

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Rol de la integración multisensorial en la codificación de estímulos de peligro y la modulación de comportamientos de escape en peces cebra

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

Lic. Nicolás Martorell

Directora de Tesis: Dra. Violeta Medan
Consejera de Estudios: Dra. Ana Amador

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Sistemas de Procesamiento e Integración Neuronal (SPIN), Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE - UBA/CONICET)

Buenos Aires, Argentina, 2025

Resumen

Título: Rol de la Integración Multisensorial en la Codificación de Estímulos de Peligro y la Modulación de Comportamientos de Escape en Peces Cebra

La integración multisensorial permite a los animales combinar señales de diferentes modalidades sensoriales para guiar el comportamiento. En vertebrados, el Tectum —o su homólogo en mamíferos, el Colículo Superior— es un centro donde convergen las señales visuales con las de otras modalidades sensoriales. Aunque el procesamiento visual en el Tectum del pez cebra se ha estudiado en profundidad, aún no está claro si esta estructura integra información auditiva y, en tal caso, cómo la integración impacta en el comportamiento. En este estudio, investigamos la integración audiovisual en larvas de pez cebra y demostramos que no sólo el Tectum procesa señales auditivas que señalizan un peligro inminente, sino que la convergencia de señales auditivas y visuales produce un marcado incremento multisensorial tanto a nivel de la actividad de neuronas individuales como de la población.

Mediante imágenes de calcio *in vivo* en larvas que expresan GCaMP6f bajo un promotor panneuronal, encontramos que estímulos auditivos abruptos reclutan las capas profundas del neuropilo tectal y neuronas de la capa periventricular. A su vez, observamos que la mejora en la respuesta de estas áreas a estímulos multisensoriales está inversamente relacionada con la efectividad de los componentes unisensoriales, una marca característica de la integración multisensorial. Además, estas mejoras multisensoriales resultaron estar fuertemente asociadas al reclutamiento de neuronas del cerebro posterior cuya actividad muestra una alta correlación con eventos motores.

Al analizar la conducta de escape de larvas de pez cebra frente a los mismos estímulos auditivos y visuales observamos resultados concordantes: los estímulos audiovisuales incrementaron significativamente la probabilidad de respuestas de escape respecto al estímulo unimodal más efectivo, y tal como observamos en el Tectum, las mejoras multisensoriales fueron proporcionalmente más importantes cuando los estímulos combinados eran más débiles. Se observó, asimismo, que las señales auditivas y visuales pueden sesgar la selección de distintos comportamientos de escape dependiendo de su saliencia relativa.

Estos hallazgos establecen al Tectum del pez cebra como un centro de integración multisensorial, y sugieren su posible rol en la toma de decisiones ante amenazas. Al vincular la actividad tectal con la actividad pre-motora descendente y la selección de comportamientos observables, nuestro trabajo propone que la convergencia de múltiples entradas sensoriales en el Tectum podría promover acciones evasivas más efectivas y flexibles.

Palabras clave: Integración Multisensorial, Peces Cebra, Codificación Neuronal, Respuesta de Escape, Selección de Comportamientos

Abstract

Title: Role of Multisensory Integration in the Encoding of Danger Stimuli and the Modulation of Escape Behaviors in Zebrafish

Multisensory integration allows animals to combine signals from different sensory modalities to guide behavior. In vertebrates, the Tectum—or its mammalian counterpart, the Superior Colliculus—is a key center where visual signals converge with those from other sensory modalities. Although visual processing in the Zebrafish Tectum has been extensively studied, it remains unclear whether this structure integrates auditory information and, if so, how such integration impacts behavior. In this study, we investigate audiovisual integration in zebrafish larvae and demonstrate that not only does the Tectum process auditory signals that indicate imminent danger, but the convergence of auditory and visual signals also produces a marked multisensory enhancement at both the individual and the populational neuron level.

Using in vivo calcium imaging in larvae expressing GCaMP6f under a pan-neuronal promoter, we found that abrupt auditory stimuli recruit the deep layers of the tectal neuropil and neurons in the periventricular layer. Furthermore, we observed that the enhancement of responses in these areas to multisensory stimuli is inversely related to the effectiveness of the unisensory components, a hallmark of multisensory integration. Additionally, these multisensory enhancements were strongly associated with the recruitment of hindbrain neurons whose activity is highly correlated with motor events.

By analyzing the escape behavior of zebrafish larvae in response to the same auditory and visual stimuli, we observed consistent results: audiovisual stimuli significantly increased the probability of escape responses compared to the most effective unimodal stimulus. As seen in the Tectum, multisensory enhancements were proportionally more pronounced when the combined stimuli were weaker. Furthermore, auditory and visual signals were found to bias the selection of different escape behaviors depending on their relative salience.

These findings establish the Zebrafish Tectum as a center for multisensory integration and suggest its possible role in decision-making when facing threats. By linking tectal and descending premotor activity with observable behavior selection, our study suggests that the convergence of multiple sensory inputs in the Tectum may promote more effective and flexible evasive reactions.

Keywords: Multisensory Integration, Zebrafish, Neural Encoding, Escape Response, Behavior Selection

ÍNDICE

ÍNDICE **3**
AGRADECIMIENTOS **6**
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL **8**
1.1 La importancia de la toma de decisiones en animales 9
1.2 Fundamentos teóricos de la integración multisensorial 10
1.3 Efectos de la integración multisensorial en el comportamiento 12
1.4 El Tectum/Colículo Superior y su rol en la integración sensorial 14
1.5 El pez cebra como animal modelo en neurociencia 16
1.6 Respuestas evasivas del pez cebra frente a estímulos aversivos 18
1.7 Sistemas sensoriales y sistema nervioso del pez cebra 21
1.8 Estructura y función del Tectum en el pez cebra 22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **25**
CAPÍTULO 2: MÉTODOS GENERALES **26**
2.1 Cuidado y crianza de peces cebra 27
2.2 Experimentos realizados y nomenclatura 28
2.3 Diseño y combinación de estímulos visuales y auditivos 29
2.4 Registro del comportamiento y detección de respuestas evasivas 33
2.5 Cuantificación de la integración multisensorial 36
2.6 Técnicas de microscopía para el registro de la actividad neuronal 38
2.7 Análisis estadístico 42
2.8 Inteligencia artificial como copiloto de análisis 43
CAPÍTULO 3: DESARROLLO DE UN PARADIGMA COMPORTAMENTAL PARA EVALUAR LA RESPUESTA DE ESCAPE EN PECES CEBRA **45**
3.1 Calibración y selección de estímulos visuales 45
3.2 Calibración y selección de estímulos auditivos 50
3.3 Desarrollo de un algoritmo de tracking basado en reglas 53
3.4 Entrenamiento de un algoritmo de Deep Learning para el tracking de peces cebra 55
3.5 Detección de comportamientos evasivos identificables 56
3.6 Efecto del desarrollo en la respuesta a estímulos aversivos 60
3.7 Efecto de la habituación en la respuesta ante estímulos aversivos 61
CAPÍTULO 4: INTEGRACIÓN MULTISENSORIAL EN COMPORTAMIENTOS EVASIVOS **63**
4.1 Integración multisensorial en la probabilidad de escape en larvas de pez cebra 64
4.2 Integración multisensorial en la selección de comportamientos evasivos 67
CAPÍTULO 5: DESARROLLO DE UN PARADIGMA DE REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL **71**
5.1 Selección y automatización de la presentación de estímulos visuales y auditivos 72
5.2 Calibración de las condiciones de registro en el microscopio confocal 73
5.3 Segmentación semiautomática de regiones de interés 74

5.4 Alineación volumétrica con atlas cerebral estándar..... 75
5.5 Procesamiento de la actividad neuronal..... 77
5.6 Registro del comportamiento durante experimentos de imaging..... 79
CAPÍTULO 6: EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN UNISENSORIAL EN EL TECTUM..... 83
6.1 Filtrado y selección de experimentos..... 84
6.2 La respuesta del Tectum Periventricular a estímulos auditivos..... 85
6.3 La respuesta del Neuropilo Tectal a estímulos auditivos..... 89
6.4 La respuesta del Tectum Periventricular a estímulos visuales..... 92
6.5 La respuesta del Neuropilo Tectal a estímulos visuales..... 94
CAPÍTULO 7: CARACTERIZACIÓN DE LA CODIFICACIÓN MULTISENSORIAL EN EL TECTUM DE PECES CEBRA..... 97
7.1 Mejora multisensorial poblacional en el Tectum Periventricular..... 98
7.2 Mejora multisensorial poblacional en el Neuropilo Tectal..... 100
7.3 Efectividad inversa en el Tectum Periventricular..... 102
7.4 Efectividad inversa en el Neuropilo Tectal..... 105
7.5 Mejora multisensorial en neuronas con inputs audiovisuales..... 107
7.6 Variabilidad en la representación multisensorial..... 110
CAPÍTULO 8: NEURONAS ASOCIADAS AL MOVIMIENTO EN EL ROMBENCÉFALO..... 114
8.1 Asociación entre integración tectal y actividad en el Rombencéfalo..... 115
8.2 Patrones de actividad unisensorial en el Rombencéfalo..... 118
8.3 Patrón de respuesta multisensorial en el Rombencéfalo..... 121
CAPÍTULO 9: INTEGRACIÓN MULTISENSORIAL EN EL CEREBRO DE PECES CEBRA CON LA COLA LIBERADA..... 123
9.1 Experimentos en peces con la cola liberada..... 124
9.2 Calibración y selección de estímulos visuales y auditivos..... 125
9.3 Registro del comportamiento de peces cebra con la cola libre..... 127
9.4 Respuestas a estímulos aversivos en peces con la cola libre..... 128
9.5 Respuestas unisensoriales y multisensoriales en el Tectum..... 131
9.6 Identificación de ensambles neuronales en el Tectum..... 134
9.7 Integración multisensorial a nivel de ensambles en el Tectum..... 138
9.8 Asociación entre integración tectal y comportamientos evasivos..... 141
9.9 Integración multisensorial en otras áreas del cerebro..... 143
CAPÍTULO 10: DISCUSIÓN..... 145
10.1 Desarrollo de técnicas experimentales y herramientas de análisis..... 146
10.2 Efectos de la integración multisensorial sobre la respuesta de escape..... 147
10.3 Codificación auditiva en el Tectum..... 148
10.4 Integración multisensorial en el Tectum..... 149
10.5 Una asociación entre la integración tectal y el comportamiento..... 151
BIBLIOGRAFÍA..... 154

AGRADECIMIENTOS

A Violeta Medan, por la paciencia y las charlas de horas (o días) mirando gráficos hasta que perdieran sentido. Por darme la libertad de recorrer caminos sinuosos en las preguntas, los experimentos y los análisis, aún sin saber a dónde nos llevarían. Por heredarme un escepticismo sano que me ayuda a desconfiar de cada resultado, propio y ajeno. Por darme el espacio y el tiempo para aprender de los (muy variados) temas que me interesan. Por enseñarme qué quiere decir hacer ciencia. Por confiar en mí.

A Lidia Szczupak, por su criterio agudo sobre los procesos biológicos, que más de una vez me ayudó a salir un rato de mi cabeza, que mira más los números y el código que las células. Por nunca abandonar la pasión y la curiosidad por esas grandes preguntas que nos conducen a querer hacer ciencia. Y por siempre estar atenta a los colores de las figuras.

A Valentín Agulló, por pensar conmigo cuando los análisis se ponían muy complejos y ya no les encontraba ni pies ni cabeza. Por dibujar juntos en la pizarra hasta convencernos mutuamente de que nuestras conclusiones tenían sentido (o no). Por nunca quejarse de que ponga música de fondo sin usar auriculares.

A Martina Radice, por ser mi compañera a través de más de cinco largos años de doctorado. Por todas las charlas y por las miradas cómplices que me hicieron sentir acompañado.

