS (Coddou et al., 2001). Encontramos una disminución parcial de la magnitud de actividad total de Ca^{2+} y de su componente de transientes lentos (Figura 60B, 60C, Tabla 8). Además, se observó un descenso de la magnitud promedio de transientes de Ca^{2+} rápidos, explicado por la disminución en su frecuencia (Figura 60D, 60E). Mientras tanto, el análisis de la duración y la amplitud promedio de los transientes de Ca^{2+} rápidos por NM no reveló diferencias luego de la inhibición del receptor P2rx (Figura 60F, 60G). Por otro lado, el número de CCs que presentaron eventos rápidos disminuyó ante el bloqueo del receptor P2rx, sin embargo, no observamos diferencias en la amplitud o duración promedio de picos por CC (Figura 61).

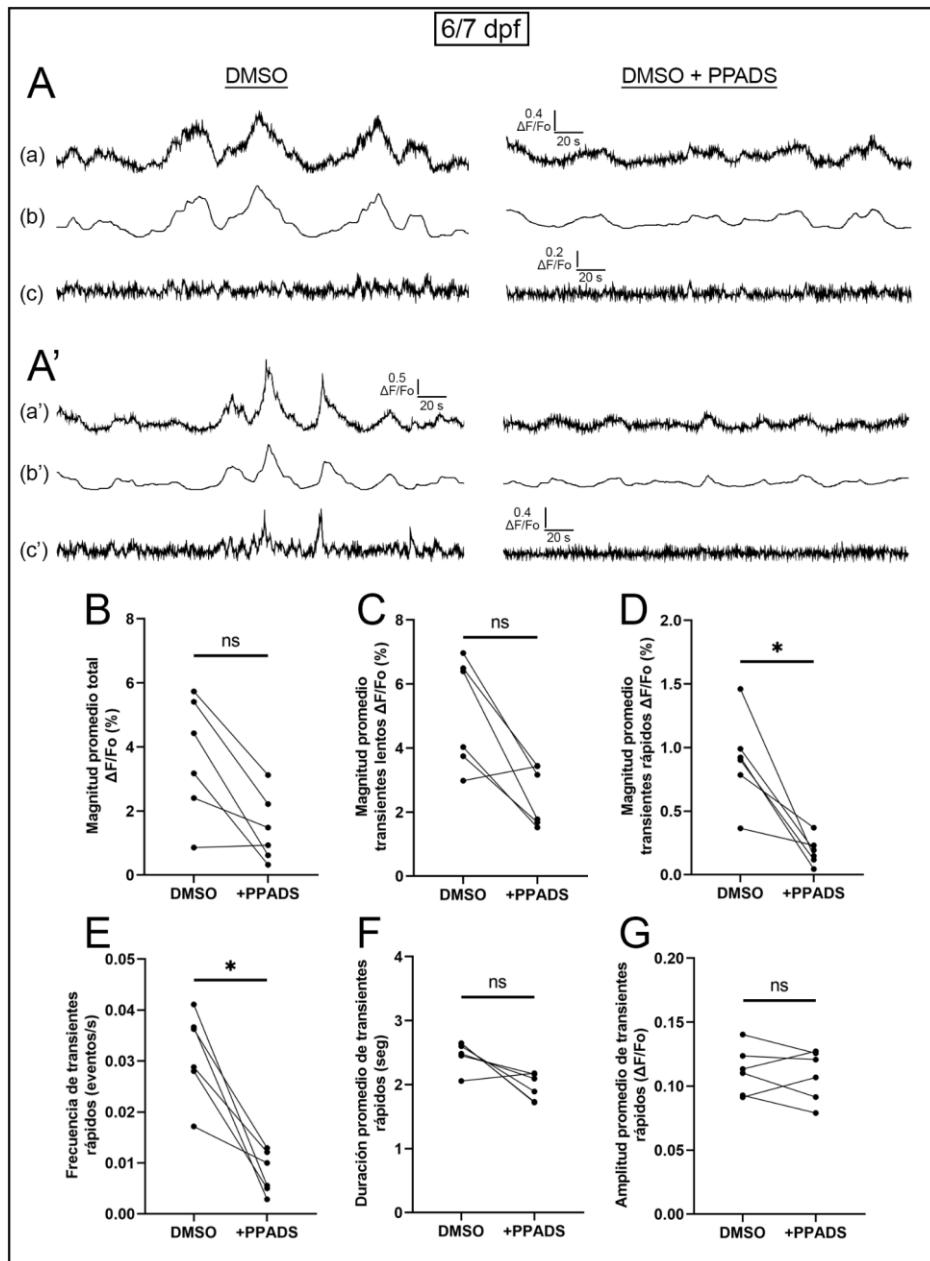


Figura 60: Luego del bloqueo de P2rx se encontró una disminución en los transientes de Ca^{2+} , más pronunciada en aquellos eventos rápidos, en CCs de la LL a 6/7 dpf. (A-A') Registros representativos de *Imaging de Ca* en dos CC que expresan GCaMP7a a 6/7 dpf en presencia de DMSO y luego de la incubación con PPADS. (a-a') Perfiles de actividad total en dos CC sin estimulación externa, (b-c) perfiles de los componentes actividad correspondientes a los transientes lentos y rápidos de las mismas CC en a y a'. DMSO y DMSO+PPADS refiere a dos adquisiciones de las mismas CC con un intervalo de 20 minutos de incubación entre ambas. (B-D) Cuantificación de la magnitud promedio (B) total, (C) de transientes lentos y (D) de transientes rápidos expresada en porcentaje. (E-G) Cuantificación de la frecuencia, (F) duración promedio y (G) amplitud promedio de transientes rápidos. Dichos valores se promediaron dentro de las CC y luego se obtuvo un valor promedio para cada NM. La concentración de PPADS utilizada fue de 10 μM . Cada punto representa un NM. (B-G) Test de Wilcoxon, (B) $p=0.0625$, (D) $p=0.0625$, (D) $*p=0.0313$, (E) $*p=0.0313$, (F) $p=0.0625$, (G) $*p=0.688$. N=6.

	6/7 dpf		
	DMSO	DMSO + PPADS	p valor
Magnitud total (% $\Delta F/F_0$)	3.80 (3.47)	1.21 (1.90)	0.0625 (ns)
Magnitud Lentos (% $\Delta F/F_0$)	5.22 (3.06)	2.47 (1.79)	0.0625 (ns)
Magnitud Rápidos (% $\Delta F/F_0$)	0.912 (0.428)	0.170 (0.165)	0.0313 (*)
Frecuencia rápidos (eventos/seg)	0.0325 (0.0125)	0.0078 (0.0079)	0.0313 (*)
Duración promedio rápidos (seg)	2.54 (0.29)	1.99 (0.44)	0.0625 (ns)
Amplitud promedio rápidos ($\Delta F/F_0$)	0.112 (0.035)	0.114 (0.037)	0.688 (ns)

Tabla 8: Valores obtenidos a partir de los experimentos en presencia de PPADS a 6/7 dpf. Estos resultados corresponden a los gráficos expuestos en la Figura 60 (items B a G). Los valores representan a la mediana de los datos con sus respectivos rangos intercuartílicos. En todos los casos se reporta el p-valor de los test estadísticos utilizados con su respectiva significancia.

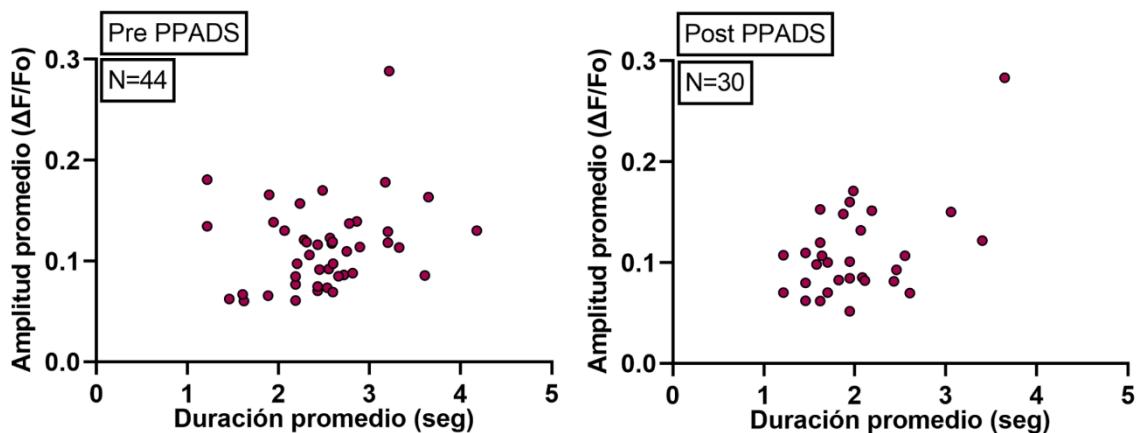


Figura 61: Gráficos de amplitud promedio en función de la duración promedio de transientes rápidos de Ca^{2+} antes y después de la incubación con PPADS a 6/7 dpf. Cada punto representa a una CC que exhibe este tipo de eventos.

En resumen, nuestros resultados proveen evidencias de que los NM s exhiben AEE en todos los estadíos del desarrollo estudiados, desde 3 hasta 7 dpf, con un máximo de magnitud promedio a los 4 dpf. Además, demostramos que existen 2 tipos de elevaciones espontáneas de Ca^{2+} con dinámicas temporales diferentes: las primeras caracterizadas por subidas y bajadas lentas, y las segundas, subidas rápidas en forma de picos.

Por otro lado, al estudiar la modulación de la AEE en las CCs por medio de estudios farmacológicos, observamos que los canales $\text{Ca}_v1.3$ son necesarios para que las CCs exhiban fluctuaciones espontáneas de Ca^{2+} a los 3 y 7 dpf. La inhibición del nAChR $\alpha 9$ a 3 dpf no resultó en cambios en los patrones de AEE, consistente con trabajos previos. Sin embargo, a los 6/7 dpf vimos que la señalización colinérgica mediada por el nAChR $\alpha 9$ estaría participando en la modulación de la AEE de las CCs.

La inhibición de la señalización purinérgica mediada por el receptor P2ry₁ resultó en una disminución de la magnitud de ambos componentes de la actividad de manera parcial. Por último, evaluando la participación del receptor P2rx, observamos una caída importante en el componente rápido de la AEE y en la cantidad de células que exhiben este tipo de eventos. Estos resultados evidencian la posible participación de ambos receptores en la modulación de la AEE a 6/7 dpf.

Discusión

En los sistemas sensoriales, la AEE desempeña un rol crucial en la maduración de las sinapsis y el refinamiento de los circuitos neuronales. Por ejemplo, en mamíferos, se cree que la actividad espontánea expresada en las CCs sensoriales en desarrollo actúa localmente para ayudar a establecer las conexiones neuronales, y globalmente para dar forma a los mapas tonotópicos (Ceriani et al., 2019; Tritsch et al., 2007). Sin embargo, el estudio de estas estructuras en el animal *in vivo* es limitado debido a que las CCs se encuentran encerradas en estructuras óseas, lo cual restringe su accesibilidad y dificulta el registro de la actividad. El modelo de LL del pez cebra nos permite estudiar el rol de la AEE en el desarrollo en animales intactos por medio de la adquisición de imágenes.