A Valentín Azar, Milagros Morey, Juan Adriel Croas, Nicolás Lucero, Graciela Kerney, Alejandro Cámera, Mariano Belluscio, Santiago Merlo, Marcos Coletti, Camila Polotto y todos aquellos que construyeron con sus observaciones y su sentido del humor un ambiente muy cómodo y seguro para trabajar. Por la comida rica compartida y por las cenas hasta la madrugada. Por escucharme hasta el final de mis seminarios de medio centenar de diapositivas.

A Emiliano Marachlian, por recibirme en París y acompañarme en una ciudad desconocida. Por su inagotable generosidad con el tiempo y energía que dedicó a ayudarme con experimentos que sin él hubieran sido imposibles. A Germán Sumbre, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí con sus equipos y con mis hipótesis.

A Diego Topsakalian, por ser mi compañero de laboratorio cuando estaba muy lejos de casa. Por pasar la semana juntos mientras analizábamos datos y después seguir viéndonos cada fin de semana para recorrer la ciudad. A toda la gente hermosa que conocí en la Casa Argentina de París. Sus nombres son tantos que no entran en los agradecimientos de esta tesis, pero sus risas, sus charlas, sus abrazos y su contención convirtieron un momento de crisis y soledad en uno de los viajes más lindos de mi vida.

A Carla Argañaraz y a Rocío Foltrán, por ser mi red de contención y mis confidentes a tan solo un par de puertas de distancia. Por estar siempre, siempre. Y a Agus, por ser parte de los amigos que hicimos en el camino.

A Benja, Lucha, Juanma, Juli, Santi, Lucio y Vale por ser, más que un equipo de trabajo, un grupo de amigues maravilloso. Por recordarme cuáles son todas esas buenas razones para hacer ciencia, en los momentos en los que me olvidaba.

A Tere, por acompañarme y hacer que una época estresante y difícil se sienta tan fácil.

A Pau, Bren, Ian, Flor, Julie, Livi, Adri, Chofi y muchos más, por ser mi familia elegida y hacerme sentir tan querido y tan afortunado.

Al Abu y a la Abi por ser un ejemplo a seguir. A la Babe por risas, charlas y abrazos. A Ruth, Fernando y Cami, por ser incondicionales. Porque sin ellos no hubiera llegado hasta acá.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 La importancia de la toma de decisiones en animales

Nuestra supervivencia depende de que seamos capaces de cumplir con ciertas necesidades y objetivos básicos, como alimentarnos, encontrar refugio, reproducirnos y evitar peligros que pongan en riesgo nuestra integridad. Esto requiere que los individuos naveguen ambientes complejos y cambiantes, interpretando señales cuya valencia es muchas veces ambigua. Una sombra entre los árboles puede representar la posibilidad de alimento en el caso de que se trate de una presa, o puede resultar en un daño temporal o permanente si la sombra se trata de un predador. En este sentido, es crucial que los animales puedan acumular y poner en relación toda la información a la que tengan acceso para disminuir la incertidumbre sobre el significado de las señales que reciben. De esta manera, pueden construir un modelo de su entorno y evaluar el riesgo (o el beneficio) estimado del contexto en el que se encuentran momento a momento.

La información del entorno ingresa al cerebro a través de los sistemas sensoriales. Distintos sentidos proveen información cualitativamente diferente al animal acerca de su ambiente. Por ejemplo, el sistema visual de muchos organismos permite percibir objetos tanto cercanos como distantes aunque estos no estén moviéndose apreciablemente, pero requiere que estos objetos estén contenidos dentro del campo visual. En cambio, el sistema auditivo está limitado a proveer información sobre objetos y eventos que produzcan vibraciones mecánicas transmitidas a través de algún medio hasta alcanzar al animal. Esto limita la distancia, la intensidad y la frecuencia de los movimientos que este sentido es capaz de percibir. Sin embargo, a diferencia del sistema visual, el sonido puede ser percibido desde cualquier dirección. Esto pone en evidencia que un animal debe integrar la información de sus diferentes sistemas sensoriales para lograr una apreciación lo más completa posible de su entorno y, de esta manera, tomar las decisiones que resulten más adaptativas para su supervivencia y proliferación.

Usualmente, los animales cuentan con un repertorio comportamental diverso que les permite adaptarse a distintas situaciones. En contextos de riesgo, un organismo debe considerar la posibilidad de encontrarse frente a un peligro inminente y tener que ejecutar una respuesta evasiva efectiva. Por otro lado, dado que los comportamientos evasivos muchas veces involucran un gasto energético no despreciable e interrumpen las actividades que se estuvieran realizando, es importante suprimir las respuestas evasivas innecesarias (las falsas alarmas). Por ejemplo, un animal puede optar por quedarse inmóvil para evitar ser detectado, huir rápidamente al detectar peligro, mimetizarse con su ambiente, o recurrir a estrategias como la autotomía o fingir su muerte, dependiendo del tipo y cercanía de la amenaza (Edmunds, 1974).

En este sentido, la toma de decisiones no es, casi nunca, la búsqueda de un resultado binario (por ejemplo, escapar o no escapar) sino que involucra la selección de comportamientos específicos que se adecúen a las necesidades impuestas por el contexto, así como la selección

de características que pueden variar de manera continua, como la velocidad o la dirección de un escape (Evans et al., 2019).

Puede pensarse, entonces, al proceso de toma de decisiones como una transformación sénsoro-motora. El cerebro parte de un conjunto de señales externas e internas, las integra y aplica una serie de transformaciones sobre esta información que resulta en un conjunto de comandos motores específicos. Una parte central del trabajo actual realizado en el campo de la neurociencia consiste en intentar comprender estas transformaciones: qué estructuras cerebrales están involucradas y cuáles son los mecanismos, tanto a nivel de neurona única como a nivel de poblaciones neuronales y estructuras cerebrales, que permiten la precisión, variabilidad y adaptabilidad observada en la toma de decisiones que sucede en contextos naturales (Gallivan et al., 2018; Huda et al., 2019; Krapp, 2010). Este es el paradigma general de trabajo en el que se enmarca esta tesis.

El trabajo realizado es un eslabón en una cadena de preguntas, respuestas y más preguntas que buscan desentrañar cómo el cerebro transforma las señales sensoriales en una representación coherente del mundo, y cómo utiliza, a su vez, esta representación para tomar decisiones que pueden significar la diferencia entre la vida y la muerte.

1.2 Fundamentos teóricos de la integración multisensorial

Las señales captadas por sistemas sensoriales distintos, entonces, pueden variar enormemente en características como su dinámica temporal, su direccionalidad espacial o su intensidad. Esto es así incluso cuando estas señales provienen físicamente del mismo objeto u evento. Como un ejemplo relevante para este trabajo, podemos considerar la percepción que tiene un pez de un ave que se encuentra en proceso de zambullirse, posiblemente con un objetivo de predación. Es probable que la primera señal asimilada por el pez sea la imagen del ave, distorsionada por la superficie del agua, cuyo tamaño relativo aumenta con el tiempo a medida que el animal se acerca. Esto, en principio, no vendría asociado a la información procesada por ninguno de los otros sistemas sensoriales del pez. No es hasta que el ave rompe la superficie del agua que la audición se pone en juego, con un estímulo abrupto y explosivo que poco tiene que ver, en términos cualitativos, con la imagen que podía ser apreciada momentos antes, si bien la causa última de ambas señales es la misma (Video 1). Sin embargo, es crucial que el pez sea capaz de integrar ambas fuentes de información para comprender el contexto completo y elegir una estrategia comportamental adecuada. Podría ocurrir que la señal auditiva no contenga suficiente información acerca de la dirección del evento como para que el animal defina una vía de escape óptima, mientras que la señal visual podría ser mucho más precisa en este aspecto. Por lo tanto, asociarla con la intensidad y urgencia del sonido percibido permitiría definir la trayectoria de evasión con mayor certeza y efectividad.

El proceso por el cual el cerebro combina estas señales provenientes de distintos sentidos y así construye un percepto coherente del mundo se denomina integración multisensorial. El

ejemplo anterior deja en evidencia que este proceso es especialmente relevante cuando la información proveniente de un único sentido es insuficiente para determinar el comportamiento. En otras palabras, la integración multisensorial permite desambiguar señales poco informativas, o poco *salientes*, poniéndolas en relación y extrayendo conclusiones que no serían alcanzables partiendo de ninguno de los componentes unisensoriales de manera aislada.

Un ejemplo clásico de este fenómeno es el denominado "efecto fiesta": los seres humanos somos capaces de centrar nuestra atención en una sola conversación dentro de un ambiente ruidoso, asociando las señales visuales (como los movimientos labiales u otras señales no verbales) con las auditivas, que no resultan suficientes por sí solas para decodificar las palabras enunciadas por el hablante (Cherry, 1953). La integración multisensorial optimiza la percepción de estos estímulos ambiguos, mientras que este proceso se vuelve redundante cuando las claves son más salientes (por ejemplo, cuando estamos conversando en un ambiente silencioso). A este concepto fundacional de la integración multisensorial se lo conoce como *efectividad inversa*: la relevancia de integrar señales está inversamente relacionada con la efectividad de esas señales para transmitir información y evocar comportamientos por sí solas.

Para explicar estos fenómenos perceptuales y comportamentales, es necesario entender las bases neuronales de los mismos. Meredith y Stein realizaron los primeros experimentos que estudiaron la integración multisensorial desde esta perspectiva (Meredith & Stein, 1983, 1986). En estudios pioneros en gatos, a los que presentaron estímulos visuales y auditivos de distinta índole mientras registraban actividad neuronal en el Colículo Superior (CS) usando técnicas de electrofisiología, encontraron neuronas que responden a más de una modalidad sensorial. En estos trabajos, se encontró que las neuronas del CS muchas veces mostraban un aumento en su respuesta electrofisiológica frente a la combinación de dos estímulos, respecto a la respuesta registrada para el componente unisensorial más efectivo. Estos aumentos, sin embargo, no resultaban homogéneos para todas las neuronas, sino que podían ser clasificados en mejoras *sublineales, lineales* y *supralineales*. Esta clasificación apunta a comparar la respuesta multisensorial de una neurona contra la suma lineal de las respuestas unisensoriales.

Es útil explicar este punto con un ejemplo numérico: si una neurona dispara 5 potenciales de acción en respuesta a un estímulo auditivo y 7 potenciales de acción en respuesta a un estímulo visual, una mejora multisensorial *lineal* resultaría en 12 potenciales de acción frente a la presentación combinada de ambos componentes. En cambio, si la respuesta multisensorial observada fuese de 10 potenciales de acción, estaríamos hablando de una mejora *sublineal*, mientras que una respuesta de 15 potenciales de acción sería un ejemplo de una mejora *supralineal*. Todos estos tipos de mejoras multisensoriales fueron observados en distintas neuronas del CS de gato, así como también algunas unidades presentaron *supresión multisensorial*, donde la respuesta a estímulos combinados fue menor que la de los componentes unisensoriales.

De estos experimentos, se destilaron tres principios generales de la integración multisensorial, uno de los cuales es el principio de efectividad inversa (Stein & Meredith, 1993). En este caso, la mejora multisensorial producto de la integración se mide, operativamente, como un aumento en la frecuencia de disparo de ciertas neuronas cuando ambos estímulos son presentados al mismo tiempo, en comparación a su frecuencia de disparo durante los estímulos unisensoriales. La efectividad inversa, en este contexto, se evidencia como un mayor aumento en esta frecuencia de disparo cuando los estímulos que se combinan son menos efectivos (la frecuencia evocada por cada uno de los componentes individuales es menor).

Los otros dos principios que se desprenden de estos estudios refieren a la coordinación espacial y temporal de los componentes sensoriales. Meredith y Stein encontraron que el efecto de la integración multisensorial era mayor cuando los estímulos presentados coincidían en el tiempo, es decir, ambas señales llegaban a las neuronas de interés en una misma ventana temporal (Meredith et al., 1987). A su vez, el efecto de la integración también aumentaba cuando los estímulos presentados coincidían espacialmente, es decir, cuando la dirección de la cual provenían las señales era similar (Meredith & Stein, 1985). Esto último, sin embargo, requiere que ambos estímulos contengan información direccional detectable por el individuo. Dicho esto, es evidente por qué la aplicación de estos dos mecanismos podría ser adaptativa para el animal. A su vez, así como estímulos coincidentes pueden evocar una mejora multisensorial (especialmente en casos de baja saliencia), estímulos incoherentes o irrelevantes pueden evocar supresión multisensorial, en donde la integración de las señales gatilla la inhibición de la respuesta (Meredith et al., 1987; Meredith & Stein, 1985). Dada la necesidad de ligar señales distintas al mismo evento, es vital que la integración multisensorial incorpore información de la coincidencia temporo-espacial de estas señales para asociarlas al mismo objeto o diferenciarlas según corresponda.

1.3 Efectos de la integración multisensorial en el comportamiento

Si bien los principios de la integración multisensorial describen el efecto de combinar estímulos sobre la actividad de neuronas individuales, cabe preguntarse cuál es la consecuencia funcional de la integración multisensorial en la determinación de respuestas comportamentales. Usualmente, se piensa al proceso neuronal de integración como la llegada sincrónica de dos o más señales que son procesadas por neuronas individuales (Stein & Stanford, 2008). Una neurona puede conceptualizarse, de manera simplificada, como una operación umbral sobre las entradas, o *inputs*: solo si la suma de los inputs (es decir, la despolarización alcanzada por la conjunción de todas las señales que conviven témporo-espacialmente en la neurona en un momento determinado) alcanza un cierto valor umbral, se producirá un potencial de acción y esa señal será propagada a los elementos que se encuentren río abajo de esa unidad. En este sentido, la neurona impone una operación no lineal sobre esta suma de inputs. Esto es relevante porque permite que el efecto de integrar señales co-ocurrentes sea cualitativamente distinto a la simple suma de sus magnitudes. Específicamente, una neurona puede disparar un potencial de acción frente a la presentación

simultánea de dos estímulos que por sí solos no evocarían ningún tipo de respuesta (Allman & Meredith, 2007; Otero-Coronel et al., 2024). Asimismo, una neurona puede alcanzar más rápidamente un umbral, disparando un potencial de acción en menos tiempo del que hubiese tomado en cualquiera de los casos unisensoriales (Otero-Coronel et al., 2024; Rowland & Stein, 2007).

En un contexto comportamental, esto se traduce en dos parámetros que dependen de la integración multisensorial. Por un lado, la probabilidad de ejecutar una respuesta comportamental aumenta cuando dos estímulos son presentados a la vez, respecto a la presentación individual de cualquiera de los dos componentes (Martorell & Medan, 2021; Stein & Stanford, 2008). Por otro lado, el mecanismo neurofisiológico de integración multisensorial se traduce en una reducción del tiempo de reacción frente a estímulos combinados, respecto a su presentación por separado. Esto se ha estudiado en diversos modelos animales (Gleiss & Kayser, 2012; Lanz et al., 2013; Martorell & Medan, 2021) y también se ha encontrado en humanos, donde la combinación de distintas señales sensoriales reduce marcadamente el tiempo que transcurre entre la recepción de las señales y la respuesta motora seleccionada (Hershenson, 1962).

Cuando se habla de que la integración multisensorial produce “mejoras” en el comportamiento, entonces, se hace referencia a parámetros como estos. Un aumento en la probabilidad de respuesta, así como una reducción en el tiempo de respuesta, pueden ser ventajas decisivas en contextos de peligro, donde una diferencia de milisegundos en la ejecución de una respuesta evasiva, por ejemplo, puede determinar la sobrevida del animal.

Nuestro laboratorio ha explorado estas mejoras comportamentales en situaciones de riesgo con detalle. Nuestro trabajo previo en peces dorados (Martorell & Medan, 2021) demostró que la combinación de estímulos de peligro visuales y auditivos es efectivamente capaz de aumentar la probabilidad de ejecutar una respuesta de escape, y de reducir la latencia, es decir, el tiempo transcurrido entre la estimulación y la respuesta evasiva. Esta mejora multisensorial es dependiente de la coordinación temporal entre ambos estímulos y es mayor cuando la saliencia de los componentes unisensoriales es baja, corroborando los principios de integración multisensorial discutidos en la sección anterior. Para vincular estos efectos comportamentales con los mecanismos neurofisiológicos conocidos previamente desarrollamos un modelo computacional simple de una neurona integradora de inputs sensoriales, demostrando que la operación umbral aplicada sobre la suma lineal de los inputs es suficiente para explicar el efecto de la integración multisensorial sobre la probabilidad y la latencia de respuesta, así como los efectos de efectividad inversa y de coordinación temporal de los componentes.

Este estudio previo sirve como punto de partida metodológico y conceptual para esta tesis. En particular, los estímulos utilizados, los métodos de cuantificación y las estrategias de análisis son similares en algunos casos. A su vez, el concepto de integración multisensorial como un proceso de suma de inputs que permite alcanzar un umbral más rápido y con mayor

probabilidad, mejorando así las respuestas resultantes, sirve como marco teórico para el planteo de hipótesis y la interpretación de resultados en este trabajo.

1.4 El Tectum/Colículo Superior y su rol en la integración sensorial

El Colículo Superior (CS) es una estructura cerebral bilateral ubicada en el mesencéfalo, conocida por este nombre en mamíferos y como Tectum en otros vertebrados (Figura 1A). El CS presenta una organización laminar característica variable entre especies (Figura 1B), en particular se distinguen 7 capas en mamíferos (May, 2006) (Figura 1C). Las tres capas más superficiales (*stratum zonale, stratum griseum superficiale* y *stratum opticum*) están especializadas en recibir información visual, con inputs que llegan principalmente desde la retina. Estas proyecciones provienen exclusivamente del campo visual contralateral al hemisferio que procesa la información. Es decir, el CS derecho procesa información visual del campo óptico izquierdo y viceversa. Aún más, estos inputs (y, por lo tanto, las respuestas neuronales observadas) están organizadas retinotópicamente en el CS. Por otro lado, las capas intermedias y profundas (*stratum griseum intermedium*, *stratum medullare intermedium*, *stratum griseum profundum* y *stratum medullare profundum*) reciben inputs de diversas modalidades sensoriales. Específicamente, se han encontrado respuestas a estímulos visuales, auditivos y mecanosensoriales (Meredith & Stein, 1986; Stein & Stanford, 2008).

Estudios anatómicos, de desarrollo y de función han determinado que el CS y el Tectum de otros vertebrados son estructuras homólogas (Isa et al., 2021). Ambas se originan a partir de la región dorsal del mesencéfalo durante el desarrollo embrionario, se organizan en capas similares y comparten aferencias, eferencias y funciones. El Tectum, al igual que el CS, recibe información visual de la retina contralateral en sus capas superficiales, que sólo procesan información visual. Esta información está retinotópicamente organizada, al igual que en el CS. Por otro lado, las capas más profundas del Tectum reciben información de otras modalidades sensoriales. Las modalidades procesadas varían entre especies y dependen, probablemente, de la relevancia ecológica de las señales sensoriales en el contexto evolutivo específico de cada especie. Por ejemplo, se conoce que el Tectum profundo de la lechuza (*Tyto alba*) integra información auditiva y visual, formando un mapa espacial que detecta la coincidencia en la dirección de distintos estímulos (Knudsen, 1982), mientras que en lampreas (*Lampetra fluviatilis*) el Tectum profundo recibe información de inputs relacionados con el sensado del campo eléctrico (Kardamakis et al., 2016), y en ranas acuáticas (*Xenopus laevis*) se han demostrado respuestas auditivas y mecanosensoriales (Hiramoto & Cline, 2009).

En muchos de estos estudios previos, realizados en distintas especies de vertebrados, se ha observado que al menos la mitad de las neuronas tectales profundas son multisensoriales, es decir, responden a inputs de más de una modalidad (Deeg et al., 2009; Knudsen, 1982). A su vez, una proporción significativa de las unidades profundas del Tectum proyectan a estructuras premotoras en el cerebro posterior (Baier & Scott, 2024a; Del Bene et al., 2010; Kardamakis et al., 2016). En el CS, se sabe que estas salidas motoras son importantes para

generar movimientos oculares, de cabeza y cuello (Graham, 1977; Grantyn & Grantyn, 1982; Meredith & Stein, 1986), además de para generar comportamientos evasivos (Shang et al., 2018). La actividad tectal, por otro lado, se ha vinculado con la generación de respuestas evasivas ante estímulos de peligro (Bhattacharyya et al., 2017; Dunn et al., 2016), así como también con respuestas de aproximación frente a estímulos apetitivos (Filosa et al., 2016). Esto posiciona al Tectum como un posible nodo central en la regulación del comportamiento a través de la integración de señales sensoriales. Sin embargo, esta función del Tectum no ha sido estudiada en detalle.

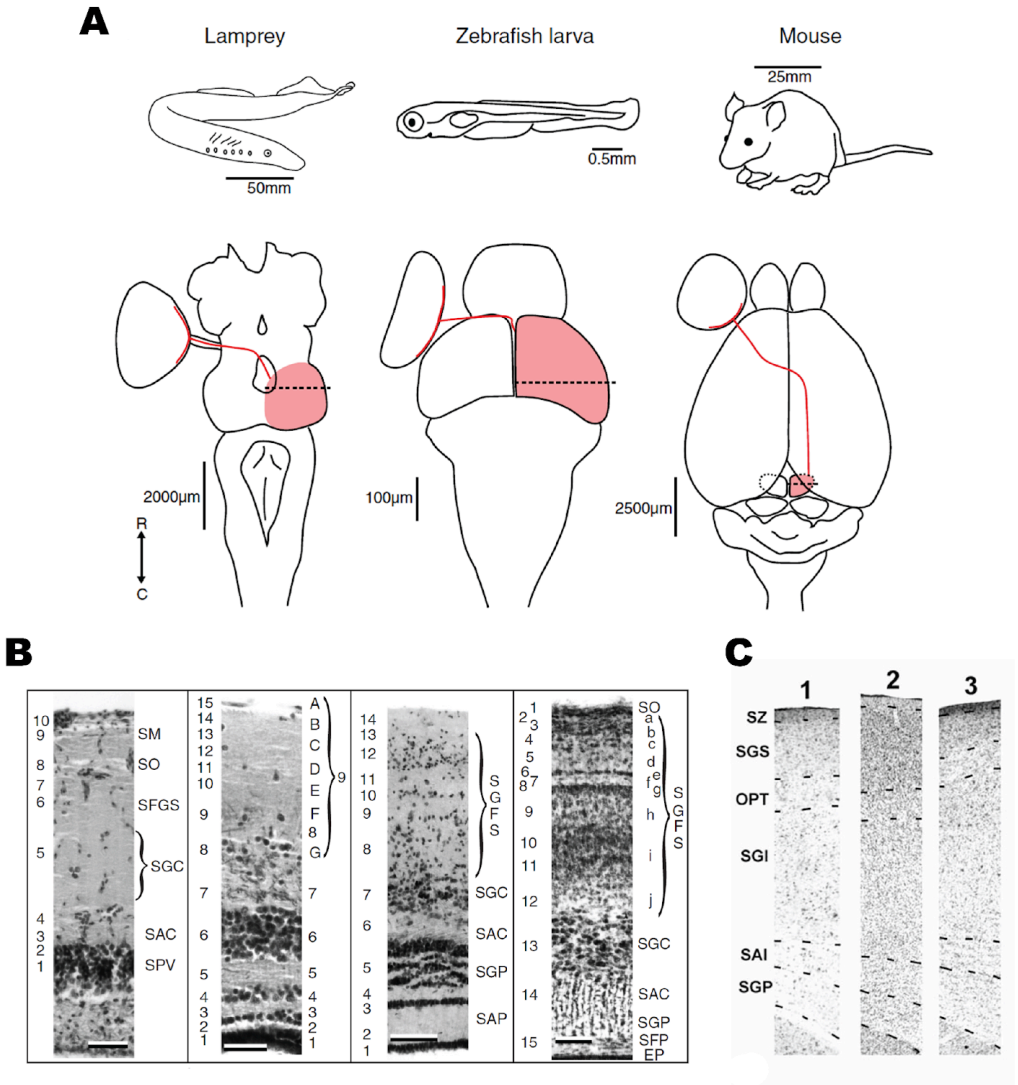


Figura 1. Posición, tamaño y estructura del tectum óptico en vertebrados. (A) Posición y tamaño del Tectum/Colículo Superior en lampreas, larvas de pez cebra y ratones. Las proyecciones de células ganglionares de la retina (línea roja) provenientes del ojo izquierdo cruzan el quiasma óptico para ingresar al tectum derecho (zona sombreada en rojo). Figura adaptada de Tadashi et al., 2021. (B) Citoarquitectura del Tectum en distintas clases de vertebrados, en secciones histológicas, de izquierda a derecha: pez, *Carassius auratus*; rana, *Discoglossus pictus*; reptil, *Gekko gecko*; ave, *Gallus gallus*. Los números de capas a la izquierda corresponden a la nomenclatura original sugerida por Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1904); los acrónimos a la derecha fueron introducidos por diversos autores. Ambas nomenclaturas se encuentran actualmente en la literatura. EP, epéndimo; SAC, stratum album centrale; SAP, stratum album periventriculare; SFGS, stratum fibrosum et griseum superficiale; SFP, stratum fibrosum profundum; SGC, stratum griseum centrale; SGFS, stratum griseum