Como se ha comentado anteriormente, el comienzo de la detección de estímulos sensoriales por parte de la LL se da a partir de los 5 dpf (Metcalfe, 1985; Pujol-Martí & López-Schier, 2013). Sin embargo, la diferenciación y maduración de las CCs ocurre en estadios anteriores. Los protoneuromastos se depositan dentro de las primeras 40 hpf como células indiferenciadas que se dividen dando lugar a CCs hermanas con polaridades opuestas (López-Schier et al., 2004). El número de células dentro del NM aumenta acorde van pasando los días de desarrollo. Las CCs, entre los 2 y 6 dpf, exhiben AEE (Zhang & Kindt, 2022) que, luego del establecimiento de la sinapsis con las NAs, aproximadamente a los 5 dpf, comienza a ser transmitida a las NAs. A medida que el sistema madura, la tasa de disparo espontáneo en los somas de las NAs, disminuye hasta que, eventualmente, es reemplazado por la actividad evocada por estímulos (entre 6 y 7 dpf) (Liao & Haehnel, 2012). En el segundo capítulo de esta tesis, aprovechando las herramientas moleculares y farmacológicas que nos provee el modelo de estudio, utilizamos el sensor de Ca^{2+} genéticamente codificado GCaMP7a para estudiar los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular en diferentes estadios del desarrollo de la LLP. Realizamos, por un lado, una caracterización de los patrones de AEE expresada en las CCs, identificando dos

dinámicas temporales de Ca^{2+} . Y, por otro lado, estudiamos, mediante experimentos farmacológicos, si los patrones de AEE exhibidos por las CCs son modulados por el sistema colinérgico eferente y/o por señales purinérgicas.

Caracterización de los patrones de AEE expresada en CCs de LLP en desarrollo

A los 4 dpf, los NM s exhiben un máximo en el reclutamiento de CCs activas y en la magnitud promedio de AEE expresada por las CCs

Luego de realizar *Imaging de Ca* sobre los NM s de la LLP, en ausencia de estímulos mecánicos, encontramos que las CC exhiben AEE entre los 3 y los 7 dpf. Esta AEE presenta un máximo de magnitud promedio por NM a los 4 dpf. Por un lado, esto se explica por un aumento en el reclutamiento de CCs activas por NM, permaneciendo entre el 30 y el 40% de las CCs sin presencia de actividad. Estos resultados son compatibles con estudios previos que muestran que, durante el desarrollo, solo un 30% de las CCs presentes en un NM exhiben respuestas evocadas por estímulos (Zhang et al., 2018). La diferencia en el porcentaje de CCs activas detectadas, probablemente, se deba a que Zhang et al., 2018, dirigen la expresión del sensor de Ca^{2+} con el promotor *myo6b*, que marca CCs desde estadíos más tempranos que el promotor *brn3c* utilizado por nosotros. El máximo de actividad a 4 dpf encontrado en este trabajo se presenta como una novedad, donde, llamativamente, nos ubicamos en un estadío del desarrollo bisagra entre un sistema inmaduro y maduro. Si bien aún desconocemos a qué se debe este aumento en la magnitud de AEE expresada, existen evidencias de que el correcto establecimiento de los contactos sinápticos de las NAs con las CCs depende de la actividad exhibida por las CCs (Fauchere et al., 2010; Wong et al., 2019).

En un primer abordaje de esta caracterización, encontramos, además, que los transientes de Ca^{2+} espontáneos presentan dos componentes con dinámicas temporales diferentes: los transientes rápidos o picos, caracterizados por aumentos agudos en la concentración de Ca^{2+} de pocos segundos de duración (entre 1 y 5 segundos), y los transientes lentos u olas, que presentan ascensos y descensos más lentos con rangos de tiempos muy variables. Nuestros resultados coinciden con Zhang & Kindt, 2022, que presentaron evidencias de la existencia de transientes de Ca^{2+} lentos en CCs de la LLP en desarrollo. Sin embargo, estos autores no observaron los transientes de Ca^{2+} rápidos, ya que la velocidad de adquisición de imágenes que utilizaron tenía una resolución temporal más baja.

En el órgano de Corti, se han descrito transientes rápidos de Ca^{2+} realizando *Imaging de Ca* con una resolución temporal de 5 ms. Estos transientes se detectaron como eventos aislados (≈ 900 ms), *minibursts* (transientes consecutivos de ≈ 3 seg) y *bursts* (de ≈ 15 seg) (Eckrich et al., 2018). Los autores demostraron que las CCI son capaces de generar de manera autónoma transientes rápidos de Ca^{2+} en su forma aislada o en *minibursts*. Sin embargo, señales originadas en las células de soporte evocan actividad en las CCI y la coordinan con las células vecinas en forma de *bursts*.

Nuestro primer objetivo fue entender si este despliegue de actividad total, y de transientes más rápidos en particular, presentan cambios durante el desarrollo.

De esta manera, analizamos el aumento en la magnitud promedio total de AEE a los 4 dpf, separando el registro en sus componentes lentos y rápidos, y observamos que ambos tipos de actividad habían aumentado. En el caso de los transientes lentos, la magnitud vuelve a descender a los 5 dpf; mientras que la magnitud promedio de los transientes rápidos se mantiene constante en el tiempo hasta los 7 dpf. El aumento en el componente rápido, a los 4 dpf, se correlacionó con un aumento en la amplitud promedio de los transientes de Ca^{2+} , mientras que la frecuencia y la duración de los mismo permanecieron constantes.

No detectamos diferencias significativas entre la magnitud promedio de actividad total exhibida entre NMs inmaduros a 3 dpf y maduros a 5 dpf y, al analizar solo la magnitud de los transientes lentos observamos que, si bien no hay diferencias entre los NMs a 3 dpf y a

5 dpf, vemos una tendencia a valores más bajos. Esta tendencia podría esclarecerse aumentando el número de NM_s analizados. Por último, en estadíos más tardíos, a 6/7 dpf, observamos una magnitud promedio de transientes lentos un poco más elevada que a 5 dpf. Si bien estos resultados no fueron significativos, fueron llamativos los valores de magnitud promedio y la variabilidad observada entre NM_s a 6/7 dpf. Esto es diferente de lo encontrado por Zhang & Kindt, 2022, donde presentan una marcada disminución de los transientes espontáneos a 6 dpf con respecto a 3 dpf. Nuestros resultados muestran que a los 6/7 dpf las CC_s de la LL aún exhiben AEE.

Se ha reportado la presencia de transientes espontáneos de Ca²⁺ ubicados, por un lado, en zona apical de las CC_s, donde los haces ciliares se deflectan, y, por otro lado, en la zona basal, donde se produce la liberación de vesículas (Zhang et al., 2018). La actividad apical es necesaria para que se despolaricen las CC_s, y se gatille la apertura de los canales Cav1.3, generándose, así, las transiciones de Ca²⁺ que detectamos en la zona medial/basal. La aplicación de isradipina, antagonista de los canales de tipo L Cav1.3, bloquea solo los transientes Ca²⁺ basales de las CC_s, mientras que la actividad en la zona apical permanece intacta (Zhang & Kindt, 2022). Teniendo en cuenta esto, realizamos incubaciones con isradipina a los 3 y 6/7 dpf, y observamos que la AEE de las CC_s es silenciada completamente. Este control descartó la posibilidad de que las elevaciones de Ca²⁺ detectadas por nuestra técnica provengan de la zona apical de las CC_s, confirmando que la AEE detectada por nuestra metodología es dependiente de la activación de los canales Cav1.3.

Estudio de la modulación de la AEE en las CC_s

Debido a las similitudes entre el sistema de LL del pez cebra y el sistema auditivo de mamíferos, nos dedicamos a estudiar si, durante el desarrollo, la AEE expresada por las CC_s de la LL y de la cóclea son moduladas por los mismos factores.

El nAChR $\alpha 9$ está involucrado en la modulación de la AEE a los 6/7 dpf

Se ha propuesto que la activación de la vía eferente colinérgica de la LL tiene como consecuencia la hiperpolarización de las CCs (Carpaneto et al., 2021). Se ha demostrado que la aplicación exógena de ACh provoca una disminución de los transientes de Ca^{2+} evocados por estimulación mecánica en las CCs. Este efecto se revierte con el agregado de apamina (APA), bloqueante de los canales SK (Yamamoto et al., 1997), sugiriendo que, al igual que lo que ocurre en la cóclea, los canales $\alpha 9$ y SK estarían acoplados funcionalmente. Con el fin de evaluar si la AEE es modulada por la vía eferente colinérgica, analizamos en primer lugar el efecto de α -bungarotoxina (α -BTX), antagonista de los nAChRs $\alpha 9$, sobre distintos parámetros que caracterizan dicha actividad (frecuencia, amplitud y duración de los eventos de Ca^{2+}). A los 3 dpf, no observamos cambios en ninguno de los parámetros medidos, siendo nuestros resultados, similares a los reportados por Zhang & Kindt, 2022. En cambio, a los 6/7 dpf, observamos que la magnitud promedio total por NM disminuye luego de la aplicación de α -BTX. Al discriminar entre los componentes del registro, observamos una leve disminución en los transientes lentos; mientras que los transientes rápidos exhibieron una caída abrupta que se tradujo en un silenciamiento casi absoluto ya que la frecuencia de picos promedio por NM descendió hasta valores cercanos a 0. Además, si bien la amplitud de los picos detectados no cambió, la duración de los mismos resultó disminuida. Asimismo, dentro de cada NM, encontramos menor cantidad de CCs activas. Por último, nos resultó llamativo que los valores de fluorescencia basales, luego de la incubación con α -BTX, disminuyeron en todos los registros realizados, sugiriendo, que la inhibición del nAChR $\alpha 9$, redujo la concentración intracelular basal de Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que, a los 6/7 dpf, la vía eferente colinérgica estaría modulando la AEE en las CCs a través del nAChR $\alpha 9$. Llamativamente, al realizar la incubación con APA, no obtuvimos diferencias en ninguno de los parámetros analizados, incluida la cantidad de CCs que

expresaban picos de Ca^{2+} . Este último resultado posee baja potencia estadística y debemos analizar más cantidad de individuos.

Estos resultados fueron realmente sorprendentes, ya que, se ha propuesto que la activación de la vía eferente colinérgica de la LL tiene como consecuencia la hiperpolarización de las CCs. Sin embargo, en el trabajo de Carpaneto et al., 2021, muestran una gran heterogeneidad en la respuesta inhibitoria ante estimulaciones mecánicas de las CCs, ya que algunas CCs exhiben una disminución parcial de la actividad, mientras que otras no exhiben ningún cambio (Figura 62). Estudios recientes han revelado que en larvas maduras de pez cebra, todos los terminales colinérgicos que contactan a un solo NM provienen de la misma AChNE, y presentan actividad sincronizada. Más aún, los terminales eferentes colinérgicos se activan simultáneamente con las neuronas motoras de la médula espinal (Lunsford et al., 2019; Zhang & Kindt, 2022), permitiendo al animal discriminar entre señales mecánicas exógenas y señales originadas por su locomoción. Por otro lado, se analizó la liberación de ACh desde los terminales de las AChNEs evocada por el nado ficticio (ráfagas de actividad en motoneuronas de larvas paralizadas), y se observó una disminución de la liberación de glutamato en el 50% de los NMs estudiados (Pinchler & Lagnado, 2020). Además, se observó un sesgo de polaridad en las respuestas inhibitorias en las CCs, siendo más efectiva la inhibición de aquellas CCs activables en la dirección anteroposterior. Esta heterogeneidad en la respuesta inhibitoria habría sido evolutivamente favorable dado que el en el momento del nado, el pez se desplaza deflectando sus cilios hacia atrás, mientras debe continuar alerta ante cualquier peligro del ambiente (Pinchler & Lagnado, 2020).