et fibrosum superficiale; SGP, stratum griseum profundum; SM, stratum marginale; SO, stratum opticum; SPV, stratum periventriculare. Barra de escala = 50 µm (a, b) y 100 µm (c, d). Figura adaptada de Luksch, 2009. (C) Citoarquitectura del Colículo Superior en tres especies de mamíferos. Cortes verticales de gato, *Felis catus* (1); ardilla, *Sciurus vulgaris* (2) y macaco, *Macaca fascicularis* (3). SZ, stratum zonale; SGS, stratum griseum superficiale; OPT, stratum opticum; SGI, stratum griseum intermediale; SAI, stratum album intermediale; SGP, stratum griseum profundum. Figura adaptada de May, 2006.

1.5 El pez cebra como animal modelo en neurociencia

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez de agua dulce originario del sur de Asia, caracterizado por su cuerpo alargado y delgado, con franjas longitudinales azules y plateadas que le dan su nombre (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008). En su hábitat natural se lo encuentra en ríos y arroyos de baja profundidad, alimentándose de pequeños invertebrados, algas y material orgánico. Los adultos pueden alcanzar los 4 a 5 cm de longitud y presentan dimorfismo sexual sutil pero identificable, siendo las hembras más grandes y teniendo un abdomen abultado, mientras que los machos suelen ser más delgados y presentar una coloración más intensa y brillante.

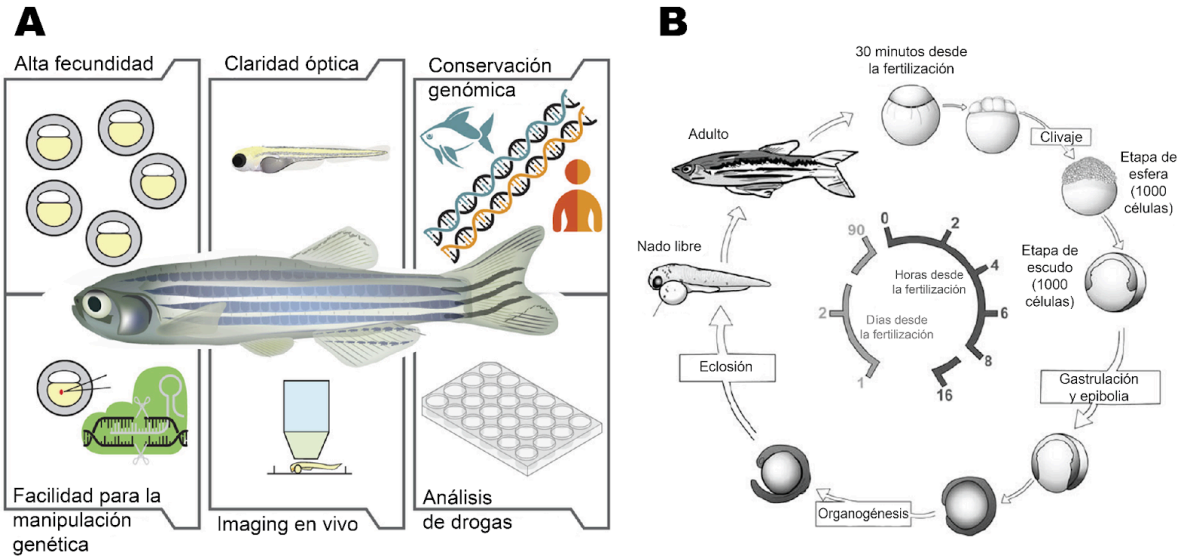


Figura 2. Ventajas del modelo de pez cebra y ciclo de vida. (A) Ventajas del pez cebra como organismo modelo. La ilustración muestra los beneficios del pez cebra en la investigación biológica, entre los que se incluyen su alta fecundidad, con capacidad para producir un gran número de crías; su claridad óptica, ya que los embriones y larvas son transparentes; la conservación genómica, debido a su alta similitud genética con los seres humanos; la facilidad de manipulación genética, lo que permite intervenir genes de riesgo asociados a enfermedades de las neuronas motoras; la posibilidad de realizar imágenes en vivo gracias a la transparencia de los embriones y larvas; y su utilidad en la detección de fármacos, ya que el pez cebra permite la evaluación de compuestos con potencial terapéutico. Figura adaptada de Garg y Geurten, 2024. (B) Ciclo de vida del pez cebra. El pez cebra se desarrolla rápidamente a partir de un cigoto unicelular que se sitúa sobre una gran célula de vitelo. La gastrulación comienza aproximadamente 6 horas después de la fertilización, y la eclosión ocurre a los 2 días, dando lugar a una larva que nada libremente. El pez cebra alcanza la madurez sexual alrededor de los 3 meses de edad y puede vivir hasta 5 años. Figura adaptada de D'Costa y Shepherd, 2009.

Esta especie comenzó a ser usada en investigaciones científicas en la década de 1960 dadas sus convenientes características (Figura 2A): el desarrollo de los embriones es externo y muy veloz, cumpliendo el ciclo de fecundación a eclosión en aproximadamente 48 hs (Figura 2B); esto se combina con una alta tasa de fecundidad, produciendo cientos de huevos por cruza y pudiendo cruzarse varias veces por mes durante todo el año (Grunwald & Eisen, 2002; Streisinger et al., 1981). Crucialmente, los embriones y larvas tempranas son transparentes, permitiendo la visualización de procesos biológicos en tiempo real sin necesidad de aplicar técnicas invasivas. Esta conjunción de factores resultó en que el pez cebra se convierta en uno de los modelos animales más usados del mundo, con más de 35 mil trabajos científicos publicados en la última década (PubMed), especialmente en desarrollo embrionario y genética.

La extensión en el uso de este animal llevó al desarrollo de una multiplicidad de herramientas de manipulación genética y, en particular, de líneas transgénicas que presentan diversos fenotipos de interés. Sumado a que aproximadamente el 70% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de estos peces, esto posiciona al pez cebra como un modelo ideal para estudiar procesos biológicos y hasta patologías de relevancia humana (Choi et al., 2021).

La neurociencia ha adoptado al pez cebra como uno de sus modelos animales fundamentales (Bilotta & Saszik, 2001; Stewart et al., 2014). Los embriones eclosionan a las pocas horas de la fecundación y desarrollan rápidamente un repertorio conductual diverso que incluye nadar, alimentarse y ejecutar respuestas de escape (Kalueff et al., 2013; Knogler & Drapeau, 2014). Dado su pequeño tamaño (unos pocos milímetros de longitud durante sus primeras semanas de vida), los dispositivos experimentales necesarios para estudiarlos ocupan poco espacio y permiten registrar simultáneamente la actividad de múltiples individuos. Ciertos genotipos larvales (por ejemplo, el denominado *nacre*) preservan su transparencia durante varias semanas, haciendo posible la visualización y el registro del cerebro sin intervenir sobre el organismo (Lister et al., 1999). Además, ciertas líneas transgénicas permiten la expresión de marcadores de actividad neuronal en tiempo real, lo cual habilita el registro simultáneo de cientos o hasta miles de neuronas a la vez (Ahrens et al., 2013; Park et al., 2000). Uno de los ejemplos predominantes en el campo es el de los indicadores de calcio genéticamente codificados (GECI, por sus siglas en inglés). Estos pueden ser expresados en el núcleo o en el citoplasma de las neuronas y, al ser extremadamente sensibles a cambios intracelulares en los niveles de calcio, permiten una medida indirecta pero muy estrechamente relacionada con la actividad neuronal (Miyawaki et al., 1997; Nakai et al., 2001).

Si bien contados estudios han logrado registrar actividad neuronal en peces que se mueven libremente (Kim et al., 2017), es usual fijar a los animales en una preparación de agarosa que los inmoviliza parcial o totalmente, permitiendo el registro estable del cerebro durante la presentación de estímulos u otras condiciones experimentales (Higashijima et al., 2003). Estas técnicas han sido desarrolladas a través de décadas de experimentación científica con esta especie, posicionándose como una de las mejores opciones de vertebrados para el estudio del vínculo entre la actividad neuronal y el comportamiento.

El repertorio comportamental del pez cebra ha sido ampliamente documentado en los últimos años (Kalueff et al., 2013). Su alimentación incluye pequeños invertebrados y larvas, por lo que presentan patrones de acercamiento y caza bien caracterizados; también poseen una respuesta optomotora innata, que les permite nadar en la dirección opuesta de un flujo óptico coherente; además, estos animales son altamente sociales, viven en grupos y establecen jerarquías sociales y roles de dominancia y subordinación. Esta estructura permite el desarrollo de muchos comportamientos específicos que también han sido ampliamente estudiados, como patrones de cortejo, agresión y territorialidad. Finalmente, y de gran importancia para esta tesis, los peces cebra ejecutan respuestas evasivas ante estímulos de peligro, y estas respuestas han sido descritas con detalle en la bibliografía (Burgess & Granato, 2007; Issa et al., 2011; Jain et al., 2018).

1.6 Respuestas evasivas del pez cebra frente a estímulos aversivos

Las respuestas de escape son patrones comportamentales con mecanismos relativamente conservados a través del reino animal (Bullock, 1984). Dada su importancia para la sobrevida del organismo, es importante que estas respuestas sean rápidas y precisas. La mayoría de los animales tienen comportamientos de este estilo, como maniobras, giros o saltos rápidos y directos, con el objetivo de alejarse de una amenaza lo antes posible. Estos comportamientos suelen involucrar la actividad de neuronas “gigantes”, cuyo diámetro axonal permite la transmisión de potenciales de acción a una velocidad mayor a la de una neurona de tamaño promedio, posibilitando respuestas con latencias extremadamente bajas (Davis, 1984; Eaton et al., 1977; Herberholz, 2022; Levine, 1974; Otis & Gilly, 1990). Este tipo de comportamientos no son las únicas reacciones posibles ante situaciones de riesgo: los animales pueden elegir ejecutar escapes más lentos en situaciones que no ameritan una respuesta explosiva (Krasne, 1965; Stierle et al., 1994; von Reyn et al., 2014), así como también pueden decidir responder ante una amenaza permaneciendo completamente quietos para evitar la detección por parte de predadores, un comportamiento comúnmente denominado *freezing* (Eilam, 2005; Roelofs, 2017). Sin embargo, las respuestas de escape de alta velocidad son, en la mayoría de los casos, patrones comportamentales cruciales para la supervivencia de un organismo.