Teniendo en cuenta que, hasta el momento, solo se observó inhibición en respuestas evocadas por estímulos, y esta inhibición solo se dio en algunas CCs, podría ser que la actividad espontánea, que posee menor magnitud que la actividad evocada, no alcance los umbrales necesarios para evocar la respuesta inhibitoria. Sabiendo que el nAChR $\alpha 9$ posee una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Carpaneto et al., 2021), en lugar de participar de una inhibición, podría estar contribuyendo a las señales de Ca^{2+} registradas. Esto explicaría, por un lado, la disminución diferencial entre transientes rápidos y lentos, siendo los rápidos los

más afectados, y, por otro lado, la poca o nula participación de los canales SK cuando el estímulo no es tan robusto. Por otro lado, sabiendo que los terminales eferentes están sincronizados, esperaríamos que los transientes de Ca^{2+} provenientes de los nAChRs $\alpha 9$ también lo estén, sin embargo, esto no sucede. Diferencias en la expresión de nAChRs $\alpha 9$ o bien, en la eficiencia de liberación de ACh desde los terminales eferentes podría explicar este hecho.

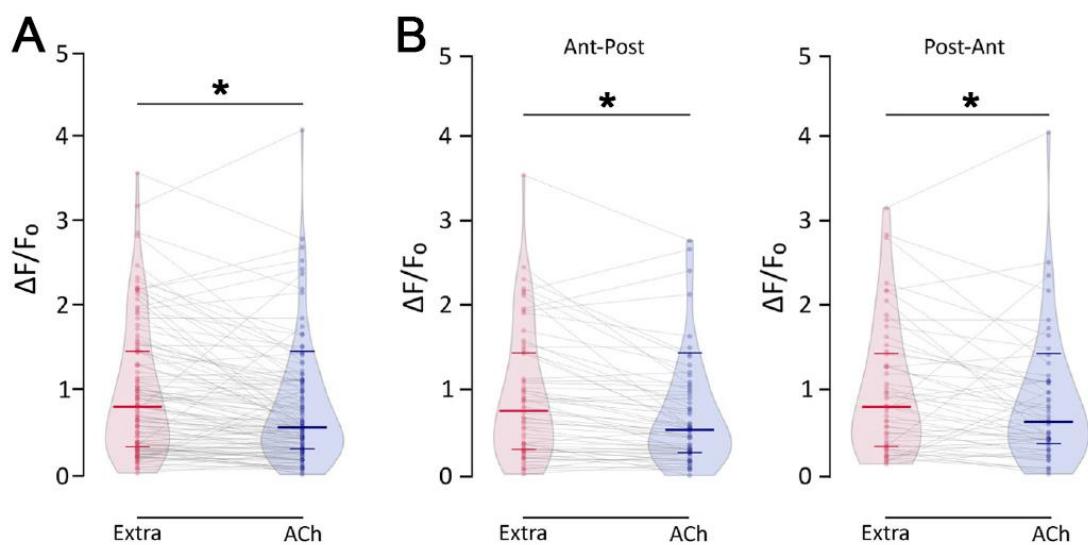


Figura 62: (A) Magnitud de fluorescencia exhibida por las CCs de la LL bajo estimulación mecánica en larvas de 6/7 dpf, antes y después de la aplicación de ACh en el baño. (B) Mismas CCs exhibidas en A, discriminadas por diferente polaridad. En ambas polaridades se observa heterogeneidad en la respuesta. Gran parte de las CCs exhiben una inhibición parcial, mientras que otras no muestran cambios o exhiben pequeñas activaciones. Cada punto representa una CC. Adaptado de Carpaneto et al., 2021.

Si bien, se ha demostrado que la inhibición de las respuestas evocadas por estímulos se debe a la apertura de los canales SK, un experimento de secuenciación de ARNm (ARNseq) de LL de pez cebra reveló que, al igual que las CCs de las regiones de mayor frecuencia de la cóclea, las CCs maduras expresan diferencialmente el gen que codifica la subunidad α de los canales BK, canales de K^+ activados por Ca^{2+} y voltaje (Lush et al., 2019). Las elevaciones intracelulares espontáneas de Ca^{2+} podrían alcanzar niveles suficientes como para activar los canales BK, que, junto a las corrientes rectificadoras de K^+ y los mecanismos de recaptación de Ca^{2+} intracelulares (bombas asociadas a mitocondrias o al retículo

sarcoplásmico) podrían explicar la bajada de los transientes espontáneos sin participación de la inhibición de los nAChRs $\alpha 9$.

Aún es necesario realizar más experimentos para revelar los mecanismos involucrados en la modulación eferente en el sistema de LL. Por lo pronto, nuestros resultados indican que el nAChR $\alpha 9$ participa en la modulación de la actividad espontánea por parte del sistema eferente colinérgico en las CCs maduras.

Las CCs presentan modulación purinérgica a los 6/7 dpf

La señalización purinérgica es un componente esencial de la transducción sensorial y la codificación de información en los sistemas visual, auditivo, olfativo y gustativo (Housley et al., 2009; Kinnamon & Finger, 2013; Rotermund et al., 2019). A lo largo de la vía auditiva ascendente, los receptores purinérgicos se expresan en muchos tipos de células incluyendo las CCI y CCE de la cóclea y NGE (Housley et al., 2009; Jovanovic et al., 2020; Vlajkovic et al., 2022), núcleo coclear (Milenkovic et al., 2009), núcleo medial del cuerpo trapezoide (MNTB) (Yao et al., 2000), y la oliva superior lateral y medial (Koehl et al., 2004). En los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos de señalización purinérgica en el sistema auditivo en desarrollo, incluida la propagación transientes de Ca^{2+} a través del oído interno (Eckrich et al., 2018), la modulación de la AEE en las CCI y CCE (Ceriani et al., 2016; Johnson et al., 2011; Tritsch et al., 2007, 2010). A pesar de las similitudes moleculares y funcionales con el sistema auditivo de mamíferos, poco se conoce sobre el papel de la señalización purinérgica en la modulación de la AEE expresada en estadíos maduros del sistema de LL. Para ello, realizamos incubaciones con MRS2500 y PPADS, antagonistas específicos de los receptores metabotrópicos P2Y₁ (P2ry₁) (Abbracchio et al., 2006) y los receptores ionotrópicos P2X (P2rx) (Coddou et al., 2011), respectivamente.

Nuestros resultados sugieren que el ATP, a través de la activación de receptores P2ry₁ estaría participando de la modulación de la AEE en las CCs, ya que el bloqueo de estos

receptores produce una disminución en la magnitud de la AEE, tanto en su componente lento como rápido. La disminución en la magnitud promedio de los eventos rápidos está explicada, por un lado, por una disminución en la frecuencia de eventos por NM y, además, por una disminución en la amplitud promedio, aunque la cantidad de CCs que presentan eventos rápidos se mantiene constante.

No hay evidencias de que el receptor P2ry₁ se exprese en CCs. Experimentos de ARNseq hechos sobre el transcriptoma de NMs a 5 dpf, no encontraron enriquecimiento de este receptor en CCs del pez cebra (Matern et al., 2018; Steiner et al., 2014). Más aún, recientemente se evidenció que la AEE exhibida por las células de soporte a 3 dpf depende de señales purinérgicas mediadas por el P2ry₁ (Zhang & Kindt, 2022). En este estadio, donde el sistema de LL aún se encuentra inmaduro, el bloqueo con MRS2500 redujo significativamente la magnitud y la frecuencia promedio de la AEE detectada en células de soporte. Además, los transientes de Ca²⁺ en las células de soporte dependen de la liberación de Ca²⁺ desde canales SERCA y son transmitidos entre células por difusión a través de canales gap (Wong et al., 2018; Zhang & Kindt, 2022). Estos resultados son consistentes con lo que se conoce en el sistema auditivo de mamíferos, donde el ATP liberado por las células de soporte dentro de la cóclea es suficiente para inducir la activación de grupos de CCI a lo largo del órgano de Corti (Babola et al., 2020, 2021; Tritsch et al., 2007; Wang et al., 2015). No obstante, en el pez cebra a los 3 dpf, la disminución en la AEE exhibida por las células de soporte no ocasiona cambios en los transientes espontáneos exhibidos por las CCs (Zhang & Kindt, 2022). En los experimentos realizados en esta tesis no analizamos la AEE sobre las células de soporte, y no estamos seguros de cuál es la consecuencia del bloqueo de los receptores en este estadio. Sin embargo, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, creemos que al modificar la AEE de las células de soporte, existe una consecuencia indirecta sobre la AEE expresada por las CCs, explicada, probablemente, por cambios en el potencial de membrana. Esto concuerda con lo observado en los valores de fluorescencia basales, que, en este caso, no presentan diferencias,

sugiriendo que la concentración de Ca^{2+} basal no se modificaría luego de la incubación con el bloqueante de receptores P2Y₁.

Antes del comienzo de la audición, la señalización purinérgica sobre las células de soporte del órgano de Corti activa el eflujo de Cl^- , K^+ y agua al medio extracelular basolateral. Esto provoca, a su vez, el aumento del potencial de reposo de las CCI haciéndolas más excitables (Babola et al., 2020). Como consecuencia, se produce la coordinación de las transiciones de Ca^{2+} expresadas por las CCI, y, cuando se bloquea el P2ry₁, dicha correlación se pierde (Babola et al., 2021). En los NMs, no hemos encontrado coordinación de actividad espontánea entre las CCs en ninguno de los estadios estudiados, y esto concuerda con lo reportado por Zhang & Kindt, 2022, a los 3 dpf. Entonces, la señalización purinérgica desde las células de soporte a las CCs podría estar modulando de manera positiva los transientes de Ca^{2+} espontáneos, pero no estarían coordinándolos. Un cambio en el potencial de membrana de las CCs podría explicar que, la inhibición del receptor P2ry₁, provoque un cambio en la amplitud promedio de los transientes de Ca^{2+} pero no en la cantidad de CCs que los exhiben y, en consecuencia, podría modificar la fuerza impulsora del Ca^{2+} al entrar por los canales $\text{Ca}_{v1.3}$.

Si bien necesitamos continuar con el estudio de los mecanismos involucrados en la modulación de los eventos espontáneos expresados en las CCs de la LL, nuestros resultados sugieren que las células de soporte estarían modulando la AEE que exhiben las CCs a través de la señalización purinérgica mediada por P2ry₁ a los 6/7 dpf.