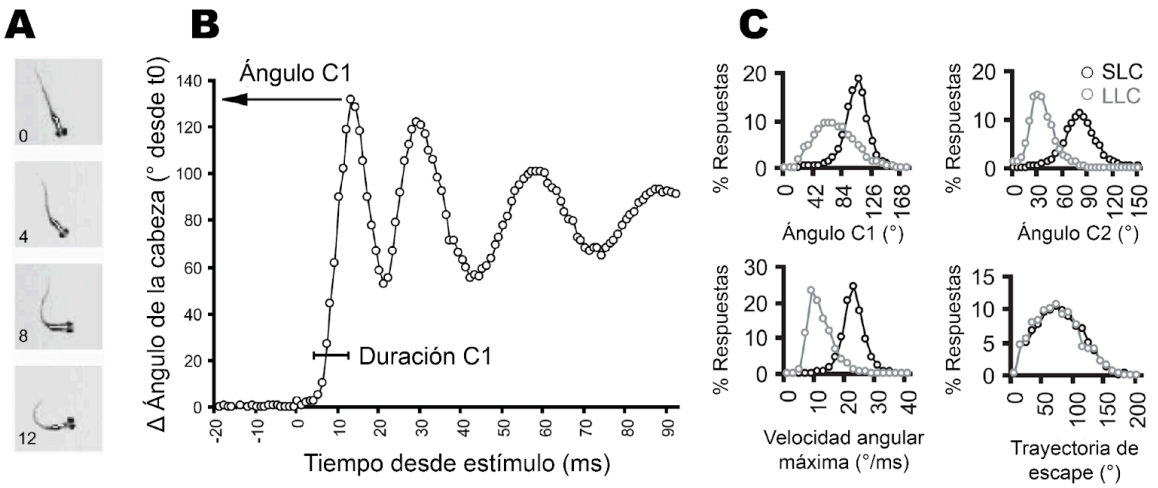


Figura 3. Tipos de respuesta C-start en peces cebra. (A) Respuesta C-start de corta latencia (SLC) en una larva en nado libre. La barra a lo largo del segmento de la cabeza indica la orientación del pez. (B) Analizando la orientación de la cabeza, puede calcularse su ángulo con la orientación en t0, y esto permite caracterizar la dinámica de la respuesta a través del tiempo. C1 indica la Etapa 1 del C-start. (C) Histogramas de la cinética de la respuesta y las trayectorias de movimiento para respuestas de latencia corta (SLC, negro) y respuestas de latencia larga (LLC, gris). Figura adaptada de Burgess y Granato, 2007.

En peces, estas respuestas de escape han sido muy bien estudiadas (Eaton et al., 2001; Korn & Faber, 2005; Zottoli & Freemer, 2003). La respuesta principal que ejecutan estos animales en presencia de un predador u otro tipo de amenaza se denomina *C-start*, o escape en forma de "C" (Figura 3A), por la forma que toma el cuerpo del animal durante el giro que realizan inicialmente (denominada como la Etapa 1) antes de impulsarse rápidamente en dirección opuesta al estímulo de peligro (Etapa 2) (Figura 3B). Este comportamiento es ejecutado con muy baja latencia: usualmente comienza a menos de 4 milisegundos del estímulo amenazante y puede ser completado en 20 o 30 milisegundos entre ambas etapas (Video 2).

En peces cebra se reconocen dos tipos de C-start distintos (Burgess & Granato, 2007; Troconis et al., 2017). Por un lado, los C-start de baja latencia (SLC, por sus siglas en inglés, Figura 3C, trazo negro) son, como su nombre lo indica, los más rápidos y explosivos. Este comportamiento tiene una latencia extremadamente baja (alrededor de los 5 a 7 milisegundos) e involucra movimientos más rápidos y vigorosos, alcanzando una mayor velocidad angular máxima y un ángulo de flexión más pronunciado. Su cinética es relativamente independiente de la intensidad y naturaleza de los estímulos, siendo una respuesta robusta y estereotipada. Al igual que otros comportamientos evasivos de alta velocidad en el reino animal, el SLC es ejecutado por neuronas gigantes identificadas. En peces, estas son las células Mauthner, un par de neuronas reticuloespinales de gran tamaño, posicionadas de manera bilateral, con axones que decusan e inervan unidades premotoras a lo largo de la médula espinal (Furshpan & Furukawa, 1962; Zottoli, 1977a) (Figura 4A). Crucialmente, existe una relación uno a uno entre la actividad de la célula Mauthner y los C-starts de baja latencia: un potencial de acción de una célula Mauthner es suficiente para iniciar una respuesta de escape de tipo SLC, y todas las respuestas de tipo SLC son evocadas por una de las dos Mauthner (Eaton et al., 2001; Korn & Faber, 2005) (Figura 4B).

Asimismo, se conoce por estudios previos que estas células reciben señales auditivas de manera monosináptica, así como señales visuales de manera polisináptica, permitiendo respuestas de tipo SLC a estímulos tanto visuales como auditivos (Medan & Preuss, 2014).

Por otro lado, existen C-starts de latencia más larga (LLC, por sus siglas en inglés, Figura 3C, trazo gris). Estos se ejecutan entre 20 y 30 milisegundos después de la llegada de un estímulo de peligro, lo cual no deja de ser una velocidad de respuesta muy elevada, pero que no alcanza la explosividad del SLC (Burgess & Granato, 2007; Troconis et al., 2017). Los movimientos producidos durante el LLC son más lentos y menos intensos, la velocidad angular máxima es menor, así como también lo es el ángulo de flexión alcanzado. Sin embargo, a diferencia de los SLC, la cinética de estas respuestas es mucho más variable y puede ser modulada por la intensidad de los estímulos, lo cual podría convertirla en una elección razonable frente a estímulos menos urgentes. Los LLC no son activados por las células Mauthner, sino que se producen a partir de un conjunto de células ubicadas en el cerebro posterior, no todas identificadas, pero que incluyen pares de neuronas reticuloespinales conocidas como las homólogas de las células Mauthner (Marquart et al., 2019; Troconis et al., 2017). Estas neuronas, si bien son similares a las Mauthner, tienen axones con un diámetro menor, por lo que su velocidad de transmisión es más baja.

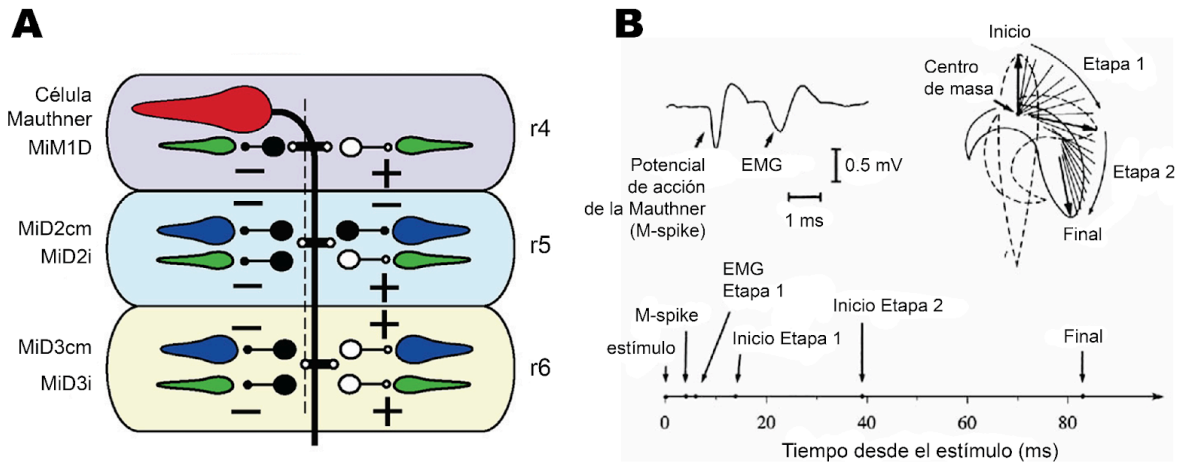


Figura 4. La célula Mauthner como inicio del SLC. (A) Representación esquemática de los circuitos desde la célula Mauthner izquierda hacia las neuronas reticuloespinales (RSN) entre los rombómeros r4 y r6. La salida de la célula Mauthner es excitatoria (en rojo, colinérgica). Presumiblemente, las células MiD2cm y MiD3cm son glicinérgicas (azul), y las células MiM1D y MiDi son glutamatérgicas (verde). Las interneuronas supuestas entre la célula Mauthner y las RSNs están representadas con símbolos abiertos (excitatorios) o rellenos (inhibitorios). Figura adaptada de Neki et al., 2014. (B) (Arriba a la izquierda) Relación temporal entre la activación de la célula Mauthner y el C-start. (Arriba a la derecha) Siluetas superpuestas y líneas medias anteriores, registradas cada 4 ms, que muestran la etapa inicial 1 y la posterior etapa propulsora 2. (Abajo) Secuencia temporal de los mismos eventos descritos arriba. Figura adaptada de Eaton et al., 2001.

Es importante remarcar que ambos patrones comportamentales son importantes y cumplen su función en situaciones distintas. Los SLC son respuestas mucho más explosivas, rápidas y que hacen más probable la sobrevida del animal en situaciones de peligro urgentes. Sin embargo, el control fino y la adaptabilidad de los movimientos al contexto es mucho menor del que permiten los LLC, aunque sean algo más lentos y de mayor latencia. La elección de

qué respuesta de escape ejecutar debe depender de las características de la amenaza percibida. Dicho esto, la selección de comportamientos de escape diferentes en función de la modalidad de estimulación no se ha estudiado con profundidad en peces cebra.

1.7 Sistemas sensoriales y sistema nervioso del pez cebra

El pez cebra posee un sistema visual muy desarrollado, incluso durante su estadío larval, en el que los ojos constituyen una parte proporcionalmente grande de su cuerpo. Desde etapas muy tempranas, necesita valerse de señales visuales para cazar, esquivar obstáculos y escapar de predadores. Estas habilidades son esenciales para su supervivencia y están estrechamente vinculadas a comportamientos como la detección de objetos en movimiento y su clasificación por tamaño (Baier & Scott, 2024b; Dunn et al., 2016; S. J. Preuss et al., 2014).