Por otro lado, estudiamos si la AEE exhibida por las CCs en este estadio del desarrollo es modulada por la señalización purinérgica a través de receptores de la familia P2X. Luego de la incubación con el antagonista PPADS, observamos una disminución de la magnitud promedio de los eventos rápidos, permaneciendo los lentos sin cambios significativos. Observamos que la frecuencia promedio de transientes rápidos de Ca^{2+} presentan una disminución, aunque la amplitud promedio se mantiene constante. La cantidad de CCs que presentan eventos rápidos de Ca^{2+} también disminuye. Nuestros resultados sugieren que el receptor P2rx estaría modulando los transientes espontáneos de Ca^{2+} sobre las CCs.

No existen evidencias claras sobre la expresión de algún receptor de la familia P2X en las CCs de la LL en pez cebra. El análisis de los transcriptomas de las CCs de la LL a 5 dpf muestra resultados ambiguos con respecto al enriquecimiento en la expresión de algunos de estos canales. Steiner et al., 2014 propuso que tanto P2rx₇ como P2rx_{3a}, podrían estar expresados en las CCs, mientras que Matern et al., 2018 ha sugerido que ninguno de los transcriptos se expresa en CCs. Por otro lado, aún no hay evidencias de la expresión de estos receptores en CCs de LL en desarrollo.

En el sistema auditivo de mamíferos en desarrollo, los receptores P2rx₂ están localizados en la zona apical de las CCI y CCE, cerca de los estereocilios (Housley et al., 1999). En las CCI, los P2rx₂ cumplirían un rol otoprotector al activarse ante las altas concentraciones de ATP en la endolinfa, a causa de un daño mecánico en el epitelio auditivo (Housley et al., 2013; Lahne & Gale, 2010). Además, se ha propuesto que, durante el desarrollo, el receptor P2rx₃, ubicado en la zona basal de las CCI (Huang et al., 2006), se activaría a concentraciones nanomolares de ATP y estaría acoplado a los canales SK2, actuando sinérgicamente en la respuesta inhibitoria mediada por los nAChRs α9α10, antes del comienzo de la audición (Johnson et al., 2011). Esto último nos resulta interesante ya que, en la LL, al bloquear los receptores P2rx, observamos resultados similares a la inhibición con α-BTX: una disminución diferencial más pronunciada de la magnitud y frecuencia promedio de los transientes rápidos, acompañada por una disminución en la cantidad de CCs que presentan este tipo de eventos, aunque la amplitud promedio del evento por CCs no varía.

PPADS ha resultado ser efectivo para bloquear los receptores P2rx₁, P2rx₂, P2rx₃ y P2rx₅, aunque presenta poca efectividad para bloquear P2rx₄, P2rx₆ y P2rx₇ de rata (Coddou et al., 2011). Dado que nuestros experimentos no se realizaron agregando una concentración de ATP conocida a la cámara de registro, asumimos que, de existir una modulación espontánea, dicha concentración estaría dentro del orden nanomolar. Tendríamos que realizar más experimentos, con agregado de ATP y/o antagonistas específicos de los receptores P2rx₂ y P2rx₃ para indagar más en dicha modulación. Nuestros resultados arrojan

una primera evidencia de que la señalización purinérgica mediada por receptores P2rx modula la AEE expresada en las CCs a 6/7 dpf.

Conclusiones

- Las CCs de la LL exhiben eventos de AEE entre los 3 y los 7 dpf.
- Las CCs presentan eventos de AEE con diferentes dinámicas temporales, transientes de Ca^{2+} rápidos y lentos.
- Los eventos de AEE exhibidos por las CCs alcanzan un máximo de magnitud a los 4 dpf, antes de la maduración del sistema. Esto se explica por un incremento en el reclutamiento de CCs activas por NM y, a su vez, por un aumento en la magnitud promedio tanto de transientes de Ca^{2+} rápidos como lentos.
- La AEE exhibida por las CCs a los 6/7 dpf es modulada por el sistema eferente, a través del nAChR $\alpha 9$.
- A los 6/7 dpf, la AEE exhibida por las CCs es modulada por señales purinérgicas mediadas por los receptores P2ry₁ presentes en las células de soporte del NM.
- A los 6/7 dpf, la AEE expresada en CCs es modulada por señales purinérgicas mediadas por los receptores P2rx. Esta modulación afecta diferencialmente a los transientes de Ca^{2+} rápidos.

REFERENCIAS

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., & Weisman, G. A. (2006). *International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy*. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 58, Issue 3, pp. 281–341). <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>
- Ackman, J. B., Burbridge, T. J., & Crair, M. C. (2012). *Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system*. *Nature*, 490(7419), 219–225. <https://doi.org/10.1038/nature11529>
- Agster, K. L., Mejias-Aponte, C. A., Clark, B. D., & Waterhouse, B. D. (2013). *Evidence for a regional specificity in the density and distribution of noradrenergic varicosities in rat cortex*. *Journal of Comparative Neurology*, 521(10), 2195–2207. <https://doi.org/10.1002/cne.23270>
- Alexandre, D., & Ghysen, A. (1999). *Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7558–7562. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7558>
- Alsina, B., Vu, T., & Cohen-Cory, S. (2001). *Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: Dynamics and modulation by BDNF*. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/nn735>
- Aman, A., & Piotrowski, T. (2008). *Wnt/β-Catenin and Fgf Signaling Control Collective Cell Migration by Restricting Chemokine Receptor Expression*. *Developmental Cell*, 15(5), 749–761. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.10.002>
- Augustine, G., Santamaria, F., & Tanaka. (2003). *Local calcium signaling in neurons*.
- Babola, T. A., Kersbergen, C. J., Wang, H. C., & Bergles, D. E. (2020). *Purinergic signaling in cochlear supporting cells reduces hair cell excitability by increasing the extracellular space*. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.52160>
- Babola, T. A., Li, S., Gribizis, A., Lee, B. J., Issa, J. B., Wang, H. C., Crair, M. C., & Bergles, D. E. (2018). *Homeostatic Control of Spontaneous Activity in the Developing Auditory System*. *Neuron*, 99(3), 511–524.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.004>
- Babola, T. A., Li, S., Wang, Z., Kersbergen, C. J., Elgoyhen, A. B., Coate, T. M., & Bergles, D. E. (2021). *Purinergic signaling controls spontaneous activity in the auditory system throughout early development*. *Journal of Neuroscience*, 41(4), 594–612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-20.2020>
- Basu, A., Lagier, S., Vologodskaia, M., Fabella, B. A., & Hudspeth, A. J. (2016). *Direct mechanical stimulation of tip links in hair cells through DNA tethers*. <https://doi.org/10.7554/eLife.16041.001>
- Belén Elgoyhen, A., 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.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051622798
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). *Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Beurg, M., Evans, M. G., Hackney, C. M., & Fettiplace, R. (2006). *A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells*. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 10992–11000. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2188-06.2006>

- Blankenship, A. G., & Feller, M. B. (2010). *Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits*. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 11, Issue 1, pp. 18–29). <https://doi.org/10.1038/nrn2759>
- Bleckmann, H. (2008). *Peripheral and central processing of lateral line information*. In *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* (Vol. 194, Issue 2, pp. 145–158). <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0282-2>
- Bolsover, S. R. (2005). *Calcium signaling in growth cone migration*. In *Cell Calcium* (Vol. 37, Issue 5 SPEC. ISS., pp. 395–402). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.01.007>
- Borodinsky, L. N., Root, C. M., Cronin, J. A., Sann, S. B., Gu, X., & Spitzer, N. C. (2004). *Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons*. www.nature.com/nature
- Brandt, A., Striessnig, J., & Moser, T. (2003). *Cellular/Molecular Ca V 1.3 Channels Are Essential for Development and Presynaptic Activity of Cochlear Inner Hair Cells*.
- Brantley, R. K., & Bass, A. H. (1988). *Cholinergic neurons in the brain of a teleost fish (Porichthys notatus) located with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase*. *Journal of Comparative Neurology*, 275(1), 87–105. <https://doi.org/10.1002/cne.902750108>
- Bricaud, O., Chaar, V., Dambly-Chaudire, C., & Ghysen, A. (2001). *Early efferent innervation of the zebrafish lateral line*. *Journal of Comparative Neurology*, 434(3), 253–261. <https://doi.org/10.1002/cne.1175>
- Brown, M. E., & Bridgman, P. C. (2004). *Myosin Function in Nervous and Sensory Systems*. In *Journal of Neurobiology* (Vol. 58, Issue 1, pp. 118–130). <https://doi.org/10.1002/neu.10285>
- Burns, J. C., & Stone, J. S. (2017). *Development and regeneration of vestibular hair cells in mammals*. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 65, pp. 96–105). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.11.001>
- Burrone, J., O'Byrne, M., & Murthy, V. N. (2002). *Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons*. *Nature*, 420(6914), 414–418. <https://doi.org/10.1038/nature01242>
- Caprara, G. A., & Peng, A. W. (2022). *Mechanotransduction in mammalian sensory hair cells*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103706>
- Carpaneto, A. E., Moglie, M. J., Castagnola, T., Salatino, L., Domene, S., Marcovich, I., Gallino, S., Wedemeyer, C., Goutman, J. D., Plazas, P. V., & Elgoyen, A. B. (2021). *Unraveling the molecular players at the cholinergic efferent synapse of the zebrafish lateral line*. *Journal of Neuroscience*, 41(1), 47–60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1772-20.2020>
- Ceriani, F., Hendry, A., Jeng, J., Johnson, S. L., Stephani, F., Olt, J., Holley, M. C., Mammano, F., Engel, J., Kros, C. J., Simmons, D. D., & Marcotti, W. (2019). *Coordinated calcium signalling in cochlear sensory and non-sensory cells refines afferent innervation of outer hair cells*. *The EMBO Journal*, 38(9). <https://doi.org/10.15252/embj.201899839>
- Ceriani, F., Pozzan, T., & Mammano, F. (2016). *Critical role of ATP-induced ATP release for Ca²⁺ signaling in nonsensory cell networks of the developing cochlea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), E7194–E7201. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616061113>
- Chang, & Camilli. (2001). *Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia*.
- Chen, T. H., Wang, Y. H., & Wu, Y. H. (2011). *Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays*. *Aquatic Toxicology*, 102(3–4), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.010>