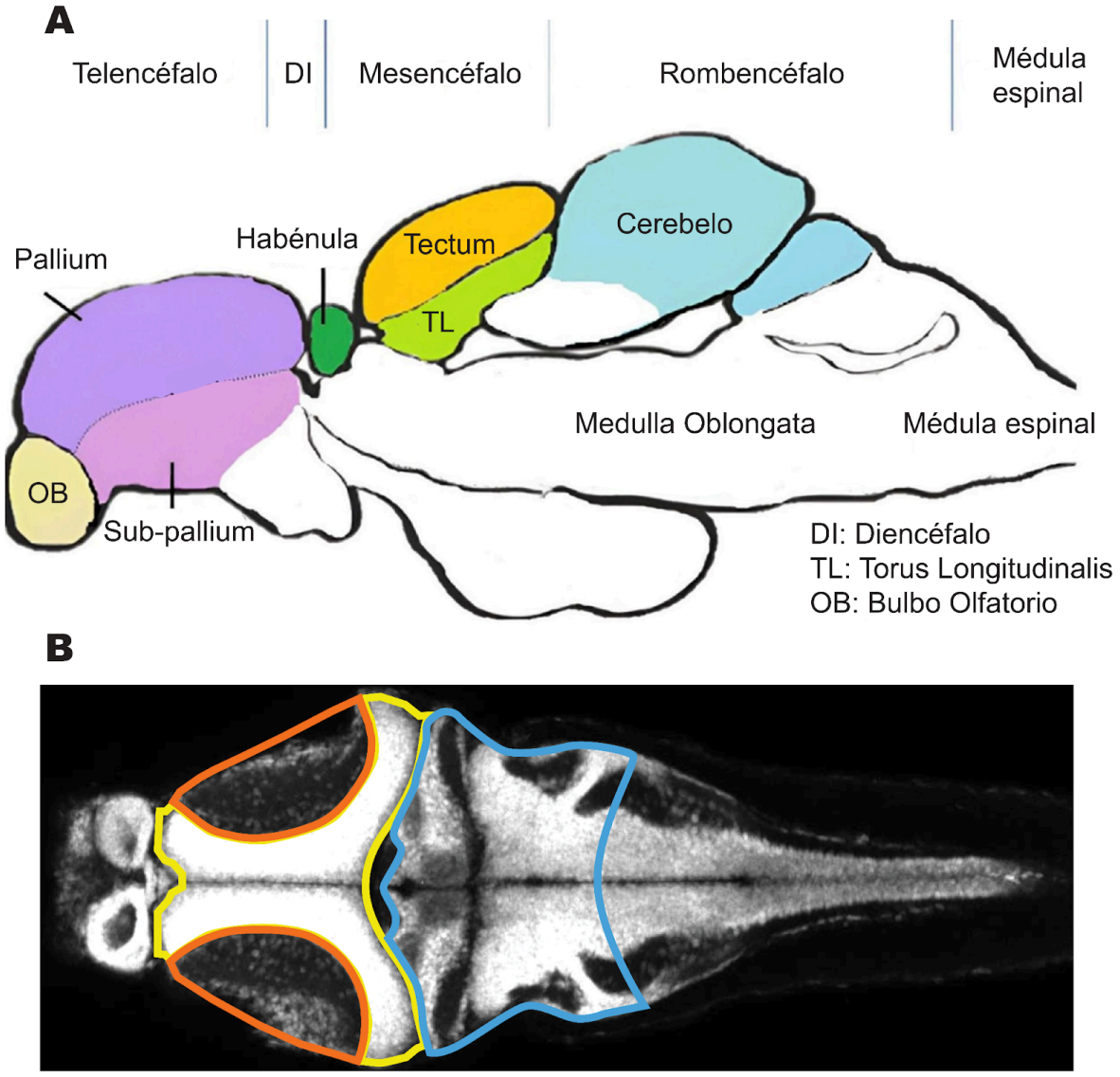


Figura 5. Estructura del cerebro de pez cebra. (A) Una sección sagital media representativa del cerebro del pez cebra, esquematizada. Figura tomada de Shenoy et al., 2022. (B) Vista dorsal representativa del pez cebra,

neuronas marcadas con Tg(elavl3:Hsa.HIST2H2BE-RFP), regiones de interés marcadas: neuropilo tectal (naranja), PVL (amarillo), Rombencéfalo (azul). Tomado de Z Brain Atlas (Randlett et al., 2015).

Esta especie también posee dos sistemas de recepción mecanosensorial, es decir, de detección de señales mecánicas. Por un lado, está el sistema de la línea lateral, formado por neuromastos, conjuntos de células ciliadas sensibles al flujo del agua, que se distribuyen a lo largo de la superficie corporal del animal (Metcalfe et al., 1985; Raible & Kruse, 2000). Por otro lado, el pez cebra posee un oído interno, cuyas células ciliadas son estimuladas por los otolitos, pequeños cristales de carbonato de calcio que se desplazan ante movimientos del animal. Estos desplazamientos ocurren en respuesta a aceleraciones lineales y gravitacionales, lo que permite detectar cambios en la orientación y el equilibrio, así como también vibraciones inducidas por ondas sonoras en el entorno acuático (Bever & Fekete, 2002; Whitfield et al., 2002). Además, el oído interno está conectado a la vejiga natatoria por un conjunto de pequeños huesos llamados el Aparato de Weber (Lu & DeSmidt, 2013a). Esta conexión permite amplificar las vibraciones sonoras, mejorando la capacidad auditiva del pez y resultando en un espectro de frecuencias audibles que va desde los 100 Hz hasta los 4 kHz, aproximadamente (Poulsen et al., 2021a).

Estos sistemas sensoriales, entre otros, sirven como input a un sistema nervioso central que comparte similitudes fundamentales con el de otros vertebrados (Shenoy et al., 2022; Wulliman et al., 2012) (Figura 5A). El telencéfalo, o cerebro anterior, contiene el bulbo olfatorio, responsable de procesar señales olfativas, así como otras estructuras con funciones relacionadas con la memoria y funciones superiores. El diencéfalo, ubicado posterior al telencéfalo, incluye el tálamo, que actúa como un centro de relevo sensorial, y el hipotálamo, que regula funciones homeostáticas y endocrinas. El mesencéfalo, o cerebro medio, contiene al Tectum, homólogo del Colículo Superior de mamíferos, como fue discutido en secciones anteriores. El rombencéfalo, o cerebro posterior, contiene diversas estructuras, principalmente encargadas de la ejecución de patrones motores (es aquí, por ejemplo, donde se encuentran las células Mauthner y sus homólogas). Por último, la médula espinal transmite señales entre el cuerpo y el resto del cerebro, siendo un canal de paso para señales sensoriales y comandos motores.

1.8 Estructura y función del Tectum en el pez cebra

El Tectum del pez cebra posee varias capas, organizadas anatómicamente en dos regiones identificables: el neuropilo y la capa periventricular (PVL) (Baier & Scott, 2024a) (Figura 5B). El neuropilo, que ocupa la porción más superficial, está organizado en varias capas concéntricas donde terminan los axones de las células ganglionares de la retina. También se encuentran en esta región las dendritas de neuronas cuyos somas residen en la PVL, así como algunos somas de interneuronas. Por otro lado, la PVL constituye la capa más profunda del Tectum y contiene una alta densidad de somas neuronales. Estas neuronas extienden sus dendritas hacia el neuropilo para recibir información sensorial y, en muchos casos, proyectan sus axones hacia otras regiones del cerebro, incluyendo centros pre-motores como las células Mauthner (Luksch, 2009; Marquez-Legorreta et al., 2020; Scott, 2009) (Figura 6). Tanto el

neuropilo como la PVL presentan una organización retinotópica del procesamiento de las señales visuales.

Históricamente, se ha estudiado al Tectum del pez cebra como una estructura (casi) exclusivamente visual. Se lo ha involucrado en el procesamiento de estímulos visuales para la diferenciación de presas y predadores en función del tamaño del estímulo (S. J. Preuss et al., 2014), se ha demostrado su rol en comportamientos de orientación, de caza y de escape, filtrando información visual y enviando señales a las regiones cerebrales encargadas del movimiento (Baier & Scott, 2024b; Del Bene et al., 2010; Dunn et al., 2016; Marquez-Legorreta et al., 2020). Tal es la tradición de estudiar únicamente el procesamiento visual en esta estructura que usualmente era denominada como Tectum Óptico. Sin embargo, esto empezó a cambiar durante los últimos años, cuando algunos estudios encontraron respuestas de otras modalidades sensoriales en neuronas tectales (Poulsen et al., 2021b; A. W. Thompson et al., 2016; Vanwalleghem et al., 2017).

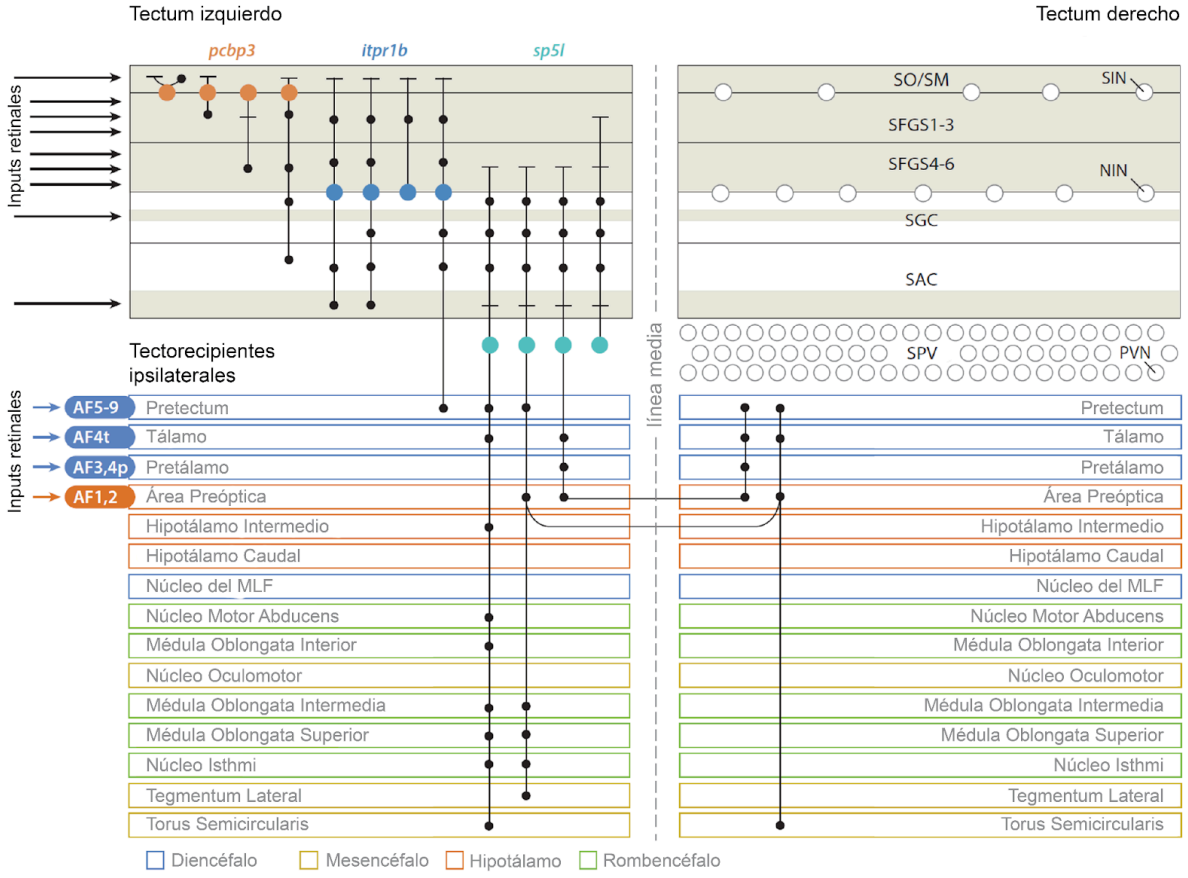


Figura 6. Tipos celulares tectales y sus proyecciones hacia otras áreas del cerebro de pez cebra. Para ilustrar los principios (y desafíos) de la clasificación de tipos celulares, se representan esquemáticamente las formas y ubicaciones de tres tipos celulares definidos transcriptómicamente. Las esferas de colores indican cuerpos celulares, los pequeños círculos negros indican probablemente terminales axonales, y las líneas horizontales cortas indican probablemente terminaciones dendríticas. AF, campo de arborización; MLF, fascículo longitudinal medial; NIN, interneurona localizada en el neuropilo; PVN, neurona periventricular; SAC, stratum album centrale; SFGS, stratum fibrosum et griseum superficiale; SGC, stratum griseum centrale; SIN,

interneurona superficial; SM, estrato marginal; SO, estrato óptico; SPV, stratum periventricular (PVL). Figura adaptada de Baier y Scott, 2024.

Varios trabajos han encontrado respuestas auditivas en el Tectum de pez cebra. Vanwalleghem y colaboradores encontraron que estas respuestas se ubican particularmente en las capas más profundas del Tectum, es decir, en regiones ventrales y distantes de la superficie del cerebro larval (Vanwalleghem et al., 2017), lo cual coincide con lo reportado previamente en otras especies (Hiramoto & Cline, 2009; Isa et al., 2021; Kardamakis et al., 2016; Knudsen, 1982; Meredith & Stein, 1986). Los resultados de Poulsen et. al., por otro lado, sugieren que podría existir un gradiente medio-lateral de sensibilidad a frecuencias en las neuronas tectales (Poulsen et al., 2021b). En este estudio, los autores realizaron *imaging* de calcio en todo el cerebro de larvas de pez cebra y encontraron que neuronas sensibles a distintas frecuencias se distribuyen espacialmente en varias regiones, incluyendo el Tectum, donde observaron una tendencia a que las frecuencias altas se ubiquen medialmente y las bajas lateralmente.