- Chen, X., Abad, C., Chen, Z. Y., Young, J. I., Gurumurthy, C. B., Walz, K., & Liu, X. Z. (2021). *Generation and characterization of a P2rx2 V60L mouse model for DFNA41*. *Human Molecular Genetics*, 30(11). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab077>
- Chevaleyre, V., Moos, C., & Desarmé, M. G. (2001). *Interplay between Presynaptic and Postsynaptic Activities Is Required for Dendritic Plasticity and Synaptogenesis in the Supraoptic Nucleus*.
- Chitnis, A. B., Dalle Nogare, D., & Matsuda, M. (2012). *Building the posterior lateral line system in zebrafish*. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 234–255. <https://doi.org/10.1002/dneu.20962>
- Clause, A., Kim, G., Sonntag, M., Weisz, C. J. C., Vetter, D. E., Rubsam, 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>
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Pablo Huidobro-Toro, J., & Stojilkovic, S. S. (2011). *Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels*. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>
- Cohen-Cory, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J., & Marshak, S. (2010). *Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity*. In *Developmental Neurobiology* (Vol. 70, Issue 5, pp. 271–288). <https://doi.org/10.1002/dneu.20774>
- Crawford, A. C., & Fettiplace, R. (1985). *The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells*. In *J. Physiol* (Vol. 364).
- Cuadra, A. E., Hwang, F. J., Burt, L. M., Edmonds, W. C., Chobany, A. V., & Li, G. L. (2021). *Phase-locking requires efficient ca21 extrusion at the auditory hair cell ribbon synapse*. *Journal of Neuroscience*, 41(8), 1625–1635. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1324-18.2020>
- Dallos, P. (1992). *The Active Cochlea*. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 2, Issue 12).
- Day, B. L., & Fitzpatrick, R. C. (2005). *The vestibular system*. In *Current biology: CB* (Vol. 15, Issue 15). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.053>
- De Boer, T. P., Houtman, M. J. C., Compier, M., & Van Der Heyden, M. A. G. (2010). *The mammalian KIR2.x inward rectifier ion channel family: Expression pattern and pathophysiology*. In *Acta Physiologica* (Vol. 199, Issue 3, pp. 243–256). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02108.x>
- De Faveri, F., Marcotti, W., Ceriani, F., Toth, K., & Thirumalai, V. (2021). *Sensory adaptation at ribbon synapses in the zebrafish lateral line*. *The Journal of Physiology*, 599, 3677–3696. <https://doi.org/10.1113/JP281646#support-information-section>
- De Paola, V., Arber, S., & Caroni, P. (2003). *AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks*. *Nature Neuroscience*, 6(5), 491–500. <https://doi.org/10.1038/nn1046>
- DeCarvalho, A. C., Cappendijk, S. L. T., & Fadool, J. M. (2004). *Developmental Expression of the POU Domain Transcription Factor Brn-3b (Pou4f2) in the Lateral Line and Visual System of Zebrafish*. *Developmental Dynamics*, 229(4), 869–876. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10475>
- Dijkgraaf, S. (1962). *The functioning and significance of the lateral-line organs*. In *Biol. Reel* (Vol. 38).
- Dora Sapède, Nicolas Gompel, Christine Dambly-Chaudière, & Alain Ghysen. (2002). *Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line*.
- Dow, E., Jacobo, A., Hossain, S., Siletti, K., & Hudspeth, A. J. (2018). *Connectomics of the zebrafish's lateral-line neuromast reveals wiring and miswiring in a simple microcircuit*. <https://doi.org/10.7554/eLife.33988.001>
- Duale, H., Waki, H., Howorth, P., Kasparov, S., Teschemacher, A. G., & Paton, J. F. R. (2007). *Restraining influence of A2 neurons in chronic control of arterial pressure in spontaneously*

- hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 76(1), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.06.018>
- Eaton, R. C., Bombardieri, R. A., & Meyer, D. L. (1977). The mauthner initiated startle response in teleost fish. In *exp. Biol* (Vol. 66).
- Eckrich, T., Blum, K., Milenovic, I., & Engel, J. (2018). Fast Ca₂₊ Transients of Inner Hair Cells Arise Coupled and Uncoupled to Ca₂₊ Waves of Inner Supporting Cells in the Developing Mouse Cochlea. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00264>
- Edwards, J. G., Greig, A., Sakata, Y., Elkin, D., & Michel, W. C. (2007). Cholinergic innervation of the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 504(6), 631–645. <https://doi.org/10.1002/cne.21480>
- Elgoyen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E., & Heinemann, S. (1994). a9: An Acetylcholine Receptor with Novel Pharmacological Properties Expressed. In *Cell* (Vol. 79).
- Erazo-Fischer, E., Striessnig, J., & Taschenberger, H. (2007). The role of physiological afferent nerve activity during in vivo maturation of the calyx of Held synapse. *Journal of Neuroscience*, 27(7), 1725–1737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4116-06.2007>
- Erickson, T., & Nicolson, T. (2015). Identification of sensory hair-cell transcripts by thiouracil-tagging in zebrafish. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2072-5>
- Faucherre, A., Baudoin, J. P., Pujol-Martí, J., & López-Schier, H. (2010). Multispectral four-dimensional imaging reveals that evoked activity modulates peripheral arborization and the selection of plane-polarized targets by sensory neurons. *Development*, 137(10), 1635–1643. <https://doi.org/10.1242/dev.047316>
- Faucherre, A., Pujol-Martí, J., Kawakami, K., & López-Schier, H. (2009a). Afferent neurons of the zebrafish lateral line are strict selectors of hair-cell orientation. *PLoS ONE*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004477>
- Feller. (1999). Spontaneous Correlated Activity Minireview in Developing Neural Circuits.
- Fernández-Montoya, J., Avendaño, C., & Negredo, P. (2018). The glutamatergic system in primary somatosensory neurons and its involvement in sensory input-dependent plasticity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19010069>
- Flock, A., & Duvall, A. J. (1965). The ultrastructure of the kinocilium of the sensory cells in the inner ear and lateral line organs. <http://rupress.org/jcb/article-pdf/25/1/1/1613273/1.pdf>
- Flock, & Wersäll. (1962). A study of the orientation of the sensory hairs of the receptor cells in the lateral line organ of fish, with special reference to the function of the receptors.
- Fredj, N. Ben, Hammond, S., Otsuna, H., Chien, C. Bin, Burrone, J., & Meyer, M. P. (2010). Synaptic activity and activity-dependent competition regulates axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10939–10951. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1556-10.2010>
- Gan, W.-B. (2003). Glutamate-Dependent Stabilization of Presynaptic Terminals. In *Trends Neurosci* (Vol. 38).
- Geraldes, V., Goncalves-Rosa, N., Liu, B., Paton, J. F. R., & Rocha, I. (2014). Essential role of RVL medullary neuronal activity in the long-term maintenance of hypertension in conscious SHR. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 186(C), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.09.002>
- Geraldes, V., Goncalves-Rosa, N., Tavares, C., Paton, J. F. R., & Rocha, I. (2016). Reversing gene expression in cardiovascular target organs following chronic depression of the paraventricular

- nucleus of hypothalamus and rostral ventrolateral medulla in spontaneous hypertensive rats.* *Brain Research*, 1646, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.041>
- Ghysen, A., & Dambly-Chaudière, C. (2007). *The lateral line microcosmos*. *Genes and Development*, 21(17), 2118–2130. <https://doi.org/10.1101/gad.1568407>
- Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H. M., & Nüsslein-Volhard, C. (2004). *Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo*. *Nature Neuroscience*, 7(5), 491–492. <https://doi.org/10.1038/nn1235>
- Gleason, M. R., Nagiel, A., Jamet, S., Vologodskaia, M., Ló Pez-Schier, N., & Hudspeth, A. J. (2008). *The transmembrane inner ear (Tmie) protein is essential for normal hearing and balance in the zebrafish*. www.pnas.org/cg/doi/10.1073/pnas.0911632106
- Glowatzki, E., & Fuchs, P. A. (2002). *Transmitter release at the hair cell ribbon synapse*. *Nature Neuroscience*, 5(2), 147–154. <https://doi.org/10.1038/nn796>
- Glowatzki, E., & Fuchs. (2000). *Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea*.
- Glueckert, R., Wietzorrek, G., Kammen-Jolly, K., Scholtz, A., Stephan, K., Striessnig, J., & Schrott-Fischer, A. (2003). *Role of class D L-type Ca^{2+} channels for cochlear morphology*. *Hearing Research*, 178(1–2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00054-6)
- Goda, Y., & Davis, G. W. (2003). *Review Mechanisms of Synapse Assembly and Disassembly*. In *Neuron* (Vol. 40).
- Gomez, & Spitzer. (1999). *In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients*. www.nature.com
- Gomez, T. M., Robles, E., Poo, M., & Spitzer, N. C. (2001). *Filopodial Calcium Transients Promote Substrate-Dependent Growth Cone Turning*. www.sciencemag.org
- Gomez, T. M., & Zheng, J. Q. (2006). *The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding*. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 2, pp. 115–125). <https://doi.org/10.1038/nrn1844>
- Gomez T. M, Spitzer NC. *Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives*. *J Neurobiol*. 2000 Aug;44(2):174-83. PMID: 10934320.
- 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>
- Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudie Áre, C., & Ghysen, A. (2001). *Pattern formation in the lateral line of zebrafish*. www.elsevier.com/locate/modo
- 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>
- Grillner, S., Ekeberg, O., Manira, A. El, Lansner, A., Parker, D., Tegner, J., & Wallen, P. (1998). *Intrinsic function of a neuronal network-a vertebrate central pattern generator* 1. In *Brain Research Reviews* (Vol. 26).
- Gu, & Spitzer. (1994). *Spontaneous Neuronal Calcium Spikes and Waves during Early differentiation*.
- Haehnel, M., Taguchi, M., & Liao, J. C. (2012). *Heterogeneity and dynamics of lateral line afferent innervation during development in zebrafish (*Danio rerio*)*. *Journal of Comparative Neurology*, 520(7), 1376–1386. <https://doi.org/10.1002/cne.22798>
- Hashimoto, T., Katsuki, Y., & Yanagisawa, K. (1970). *Efferent system of lateral line organ of fish*. In *Biochem. Physiol* (Vol. 33). Pergamon Press.

- Hatada, Y., Wu, F., Sun, Z.-Y., Schacher, S., & Goldberg, D. J. (2000). *Presynaptic Morphological Changes Associated with Long-Term Synaptic Facilitation Are Triggered by Actin Polymerization at Preexisting Varicosities*. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 20). www.jneurosci.org. <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/4307>
- Hernández, P. P., Olivari, F. A., Sarrazin, A. F., Sandoval, P. C., & Allende, M. L. (2007). *Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: Expression of the neural progenitor cell marker Sox2 and proliferation-dependent and -independent mechanisms of hair cell renewal*. *Developmental Neurobiology*, 67(5), 637–654. <https://doi.org/10.1002/dneu.20386>
- Hocking, J. C., Pollock, N. S., Johnston, J., Wilson, R. J. A., Shankar, A., & McFarlane, S. (2012). *Neural activity and branching of embryonic retinal ganglion cell dendrites. Mechanisms of Development*, 129(5–8), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.05.003>
- Holman, H. A., Poppi, L. A., Frerck, M., & Rabbitt, R. D. (2019). *Spontaneous and acetylcholine evoked calcium transients in the developing mouse utricle*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00186>
- Holt, J. R., Johns, D. C., Wang, S., Chen, Z.-Y., Dunn, R. J., Marban, E., & Corey, D. P. (1999). *Functional Expression of Exogenous Proteins in Mammalian Sensory Hair Cells Infected With Adenoviral Vectors*.
- Housley, G. D., Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2009). *Purinergic signaling in special senses*. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 32, Issue 3, pp. 128–141). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.01.001>
- Housley, G. D., Kanjhan, R., Raybould, N. P., Greenwood, D., Salih, S. G., Jä, L., Burton, L. D., Setz, V. C. M., Cannell, M. B., Soeller, C., Christie, D. L., Usami, S.-I., Matsubara, A., Yoshie, H., Ryan, A. F., & Thorne, P. R. (1999). *Expression of the P2X 2 Receptor Subunit of the ATP-Gated Ion Channel in the Cochlea: Implications for Sound Transduction and Auditory Neurotransmission*.
- Housley, G. D., Morton-Jones, R., Vlajkovic, S. M., Telang, R. S., Paramananthasivam, V., Tadros, S. F., Wong, A. C. Y., Froud, K. E., Cederholm, J. M. E., Sivakumaran, Y., Snguanwongchai, P., Khakh, B. S., Cockayne, D. A., Thorne, P. R., & Ryan, A. F. (2013). *ATP-gated ion channels mediate adaptation to elevated sound levels*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7494–7499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222295110>
- Howard, J., & Ashmore, J. F. (1986). *Stiffness of sensory hair bundles in the sacculus of the frog*. In *Hearing Research* (Vol. 23).
- Hua, J. Y., Smear, M. C., Baier, H., & Smith, S. J. (2005). *Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition*. www.nature.com/nature
- Huang, L. C., Ryan, A. F., Cockayne, D. A., & Housley, G. D. (2006). *Developmentally regulated expression of the P2X3 receptor in the mouse cochlea*. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(6), 681–692. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0119-4>
- Hudspeth, A. J., & Jacobs, R. (1979). *Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells (auditory system/cilium/vestibular system)*. In *Neurobiology* (Vol. 76, Issue 3).
- Jay, M., De Faveri, F., & McDearmid, J. R. (2015). *Firing dynamics and modulatory actions of supraspinal dopaminergic neurons during zebrafish locomotor behavior*. *Current Biology*, 25(4), 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.033>
- Ji, Y. R., Warrier, S., Jiang, T., Wu, D. K., & Kindt, K. S. (2018). *Directional selectivity of afferent neurons in zebrafish neuromasts is regulated by Emx2 in presynaptic hair cells*. *eLife*, 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.35796>
- Jiang, T., Nathans, J., Hopkins, J., Kindt, K., & Wu, D. K. (2017). *Transcription factor Emx2 controls stereociliary bundle orientation of sensory hair cells*. <https://doi.org/10.7554/eLife.23661.001>