Sin embargo, el único estudio que analiza respuestas de múltiples modalidades sensoriales a la vez en el Tectum de peces cebra fue el de Thompson et al. (2016). Este trabajo muestra respuestas en el Tectum frente a la estimulación auditiva y de la línea lateral, aunque encuentran que menos del 1% de las neuronas tectales responden a más de una modalidad sensorial (A. W. Thompson et al., 2016). Es decir, ante los estímulos presentados en este estudio, el 99% de las neuronas del Tectum parecerían ser unisensoriales. Por otro lado, aquellas neuronas en las que sí logran ver respuestas multisensoriales presentan un patrón de inhibición cuando más de una señal es presentada al mismo tiempo. Es decir, no encuentran indicios de mejora multisensorial en el Tectum. Sin embargo, este trabajo no utilizó estímulos de peligro para evaluar las respuestas tectales. En cambio, se utilizaron barras en movimiento y flashes de luz, un tono auditivo de 400 Hz de 1 segundo de duración, y pulsos breves de flujo de agua sobre la línea lateral. Por otra parte, no se analiza el vínculo de estas respuestas multisensoriales tectales, si las hubiera, con la actividad de áreas premotoras o con el comportamiento. Esto abre la puerta a preguntarse si existirá mejora multisensorial en el Tectum cuando las larvas perciben estímulos de peligro de manera sincrónica, y si ese efecto, de existir, tendrá alguna consecuencia sobre el comportamiento.

En esta tesis, nos proponemos estudiar si estímulos auditivos que evocan respuestas de escape son representados en el Tectum, si además pueden modular la respuesta a estímulos visuales presentados de manera simultánea y, de existir esta integración, si es posible encontrar alguna relación entre la misma y el comportamiento resultante.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis Principal

El Tectum de larvas de pez cebra participa en el procesamiento de estímulos visuales y auditivos de tipo aversivo, contiene poblaciones neuronales sensibles a la presentación simultánea de estas señales y esta actividad neuronal se relaciona directamente con la ejecución de respuestas evasivas. Además, dicha actividad refleja principios de integración multisensorial, como la mejora de la respuesta frente a combinaciones de estímulos poco salientes.

Objetivo General

Evaluar cómo la presentación de estímulos audiovisuales aversivos se traduce en respuestas comportamentales evasivas y caracterizar la representación neuronal de estos estímulos en el Tectum de larvas de pez cebra.

Objetivos Específicos

1. Comportamiento: Evaluar el efecto de la saliencia de estímulos visuales y auditivos aversivos, presentados de manera individual o combinada, sobre la probabilidad y tipo de respuesta de escape.

2. Actividad neuronal: Analizar la actividad neuronal en el Tectum frente a estímulos visuales, auditivos y audiovisuales, y determinar si esta actividad cumple criterios de integración multisensorial, incluyendo la mejora de respuestas combinadas y su relación con la saliencia de los componentes unisensoriales.

CAPÍTULO 2: MÉTODOS GENERALES

2.1 Cuidado y crianza de peces cebra

Para este estudio se utilizaron larvas de pez cebra (*Danio rerio*). Los adultos se mantuvieron en acuarios de 5 litros con sistema de recirculación de agua, bajo un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (con la luz encendida a las 8 a.m.), en una sala con temperatura controlada entre 24–26 °C. Todos los experimentos se realizaron entre las 9 a.m. y las 5 p.m., utilizando animales de entre 4 y 39 días post fecundación (dpf).

Las larvas fueron obtenidas mediante la cruza de peces cebra adultos de entre 6 meses y 2 años de edad. Para inducir la reproducción, grupos de 3 a 7 animales (incluyendo machos y hembras) fueron colocados la tarde anterior en tanques de cría tipo Beachtank (Techniplast), cuyo fondo está diseñado con una rejilla de plástico rígido que permite que los huevos caigan al compartimento inferior, fuera del alcance de los adultos, que tienden a alimentarse de ellos tras la puesta. Durante las primeras horas de la mañana del día siguiente se recuperó la puesta si ocurrió oviposición, tras lo cual los adultos fueron devueltos a sus respectivos acuarios de mantenimiento antes del mediodía.

Los huevos recolectados fueron inicialmente enjuagados con agua del sistema utilizando un colador de malla fina que permite eliminar desechos sin perder los embriones. A continuación, los huevos fueron inspeccionados bajo lupa: se descartaron aquellos que estaban dañados, muertos o no fecundados, y los viables fueron distribuidos en placas de Petri, aproximadamente 50 huevos por placa, con medio E3 (5mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl2, 0,33 mM MgSO4) equilibrado con 10 mM HEPES (pH 7.3) y mezclado con azul de metileno 0.00002%. Los huevos fueron mantenidos a 28°C, con cambios diarios del medio. Las larvas permanecieron en estas condiciones hasta 6 dpf. Posteriormente, las larvas se mantuvieron en recipientes llenos de E3, bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo que los adultos, alimentadas diariamente con AP100 (Zeigler Larval AP100 Diet).

Durante esta tesis se utilizaron diferentes líneas genéticas del pez cebra (*Danio rerio*), todas mantenidas en background AB (ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7). Para los experimentos de *imaging* de calcio se emplearon larvas con la mutación *mitfa*^{w2} (comúnmente conocida como *nacre*; ZFIN ID: ZDB-GENO-070501-2), la cual afecta el desarrollo de melanocitos, resultando en animales sin pigmentación negra. Esta característica facilita la transparencia de las larvas durante varios días post-fecundación, lo que mejora sustancialmente la calidad de la señal en los registros neuronales. La mutación *nacre* no elimina todos los pigmentos, pero sí reduce significativamente la opacidad en etapas tempranas del desarrollo (Lister et al., 1999).

Para los experimentos de comportamiento se utilizaron principalmente animales pigmentados, lo que mejora el contraste y la segmentación en los registros de video, facilitando el análisis automatizado del movimiento. Sin embargo, se realizaron también experimentos comportamentales preliminares en animales *nacre* para asegurar que su visión, audición y motricidad fueran comparables a los animales pigmentados.

Todos los animales utilizados, tanto en los experimentos de comportamiento como en los de *imaging*, expresaban un indicador de calcio genéticamente codificado (GECI) de tipo GCaMP6f de manera panneuronal (T.-W. Chen et al., 2013). En particular, se utilizó la línea transgénica HuC:GCaMP6f (ZFIN ID: ZDB-TGCONSTRCT-180201-2), que expresa el GECI en el citosol de las neuronas. Esta línea fue empleada tanto para los experimentos de *imaging* como para los experimentos comportamentales, a fin de facilitar la comparación entre ambos tipos de datos.

Finalmente, para los experimentos de *imaging* realizados fuera del laboratorio, se utilizó la línea HuC:H2B-GCaMP6f (ZFIN ID: ZDB-TGCONSTRCT-150916-4), en la cual el GECI está fusionado a la histona H2B, lo que restringe su expresión al núcleo neuronal. Esta característica mejora la resolución espacial en los análisis de actividad neuronal.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en cumplimiento con las regulaciones vigentes y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo 152).

2.2 Experimentos realizados y nomenclatura

A lo largo de esta tesis realizamos diversas series experimentales, a través de las cuales cambiaron las condiciones de estimulación, las condiciones de registro, la edad de los animales y la cantidad de animales evaluados, entre otros parámetros de interés. Si bien cada uno de estos experimentos será presentado en detalle en las secciones relevantes, se detalla una nomenclatura general en la Tabla 1 para mayor claridad.

Código	Objetivo	R. neuro.	R. comp.	N	N+	Edades
PRE-COMP	Calibración de los estímulos	No	Sí	326	326	6-39
COMP	Análisis del efecto de la integración multisensorial sobre el comportamiento de escape	No	Sí	40	80	4-7
IMG-TEC	Análisis de la respuesta auditiva, visual y audiovisual en el Tectum	Sí	No	24	68	4-7
IMG-ROM	Análisis de la actividad neuronal asociada con eventos motores en el Rombencéfalo	Sí	No	17	18	4-7
IMG-SPIM	Análisis de la relación entre la integración multisensorial y el comportamiento en animales con la cola liberada	Sí	Sí	10	18	4-8

Tabla 1. Detalle de las series experimentales presentadas en esta tesis. “R. neuro.” indica si en la serie experimental se realizaron registros neuronales. “R. comp.” indica si se realizaron registros comportamentales. “N” indica el número de animales incluídos en los análisis presentados. “N+” indica el número de animales totales registrados. El rango de edades se indica en días post-fecundación (dpf). En la segunda serie

comportamental (COMP) se realizaron 80 experimentos en total en animales de 4 a 15 dpf, pero se restringió el análisis final a 40 animales de 4 a 7 dpf para poder comparar los resultados con los experimentos de *imaging*. En la primera serie experimental de *imaging* (IMG-TEC) se excluyeron del análisis experimentos en los que no se observó respuesta auditiva (ver Capítulo 6).

2.3 Diseño y combinación de estímulos visuales y auditivos

Estudios previos de nuestro laboratorio y de otros han demostrado que los peces (Martorell & Medan, 2021; T. Preuss, 2006; Zottoli, 1977b), y en particular los peces cebra (Dunn et al., 2016; Kimmel et al., 1974; Temizer et al., 2015), identifican ciertos tipos de señales visuales y auditivas como estímulos de peligro, evocando respuestas de escape u otros comportamientos evasivos. Ha sido ampliamente demostrado que los estímulos visuales de tipo *looming* (o de aproximación) y estímulos auditivos intensos y abruptos son efectivos evocando este tipo de respuestas.

Estímulos visuales

Un *looming* se define como una figura proyectada sobre un fondo (en general más claro que la figura) cuyo tamaño comienza siendo relativamente pequeño y aumenta a través del tiempo con una cierta dinámica hasta alcanzar un tamaño máximo, simulando un objeto (por ejemplo, un predador) que se aproxima a velocidad constante (Figura 7A) en trayectoria de colisión. Esto resulta en una expansión con aceleración angular positiva, que puede ser descrita con la siguiente ecuación:

$$\theta(t) = 2 \times tan^{-1}(l/vt)$$

Donde θ(t) es el ángulo subtendido por el objeto en la retina a lo largo del tiempo, l es el radio del objeto virtual, v es la velocidad de aproximación del objeto y t es el tiempo. Es decir, el ángulo subtendido por el objeto en la retina del animal aumenta cada vez más rápido a medida que transcurre el tiempo de estimulación. El parámetro utilizado para determinar la dinámica de expansión de un *looming* se denomina *l/v*, lo cual proviene del cálculo trigonométrico mencionado anteriormente (Gabbiani et al., 1999). Este parámetro tiene unidades de tiempo, y describe el tiempo que tarda un objeto en avanzar un cuerpo completo en la dirección de movimiento. Un *l/v* más grande denota una dinámica de expansión más lenta (el objeto tarda más tiempo en avanzar un cuerpo entero) mientras que un *l/v* más chico determina dinámicas más veloces (Figura 7B).

Diversos estudios han encontrado que los estímulos de tipo *looming* evocan respuestas de escape en distintos animales (de Vries & Clandinin, 2012; Edwards, 2017; Heinemans & Moita, 2022; Oliva et al., 2007; Schiff et al., 1962; Thieu et al., 2024), incluyendo a los peces cebra (Bhattacharyya et al., 2017; Dill, 1974; Temizer et al., 2015). En esta especie, Temizer y colaboradores (2015), demostraron que los *loomings* más lentos (cuyo *l/v* es mayor) tienden a producir respuestas de escape con mayor probabilidad. Bhattacharyya et. al. confirman este hallazgo en 2017 (Figura 7C), pero descubren que *loomings* más rápidos (con un *l/v* menor)

evocan proporcionalmente más C-starts de baja latencia (SLC), activando la célula Mauthner (Figura 7D). En general, los valores de *l/v* utilizados en la bibliografía rondan entre 0.05 y 1.5 segundos.