- Johns, D. C., Marx, R., Mains, R. E., O'rourke, B., & Marbán, E. (1999). *Inducible Genetic Suppression of Neuronal Excitability*.
- Johnson, S. L., Eckrich, T., Kuhn, S., Zampini, V., Franz, C., Ranatunga, K. M., Roberts, T. P., Masetto, S., Knipper, M., Kros, C. J., & Marcotti, W. (2011). *Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells*. *Nature Neuroscience*, 14(6), 711–717. <https://doi.org/10.1038/nn.2803>
- Johnson, S. L., Kuhn, S., Franz, C., Ingham, N., Furness, D. N., Knipper, M., Steel, K. P., Adelman, J. P., Holley, M. C., & Marcotti, W. (2013). *Presynaptic maturation in auditory hair cells requires a critical period of sensory-independent spiking activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8720–8725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219578110>
- Jones, T. A., Leake, P. A., Snyder, R. L., Stakhovskaya, O., & Bonham, B. (2007). *Spontaneous discharge patterns in cochlear spiral ganglion cells before the onset of hearing in cats*. *Journal of Neurophysiology*, 98(4), 1898–1908. <https://doi.org/10.1152/jn.00472.2007>
- Jovanovic, S., & Milenkovic, I. (2020). *Purinergic Modulation of Activity in the Developing Auditory Pathway*. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 36, Issue 11, pp. 1285–1298). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00586-4>
- Kalil, K., & Dent, E. W. (2014). *Branch management: Mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS*. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 15, Issue 1, pp. 7–18). <https://doi.org/10.1038/nrn3650>
- Kandler, K., Clause, A., & Noh, J. (2009). *Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits*. In *Nature Neuroscience* (Vol. 12, Issue 6, pp. 711–717). <https://doi.org/10.1038/nn.2332>
- Kandler, K., & Katz, L. C. (1998). *Coordination of Neuronal Activity in Developing Visual Cortex by Gap Junction-Mediated Biochemical Communication*.
- Karlsson, J., Von Hofsten, J., & Olsson, P. E. (2001). *Generating transparent zebrafish: A refined method to improve detection of gene expression during embryonic development*. *Marine Biotechnology*, 3(6), 522–527. <https://doi.org/10.1007/s1012601-0053-4>
- Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E. M., Milligan, R. A., Müller, U., & Kachar, B. (2007). *Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells*. *Nature*, 449(7158), 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature06091>
- Keen, E. C., & Hudspeth, A. J. (2006). *Transfer characteristics of the hair cell's afferent synapse*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601103103
- Kersbergen, C. J., Babola, T. A., Rock, J., & Bergles, D. E. (2022). *Developmental spontaneous activity promotes formation of sensory domains, frequency tuning and proper gain in central auditory circuits*. *Cell Reports*, 41(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111649>
- Khan, S., & Chang, R. (2013). *Anatomy of the vestibular system: A review*. In *NeuroRehabilitation* (Vol. 32, Issue 3, pp. 437–443). <https://doi.org/10.3233/NRE-130866>
- Khazipov, Sirota, Leinekugel, Holmes, Ben-Ari, & Buzsak. (2004). *Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex*. *Nature*, 432(7018), 753–758. <https://doi.org/10.1038/nature02992>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*.
- Kimmel, C. B., Patterson, J., & Kimmel, R. O. (1974). *The Development and Behavioral Characteristics of the Startle Response in the Zebra Fish*.

- Kinnamon, S. C., & Finger, T. E. (2013). A taste for ATP: *Neurotransmission in taste buds*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00264>
- Kozlov, A. S., Risler, T., & Hudspeth, A. J. (2007). *Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels*.
- Lahne, M., & Gale, J. E. (2010). *Damage-induced cell-cell communication in different cochlear cell types via two distinct ATP-dependent Ca^{2+} waves*. *Purinergic Signalling*, 6(2), 189–200. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9193-8>
- Leighton, A. H., & Lohmann, C. (2016). *The wiring of developing sensory circuits: From patterned spontaneous activity to synaptic plasticity mechanisms*. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 10, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00071>
- Lenzi, D., Runyeon, J. W., Crum, J., Ellisman, M. H., & Roberts, W. M. (1998). *Synaptic Vesicle Populations in Saccular Hair Cells Reconstructed by Electron Tomography*.
- Li, V. J., Schohl, A., & Ruthazer, E. S. (2022). *Topographic map formation and the effects of NMDA receptor blockade in the developing visual system*. *NEUROSCIENCE* Downloaded at MCGILL UNIVERSITY LIBRARIES on February, 24, 2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107899119/-/DCSupplemental>
- Liao, J. C. (2010). *Organization and physiology of posterior lateral line afferent neurons in larval zebrafish*. *Biology Letters*, 6(3), 402–405. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0995>
- Liao, J. C., & Haehnel, M. (2012). *Physiology of afferent neurons in larval zebrafish provides a functional framework for lateral line somatotopy*. *Journal of Neurophysiology*, 107(10), 2615–2623. <https://doi.org/10.1152/jn.01108.2011>
- Lipovsek, M., Im, G. J., Franchini, L. F., Pisciottano, F., Katz, E., Fuchs, P. A., & Elgoyhien, A. B. (2012). *Phylogenetic differences in calcium permeability of the auditory hair cell cholinergic nicotinic receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4308–4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115488109>
- Lippe, W. (1994). *Rhythmic Spontaneous Activity in the Developing Avian Auditory System*. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 14, Issue 3).
- López-Schier, H. N., Starr, C. J., Kappler, J. A., Kollmar, R., & Hudspeth, A. J. (2004). *Directional cell migration establishes the axes of planar polarity in the posterior lateral line organ of the zebrafish the entire complement of neuromasts later migrates*. In *Developmental Cell* (Vol. 7).
- López-Schier, H., & Hudspeth, A. J. (2006). *A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18615–18620. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608536103>
- Lowery, L. A., & Vactor, D. Van. (2009). *The tip of the tip: Understanding the growth cone machinery*. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 332–343). <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Luhmann, H. J., Sinning, A., Yang, J. W., Reyes-Puerta, V., Stüttgen, M. C., Kirischuk, S., & Kilb, W. (2016). *Spontaneous neuronal activity in developing neocortical networks: From single cells to large-scale interactions*. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00040>
- Lukasz, D., & Kindt, K. S. (2018). *In vivo calcium imaging of lateral-line hair cells in larval zebrafish*. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(141). <https://doi.org/10.3791/58794>
- Lunsford, E. T., Skandalis, D. A., & Liao, J. C. (2019). *Efferent modulation of spontaneous lateral line activity during and after zebrafish motor commands*. *J Neurophysiol*, 122, 2438–2448. <https://doi.org/10.1152/jn.00594.2019>.-Accurate

- Lush, M. E., Diaz, D. C., Koenecke, N., Baek, S., Boldt, H., St Peter, M. K., Gaitan-Escudero, T., Romero-Carvajal, A., Busch-Nentwich, E. M., Perera, A. G., Hall, K. E., Peak, A., Haug, J. S., & Piotrowski, T. (2019). *scRNA-Seq reveals distinct stem cell populations that drive hair cell regeneration after loss of Fgf and Notch signaling*. <https://doi.org/10.7554/eLife.44431.001>
- Marachlian, E., Avitan, L., Goodhill, G. J., & Sumbre, G. (2018). *Principles of functional circuit connectivity: Insights from spontaneous activity in the zebrafish optic tectum*. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00046>
- Marcotti, W., Johnson, S. L., Rüschi, A., & Kros, C. J. (2003). *Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells*. In *Journal of Physiology* (Vol. 552, Issue 3, pp. 743–761). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.043612>
- Martini, F. J., Guillamón-Vivancos, T., Moreno-Juan, V., Valdeolmillos, M., & López-Bendito, G. (2021). *Spontaneous activity in developing thalamic and cortical sensory networks*. In *Neuron* (Vol. 109, Issue 16, pp. 2519–2534). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.026>
- Matern, M. S., Beirl, A., Ogawa, Y., Song, Y., Paladugu, N., Kindt, K. S., & Hertzano, R. (2018). *Transcriptomic profiling of zebrafish hair cells using RiboTag*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00047>
- Matsuda, M., & Chitnis, A. B. (2010). *Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish*. *Development*, 137(20), 3477–3487. <https://doi.org/10.1242/dev.052761>
- Matthews, G., & Fuchs, P. (2010). *The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission*. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 11, Issue 12, pp. 812–822). <https://doi.org/10.1038/nrn2924>
- Mattson, M. P. (2008). *Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1144, 97–112. <https://doi.org/10.1196/annals.1418.005>
- McHenry, M. J., & Van Netten, S. M. (2007). *The flexural stiffness of superficial neuromasts in the zebrafish (Danio rerio) lateral line*. *Journal of Experimental Biology*, 210(23), 4244–4253. <https://doi.org/10.1242/jeb.009290>
- McKay, S. M., & Oleskevich, S. (2007). *The role of spontaneous activity in development of the endbulb of Held synapse*. *Hearing Research*, 230(1–2), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.05.006>
- Mckinney, W. (2010). *Data Structures for Statistical Computing in Python*.
- McLean, D. L., Fan, J., Higashijima, S. I., Hale, M. E., & Fethcho, J. R. (2007). *A topographic map of recruitment in spinal cord*. *Nature*, 446(7131), 71–75. <https://doi.org/10.1038/nature05588>
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J. C. F., Steiner, P., Hirling, H., & Unser, M. (2004). *Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images*. *Cytometry Part A*, 58(2), 167–176. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20022>
- Meister, M., Wong, R. O. L., Baylor, D. A., & Shatz, C. J. (1991). *Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian*. In *New Series* (Vol. 252, Issue 5008).
- Meredith, G. E., & Roberts, B. L. (1987). *Distribution and morphological characteristics of efferent neurons innervating end organs in the ear and lateral line of the european eel*. *Journal of Comparative Neurology*, 265(4), 494–506. <https://doi.org/10.1002/cne.902650404>
- Metcalfe, W. K. (1985). *Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish*. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 238).
- Metcalfe, W. K., Kimmel, C. B., & Schabtach, E. (1985). *Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish*. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*.

- Meyer, M. P., & Smith, S. J. (2006). *Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms*. *Journal of Neuroscience*, 26(13), 3604–3614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0223-06.2006>
- Milenkovic, I., Rinke, I., Witte, M., Dietz, B., & Rübsamen, R. (2009). *P2 receptor-mediated signaling in spherical bushy cells of the mammalian cochlear nucleus*. *Journal of Neurophysiology*, 102(3), 1821–1833. <https://doi.org/10.1152/jn.00186.2009>
- Minlebaev, M., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2007). *Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo*. *Journal of Neurophysiology*, 97(1), 692–700. <https://doi.org/10.1152/jn.00759.2006>
- Moglie, M. J., Wengier, D. L., Elgoyen, A. B., & Goutman, J. D. (2021). *Synaptic contributions to cochlear outer hair cell Ca^{2+} dynamics*. *Journal of Neuroscience*, 41(32), 6812–6821. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3008-20.2021>
- Montgomery, J., Carton, G., Voigt, R., Baker, C., & Diebel, C. (2000). *Sensory processing of water currents by fishes*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1401), 1325–1327. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0693>
- Moody, W. J., & Bosma, M. M. (2005). *Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2004>.-At
- Moser, T., & Beutner, D. (1999). *Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse*. www.pnas.org
- Mostafapour, S. P., Cochran, S. L., Mae, N., Puerto, D., Rubel, E. W., Merrill, V., & Hearing, B. (2000). *Patterns of cell death in mouse anteroventral cochlear nucleus neurons after unilateral cochlea removal*. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 426:561-571 (2000). In *J. Comp. Neurol* (Vol. 426).
- Muller, D., & Nikonenko, I. (2003). *Dynamic presynaptic varicosities: A role in activity-dependent synaptogenesis*. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Issue 11, pp. 573–575). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.010>
- Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., & Kawakami, K. (2013). *Real-time visualization of neuronal activity during perception*. *Current Biology*, 23(4), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.040>
- Nagiel, A., Andor-Ardó, D., & Hudspeth, A. J. (2008). *Specificity of afferent synapses onto plane-polarized hair cells in the posterior lateral line of the zebrafish*. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8442–8453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2425-08.2008>
- Nelson, S. B., & Valakh, V. (2015). *Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders*. In *Neuron* (Vol. 87, Issue 4, pp. 684–698). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.033>
- Nenov, A. P., Norris, C., & Bobbin, R. P. (1996). *Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel* I. In *Hearing Research* (Vol. 101).
- Nicolson, T. (2017). *The genetics of hair-cell function in zebrafish*. *Journal of Neurogenetics*, 31(3), 102–112. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1342246>
- Nie, L., Song, H., Chen, M. F., Chiamvimonvat, N., Beisel, K. W., Yamoah, E. N., & Vázquez, A. E. (2004). Cloning and Expression of a Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channel from the Mouse Cochlea: *Coexpression with $\alpha 9/\alpha 10$ Acetylcholine Receptors*. *Journal of Neurophysiology*, 91(4), 1536–1544. <https://doi.org/10.1152/jn.00630.2003>
- Niell, C. M., Meyer, M. P., & Smith, S. J. (2004). *In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor*. *Nature Neuroscience*, 7(3), 254–260. <https://doi.org/10.1038/nn1191>

- Nikolaou, N., & Meyer, M. P. (2012). *Imaging circuit formation in zebrafish*. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 346–357. <https://doi.org/10.1002/dneu.20874>
- Nikolic, P., Housley, G. D., & Thorne, P. R. (2003). *Expression of the P2X7 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the developing and adult rat cochlea*. *Audiology and Neuro-Otology*, 8(1), 28–37. <https://doi.org/10.1159/000067891>
- Nirthanan, S., & Gwee, M. C. E. (2004). *Three-Finger-Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On*. In *J Pharmacol Sci* (Vol. 94).
- Ó Maoiléidigh, D., & Ricci, A. J. (2019). *A bundle of mechanisms: inner-ear hair-cell mechanotransduction*. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 42, Issue 3, pp. 221–236). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.006>
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J. G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Söllner, C., Duncan, R. N., Boehland, A., & Nicolson, T. (2008). *Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells*. *Journal of Neuroscience*, 28(9), 2110–2118. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5230-07.2008>
- Odstrcil, I. (2018). *Sensing flow when it matters: a behavioral and circuit analysis of mechanosensation in the larval zebrafish*. <http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:42015869>
- Olt, J., Allen, C. E., & Marcotti, W. (2016). *In vivo physiological recording from the lateral line of juvenile zebrafish*. *Journal of Physiology*, 594(19), 5427–5438. <https://doi.org/10.1113/JP271794>
- Oteiza, P., Odstrcil, I., Lauder, G., Portugues, R., & Engert, F. (2017). *A novel mechanism for mechanosensory-based rheotaxis in larval zebrafish*. *Nature*, 547(7664), 445–448. <https://doi.org/10.1038/nature23014>
- Partridge, B. L., & Pitcher, T. J. (1980). *The sensory basis of fish schools: relative roles of lateral line and vision*. *Journal of Comparative Physiology*. In *J. Comp. Physiol* (Vol. 135).
- Pichler, P., & Lagnado, L. (2020). *Motor Behavior Selectively Inhibits Hair Cells Activated by Forward Motion in the Lateral Line of Zebrafish*. *Current Biology*, 30(1), 150-157.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.020>
- Pickles, J. O., & Osborne, M. P. (1984). *Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction*. In *Hearing Research* (Vol. 15).
- Plazas, P. V., & Elgoyheng, A. B. (2021). *The cholinergic lateral line efferent synapse: structural, functional and molecular similarities with those of the cochlea*. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.765083>
- Plazas, P. V., Nicol, X., & Spitzer, N. C. (2013). *Activity-dependent competition regulates motor neuron axon pathfinding via PlexinA3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1524–1529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213048110>
- Pujol-Martí, J., & López-Schier, H. (2013). *Developmental and architectural principles of the lateral-line neural map*. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00047>
- Pujol-Martí, J. S., Baudoin, J. P., Faucherre, A., Kawakami, K., & López-Schier, H. (2010). *Progressive neurogenesis defines lateralis somatotopy*. *Developmental Dynamics*, 239(7), 1919–1930. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22320>
- Pujol-Martí, J., Zecca, A., Baudoin, J. P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., & López-Schier, H. (2012). *Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map*. *Journal of Neuroscience*, 32(9), 2976–2987. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5157-11.2012>
- Quian, F., Wei, G., Gao, Y., Wang, X., Gong, J., Guo, C., Wang, X., Zhang, X., Zhao, J., Wang, C., Xu, M., Hu, Y., Yin, G., Kang, J., Chai, R., Xie, G., & Liu, D. (2022). *Single-cell RNA-sequencing of*

- zebrafish hair cells reveals novel genes potentially involved in hearing loss. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04410-2>
- Quick, M. W., & Lester, R. A. J. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 457–478. <https://doi.org/10.1002/neu.10109>
- Raible, D. W., & Kruse, G. J. (2000). Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 421(2), 189–198. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000529\)421:2<189::AID-CNE5>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000529)421:2<189::AID-CNE5>3.0.CO;2-K)
- Rajan, I., & Cline, H. T. (1998). Glutamate Receptor Activity Is Required for Normal Development of Tectal Cell Dendrites In Vivo.
- Redolfi, N., & Lodovichi, C. (2021). Spontaneous Afferent Activity Carves Olfactory Circuits. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.637536>
- Riley, B. B., & Moorman, S. J. (2000). Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish. In *J Neurobiol* (Vol. 43).
- Romano, S. A., Pérez-Schuster, V., Jouary, A., Boulanger-Weill, J., Candeo, A., Pietri, T., & Sumbre, G. (2017). An integrated calcium imaging processing toolbox for the analysis of neuronal population dynamics. *PLoS Computational Biology*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005526>
- Rosenberg, S. S., & Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004259>
- Rotermund, N., Schulz, K., Hirnet, D., & Lohr, C. (2019). Purinergic signaling in the vertebrate olfactory system. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Ruthazer, E. S., & Cline, H. T. (2004). Insights into activity-dependent map formation from the retinotectal system: a middle-of-the-brain perspective. In *Journal of Neurobiology* (Vol. 59, Issue 1, pp. 134–146). <https://doi.org/10.1002/neu.10344>
- Sadowski. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator.
- Sarrazin, A. F., Nuñez, V. A., Sapède, D., Tassin, V., Damblay-Chaudière, C., & Ghysen, A. (2010). Origin and early development of the posterior lateral line system of zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 30(24), 8234–8244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5137-09.2010>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmitz, F., Kö nigstöfer, A., & Sü dhof, T. C. (2000). RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function signaling requirements. In *Neuron* (Vol. 28).
- Schmitz, Y., Luccarelli, J., Kim, M., Wang, M., & Sulzer, D. (2009). Glutamate controls growth rate and branching of dopaminergic axons. *Journal of Neuroscience*, 29(38), 11973–11981. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2927-09.2009>
- Sears, S. M. S., & Hewett, S. J. (2021). Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 246, Issue 9, pp. 1069–1083). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1535370221989263>

- Sebe, J. Y., Cho, S., Sheets, L., Rutherford, M. A., von Gersdorff, H., & Raible, D. W. (2017). *Ca²⁺-permeable AMPARs mediate glutamatergic transmission and excitotoxic damage at the hair cell ribbon synapse.* *Journal of Neuroscience*, 37(25), 6162–6175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3644-16.2017>
- Sheets, L., He, X. J., Olt, J., Schreck, M., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Zhang, Q., Beirl, A., Nicolson, T., Marcotti, W., Trapani, J. G., & Kindt, K. S. (2017). *Enlargement of ribbons in zebrafish hair cells increases calcium currents but disrupts afferent spontaneous activity and timing of stimulus onset.* *Journal of Neuroscience*, 37(26), 6299–6313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2878-16.2017>
- Sheets, L., Kindt, K. S., & Nicolson, T. (2012). *Presynaptic cav1.3 channels regulate synaptic ribbon size and are required for synaptic maintenance in sensory hair cells.* *Journal of Neuroscience*, 32(48), 17273–17286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3005-12.2012>
- Sheets, L., Trapani, J. G., Mo, W., Obholzer, N., & Nicolson, T. (2011). *Ribeye is required for presynaptic Cav1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells.* *Development*, 138(7), 1309–1319. <https://doi.org/10.1242/dev.059451>
- Siemens, J., Concepcion Lillo, Rachel A. Dumont, Anna Reynolds, David S. Williams, Peter G. Gillespie, & Ulrich Muller. (2004). *Cadherin 23 is a component of the tip link in hair cell stereocilia.* *Nature*, 428(6986), 945–950. <https://doi.org/10.1038/nature02516>
- Singh, A. P., VijayRaghavan, K., & Rodrigues, V. (2010). *Dendritic refinement of an identified neuron in the Drosophila CNS is regulated by neuronal activity and Wnt signaling.* *Development*, 137(8), 1351–1360. <https://doi.org/10.1242/dev.044131>
- Sonntag, M., Englitz, B., Kopp-Scheinpflug, C., & Rübsamen, R. (2008). *Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: An in vivo study in mice.* *Journal of Neuroscience*, 29(30), 9510–9520. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1377-09.2009>
- Sørensen, J. B., Matti, U., Wei, S.-H., Nehring, R. B., Voets, T., Ashery, U., Binz, T., Neher, E., & Rettig, J. (2002). *The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis.* (Vol. 99). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.251673298
- Spira, M. E., Oren, R., Dormann, A., Ilouz, N., & Lev, S. (2001). *Calcium, protease activation, and cytoskeleton remodeling underlie growth cone formation and neuronal regeneration.* P1: FJT Cellular and Molecular Neurobiology. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 21, Issue 6).
- Spitzer. (1994). *Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurons. signaling systems for differentiation.*
- Spitzer, N. C. (2012). *Activity-dependent neurotransmitter respecification.* In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 2, pp. 94–106). <https://doi.org/10.1038/nrn3154>
- Srivastava, S. (2016). *Emerging therapeutic roles for NAD⁺ metabolism in mitochondrial and age-related disorders.* *Clinical and Translational Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0104-7>
- Steiner, A. B., Kim, T., Cabot, V., & Hudspeth, A. J. (2014). *Dynamic gene expression by putative hair-cell progenitors during regeneration in the zebrafish lateral line.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.1318692111>
- Suli, A., Pujol, R., Cunningham, D. E., Hailey, D. W., Prendergast, A., Rubel, E. W., & Raible, D. W. (2016). *Innervation regulates synaptic ribbons in lateral line mechanosensory hair cells.* *Journal of Cell Science*, 129(11), 2250–2260. <https://doi.org/10.1242/jcs.182592>

- Suli, A., Watson, G. M., Rubel, E. W., & Raible, D. W. (2012). *Rheotaxis in larval zebrafish is mediated by lateral line mechanosensory hair cells*. PLoS ONE, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029727>
- Swandulla, D., & Misgeld, U. (1990). *Development of spontaneous synaptic activity in a hypothalamic network grown in culture*.
- Szebenyi, G., Dent, E. W., Callaway, J. L., Seys, C., Lueth, H., & Kalil, K. (2001). *Fibroblast Growth Factor-2 Promotes Axon Branching of Cortical Neurons by Influencing Morphology and Behavior of the Primary Growth Cone*.
- Takei, K., Shin, R., Inoue, T., Kato, K., & Mikoshiba, K. (1998). *Regulation of nerve growth mediated by Inositol*. www.sciencernag.org
- Tay, T. L., Ronneberger, O., Ryu, S., Nitschke, R., & Driever, W. (2011). *Comprehensive catecholaminergic projectome analysis reveals single-neuron integration of zebrafish ascending and descending dopaminergic systems*. Nature Communications, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1171>
- Torborg, C. L., & Feller, M. B. (2005). *Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections*. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 76, Issue 4, pp. 213–235). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.002>
- Toro, C., Trapani, J. G., Pacentine, I., Maeda, R., Sheets, L., Mo, W., & Nicolson, T. (2015). *Dopamine modulates the activity of sensory hair cells*. *Journal of Neuroscience*, 35(50), 16494–16503. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1691-15.2015>
- Trapani, J. G., & Nicolson, T. (2010). *Physiological recordings from zebrafish lateral line hair cells and afferent neurons*. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 100, Issue C). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384892-5.00008-6>
- Trapani, J. G., & Nicolson, T. (2011). *Mechanism of spontaneous activity in afferent neurons of the zebrafish lateral-line organ*. *Journal of Neuroscience*, 31(5), 1614–1623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3369-10.2011>
- Tripodi, M., Evers, J. F., Mauss, A., Bate, M., & Landgraf, M. (2008). *Structural homeostasis: Compensatory adjustments of dendritic arbor geometry in response to variations of synaptic input*. *PLoS Biology*, 6(10), 2172–2187. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060260>
- 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>
- Tritsch, N. X., Yi, E., Gale, J. E., Glowatzki, E., & Bergles, D. E. (2007). *The origin of spontaneous activity in the developing auditory system*. *Nature*, 450(7166), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature06233>
- Valera, G., Markov, D. A., Bijari, K., Randlett, O., Asgharsharghi, A., Baudoin, J. P., Ascoli, G. A., Portugues, R., & López-Schier, H. (2021). *A neuronal blueprint for directional mechanosensation in larval zebrafish*. *Current Biology*, 31(7), 1463–1475.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.045>
- Van Der Walt, S., Colbert, S. C., & Varoquaux, G. (2011). *The NumPy array: a structure for efficient numerical computation*. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2011.37>
- Van Netten, S. M. (2006). *Hydrodynamic detection by cupulae in a lateral line canal: Functional relations between physics and physiology*. *Biological Cybernetics*, 94(1), 67–85. <https://doi.org/10.1007/s00422-005-0032-x>
- van Netten, S. M., & McHenry, M. J. (2013). *The biophysics of the fish lateral line*. (pp. 99–119). https://doi.org/10.1007/2506_2013_14

- Van Trump, W. J., & McHenry, M. J. (2008). *The morphology and mechanical sensitivity of lateral line receptors in zebrafish larvae (Danio rerio)*. *Journal of Experimental Biology*, 211(13), 2105–2115. <https://doi.org/10.1242/jeb.016204>
- van van Hugte, E. J. H., Schubert, D., & Nadif Kasri, N. (2023). *Excitatory/inhibitory balance in epilepsies and neurodevelopmental disorders: Depolarizing γ -aminobutyric acid as a common mechanism*. In *Epilepsia* (Vol. 64, Issue 8, pp. 1975–1990). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/epi.17651>
- Vlajkovic, S. M., & Thorne, P. R. (2022). *Purinergic signaling in the cochlea*. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232314874>
- Voufo, C., Chen, A. Q., Smith, B. E., Yan, R., Feller, M. B., & Tiriac, A. (2023). *Circuit mechanisms underlying embryonic retinal waves*. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.81983>
- Wang, H. C., & Bergles, D. E. (2015). *Spontaneous activity in the developing auditory system*. *Cell and Tissue Research*, 361(1), 65–75. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2007-5>
- Watt, S. D., Gu, X., Smith, R. D., & Spitzer, N. C. (2000). *Specific frequencies of spontaneous Ca^{2+} transients upregulate GAD 67 transcripts in embryonic spinal neurons*. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 16(4), 376–387. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0871>
- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). *Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex the unique proliferative capacity of the embryonic cortex*. In *Neuron* (Vol. 43). <http://www.neuron.org/cgi/content/>
- Weisstaub, N., Vetter, D. E., Belén Elgoyhen, A., & Katz, E. (2002). *The a9a10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations*. www.elsevier.com/locate/heares
- Westerfield, M. (1995). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 3rd Edition, University of Oregon Press, Eugene.
- Westerfield, M. (2000). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene.
- Wong, H. T. C., Zhang, Q., Beirl, A. J., Petralia, R. S., Wang, Y. X., & Kindt, K. S. (2019). *Synaptic mitochondria regulate hair cell synapse size and function*. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48914>
- Wong, R. O. L., & Ghosh, A. (2002). *Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning*. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(10), 803–812. <https://doi.org/10.1038/nrn941>
- Xiao, T., & Baier, H. (2007). *Lamina-specific axonal projections in the zebrafish tectum require the type IV collagen Dragnet*. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1529–1537. <https://doi.org/10.1038/nn2002>
- Xiong, X., Luo, S., Wu, B., & Wang, J. (2017). *Comparative developmental toxicity and stress protein responses of dimethyl sulfoxide to rare minnow and zebrafish embryos/larvae*. In *Zebrafish* (Vol. 14, Issue 1, pp. 60–68). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1287>
- Yamamoto, T., Kakehata, S., Yamada, T., Saito, T., Saito, H., & Akaike, N. (1997). *Effects of potassium channel blockers on the acetylcholine-induced currents in dissociated outer hair cells of guinea pig cochlea*.
- Yan, D., Zhu, Y., Walsh, T., Xie, D., Yuan, H., Sirmaci, A., Fujikawa, T., Wong, A. C. Y., Loh, T. L., Du, L., Grati, M., Vlajkovic, S. M., Blanton, S., Ryan, A. F., Chen, Z. Y., Thorne, P. R., Kachar, B., Tekin, M., Zhao, H. B., ... Liu, X. Z. (2013). *Mutation of the ATP-gated P2X2 receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 2228–2233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222285110>

- Yao, Q., Desmidt, A. A., Tekin, M., Liu, X., & Lu, Z. (2016). *Hearing assessment in zebrafish during the first week postfertilization*. *Zebrafish*, 13(2), 79–86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1166>
- Yao, S. T., Barden, J. A., Finkelstein, D. I., Bennett, M. R., & Lawrence, A. J. (2000). *Comparative study on the distribution patterns of P2X 1-P2X 6 receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (Callithrix jacchus): association with catecholamine cell groups*. In *J. Comp. Neurol* (Vol. 427).
- Yu, C. R., Power, J., Barnea, G., O'donnell, S., Brown, H. E. V., Osborne, J., Axel, R., & Gogos, J. A. (2004). *Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map*. In *Neuron* (Vol. 42).
- Yu, W. M., & Goodrich, L. V. (2014). *Morphological and physiological development of auditory synapses*. In *Hearing Research* (Vol. 311, pp. 3–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2014.01.007>
- Zeddies, D. G., & Fay, R. R. (2005). *Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones*. *Journal of Experimental Biology*, 208(7), 1363–1372. <https://doi.org/10.1242/jeb.01534>
- Zhang, L. I., Bao, S., & Merzenich, M. M. (2002). *Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period*. <https://www.pnas.org>
- Zhang, Q., & Kindt, K. S. (2022). *Using light-sheet microscopy to study spontaneous activity in the developing lateral line system*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.819612>
- Zhang, Q., Li, S., Wong, H. T. C., He, X. J., Beirl, A., Petralia, R. S., Wang, Y. X., & Kindt, K. S. (2018). *Synaptically silent sensory hair cells in zebrafish are recruited after damage*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03806-8>
- Zhang-Hooks, Y. X., Agarwal, A., Mishina, M., & Bergles, D. E. (2016). NMDA Receptors Enhance *Spontaneous activity and promote neuronal survival in the developing cochlea*. *Neuron*, 89(2), 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.016>
- Zheng, J. Q., & Poo, M. M. (2007). *Calcium signaling in neuronal motility*. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 23, pp. 375–404). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123221>
- Zito, & Svoboda. (2002). *Minireview activity-dependent synaptogenesis in the adult mammalian cortex*.
- Zottoli, S. J., & Van Horne, C. (1983). *Posterior lateral line afferent and efferent pathways within the central nervous system of the goldfish with special reference to the Mauthner cell*. *Journal of Comparative Neurology*, 219(1), 100–111. <https://doi.org/10.1002/cne.902190110>