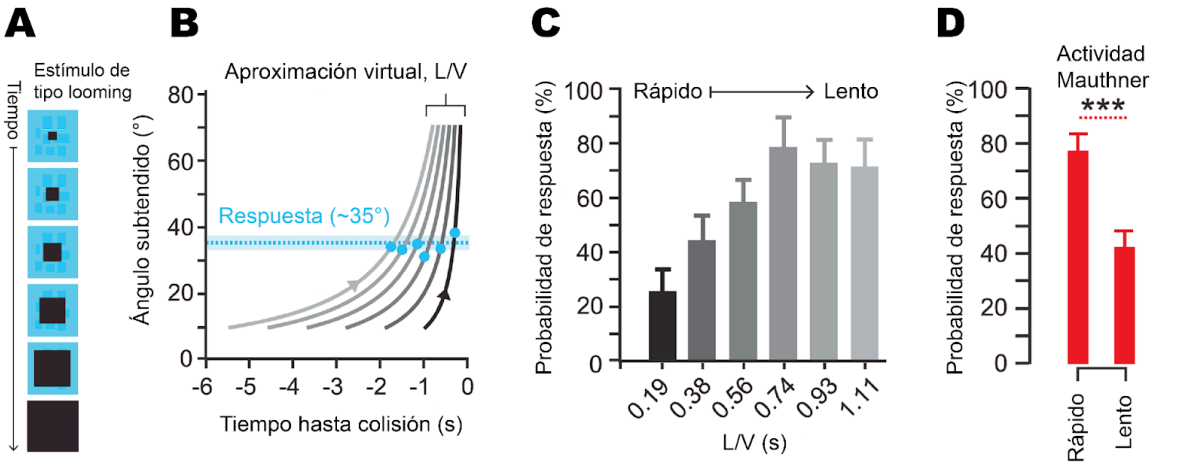


Figura 7. La dinámica de expansión de estímulos visuales de tipo *looming* modula la respuesta de escape en larvas de pez cebra. (A) Ejemplo de estímulo de tipo *looming* cuadrado expandiéndose. (B) Los peces responden a un ángulo subtendido específico del objeto que se aproxima, independientemente de la velocidad de aproximación. Grupo 1: L/V = 0.19 s, grupo 2: L/V = 0.38 s, grupo 3: L/V = 0.56 s, grupo 4: L/V = 0.74 s, grupo 5: L/V = 0.93 s, grupo 6: L/V = 1.11 s). La curva dibujada con la línea más oscura representa el grupo con el valor más bajo de L/V —un estímulo de acercamiento rápido— y la curva más clara representa el grupo con el valor más alto de L/V —un estímulo de acercamiento lento. Se marca en azul el tiempo promedio de respuesta en relación con el momento de colisión virtual para cada grupo, y el promedio general (línea punteada horizontal). (C) Los peces (N = 21) respondieron con mayor probabilidad a estímulos de tipo *looming* lentos (mayores valores de L/V) que a estímulos rápidos (valores bajos de L/V). Los tonos de gris representan los mismos valores de L/V representados en A. (D) Los peces (N = 15) mostraron mayor probabilidad de producir una respuesta con activación de la célula Mauthner ante un estímulo rápido que ante un estímulo lento. Figuras adaptadas de Bhattacharyya et al., 2017.

Otro factor importante en la caracterización de un estímulo de tipo *looming* es el contraste entre el objeto y el fondo. Un *looming* de mayor contraste con el fondo suele evocar respuestas con mayor probabilidad, y por lo tanto se infiere que representa un estímulo más saliente para el animal. Además, estudios previos demostraron que los peces cebra responden con mucha mayor probabilidad a discos oscuros aproximándose sobre un fondo blanco que a discos claros aproximándose sobre un fondo oscuro (Heap et al., 2018; Temizer et al., 2015; Yilmaz & Meister, 2013). Basados en estas observaciones, nuestro laboratorio ha estudiado la relación entre el contraste del *looming* con su fondo y la respuesta de escape en peces dorados (*Carassius auratus*) mostrando que la probabilidad de respuesta aumenta y su latencia disminuye cuanto mayor sea el contraste de un disco oscuro sobre un fondo claro (Martorell & Medan, 2021; Otero Coronel et al., 2020).

Los estímulos visuales fueron presentados mediante un módulo de pantalla OLED de 1.5 pulgadas (Waveshare) conectado a un microcontrolador Arduino Due. El estímulo fue programado en C++, con un *l/v* de 1 s, resultando en una fase de expansión de 25 segundos, seguida por un período de 10 segundos donde el círculo permaneció en su tamaño máximo.

Para modular la intensidad del estímulo visual, se ajustó el contraste del disco en expansión contra un fondo blanco constante. Elegimos expresar el contraste entre estos dos tonos de gris como el Contraste de Michelson (CM) (Michelson, 1927), definido como:

$$CM = (I_{fondo} - I_{disco}) / (I_{fondo} + I_{disco})$$

Este valor va entre 0 y 1, en donde 0 representa un disco cuyo brillo es igual al del fondo (y por lo tanto resulta invisible) y 1 representa un disco completamente negro expandiéndose sobre fondo blanco. En la fórmula del CM, I_{fondo} es la irradiancia del fondo (33 mW/m²) e I_{disco} es la irradiancia del disco en expansión. La irradiancia fue medida utilizando un fotómetro Tektronix J17 equipado con un sensor J1812.

Se definieron tres niveles de contraste visual: V_{min} (CM = 0.13), V_{med} (CM = 0.29) y V_{max} (CM = 0.59). En los experimentos de *imaging* (IMG-TEC y IMG-ROM), se utilizó V_{max} como estímulo visual, y en algunos casos se utilizó V_{min} para utilizar un estímulo visual de menor saliencia.

Estímulos auditivos

Diversos estudios han demostrado que la presentación de estímulos auditivos o vibracionales de carácter abrupto y explosivo producen respuestas de escape en peces cebra (Kimmel et al., 1974; Kohashi et al., 2012; Scaramella et al., 2022). Kohashi et. al., en 2012, encontraron que las larvas de peces cebra responden a este tipo de estímulos a partir de los 4 dpf, que el oído interno es necesario para que esas respuestas existan y que las células Mauthner están involucradas en la ejecución de las mismas. Trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros han demostrado que la probabilidad de evocar una respuesta de escape es función de la intensidad de estos sonidos breves y abruptos (Bhandiwad et al., 2013; Eaton et al., 1984; Martorell & Medan, 2021).

En todos los experimentos realizados en esta tesis, los estímulos auditivos emitidos consistieron en una única onda sinusoidal de 220 Hz, con una duración teórica de 4.5 ms, aunque la reverberación del estímulo en el entorno del animal extendió ese tiempo total. Los estímulos auditivos fueron producidos por un parlante (Thonet & Vander HK096-03451) colocado sobre una almohadilla de aislamiento de espuma y posicionado a 10 cm de la arena experimental. La intensidad de los estímulos se midió en aire utilizando un sonómetro (Yu Fung Modelo YF-20). La amplitud sonora se reportó en decibeles, una métrica que indica la presión producida por el sonido en relación con una presión de referencia (20 µPa en el caso de medirlo en aire). Esta amplitud depende del voltaje enviado por la fuente de generación del estímulo, que en nuestro caso fue un Arduino Due, del sistema de amplificación eléctrica posterior y de las características del parlante utilizado, particularmente su impedancia. Además, conectamos la salida del Arduino a un LED infrarrojo colocado dentro del campo visual de la cámara de registro del comportamiento, para poder identificar el fotograma exacto de estimulación auditiva.

Para modular la intensidad de los estímulos auditivos se varió la amplitud de la onda sinusoidal, definiendo tres niveles: A_{min} (60 dB), A_{med} (69 dB) y A_{max} (75 dB). En los experimentos de *imaging*, se utilizó A_{max} únicamente.

Estímulos multisensoriales y protocolo general de estimulación

Los estímulos multisensoriales consistieron en la presentación conjunta de un estímulo *looming* y un estímulo auditivo. Debido a que, por diseño, sus duraciones son muy distintas, (visual: 25 s; auditivo: en el orden de 20 ms) surge la pregunta de en qué momento durante la presentación del estímulo *looming* presentar el estímulo auditivo. Basados en resultados previos en peces dorados (Martorell & Medan, 2021) optamos por la configuración temporal que maximiza la probabilidad de evocar una respuesta de escape. Para ello, sincronizamos al estímulo auditivo con el final de la expansión del *looming*, de tal manera que el momento de mayor saliencia del estímulo visual (mayor tamaño y mayor velocidad angular) se produjera al mismo tiempo que el sonido.

La pantalla se ubicó siempre a 90° del parlante durante experimentos comportamentales (COMP, Figura 8A), y a 135° durante experimentos de *imaging* (IMG-TEC, IMG-ROM, Figura 8B). Esta diferencia, así como la razón para no alinear ambos estímulos en la misma dirección espacial, tiene que ver con las limitaciones estéricas de los *set-ups* experimentales, que requerían presentar ambos estímulos desde direcciones no coincidentes. Experimentos preliminares que serán discutidos más adelante (ver Capítulo 3) nos permitieron avanzar con esta disposición, sugiriendo que nuestro estímulo auditivo no posee un fuerte componente direccional para estos animales, y por lo tanto los estímulos no necesariamente son percibidos como espacialmente incongruentes.

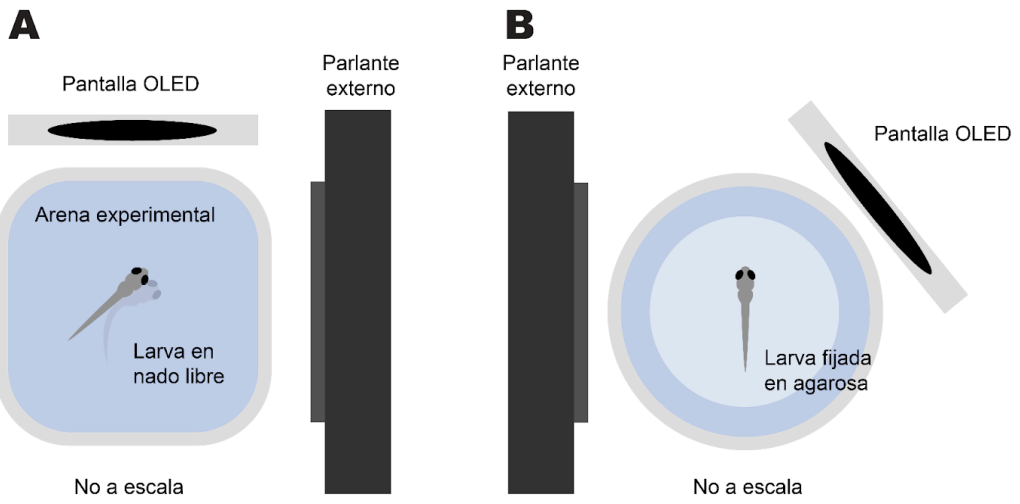


Figura 8. *Set-ups* experimentales para experimentos finales de comportamiento (A) y de *imaging* (B).

El protocolo general de estimulación involucró la presentación de estímulos unisensoriales, combinaciones multisensoriales y ensayos control en donde los animales no fueron

estimulados con ninguna de las dos modalidades (Figura 9A). Utilizamos 3 intensidades visuales y 3 intensidades auditivas, lo cual resultó en 6 estímulos unisensoriales y 9 estímulos multisensoriales (todas las combinaciones posibles, 3x3 estímulos) (Figura 9B). En experimentos comportamentales (COMP) los animales pasaron por las 15 condiciones de estimulación y un ensayo control en orden aleatorio, mientras que en experimentos de *imaging* (IMG-TEC, IMG-ROM) se utilizaron sólo los estímulos unisensoriales máximos (V_{max} y A_{max}), su combinación (número 3 en la Figura 9B) y la condición control. En todos los experimentos se permitió que los animales se aclimaten al dispositivo experimental por al menos 5 minutos antes de comenzar la secuencia de estimulación, y se dejó un tiempo entre estímulos fijo (40 s) (Figura 9A) para minimizar el efecto de la habituación, que fue medido y será reportado en el Capítulo 3.

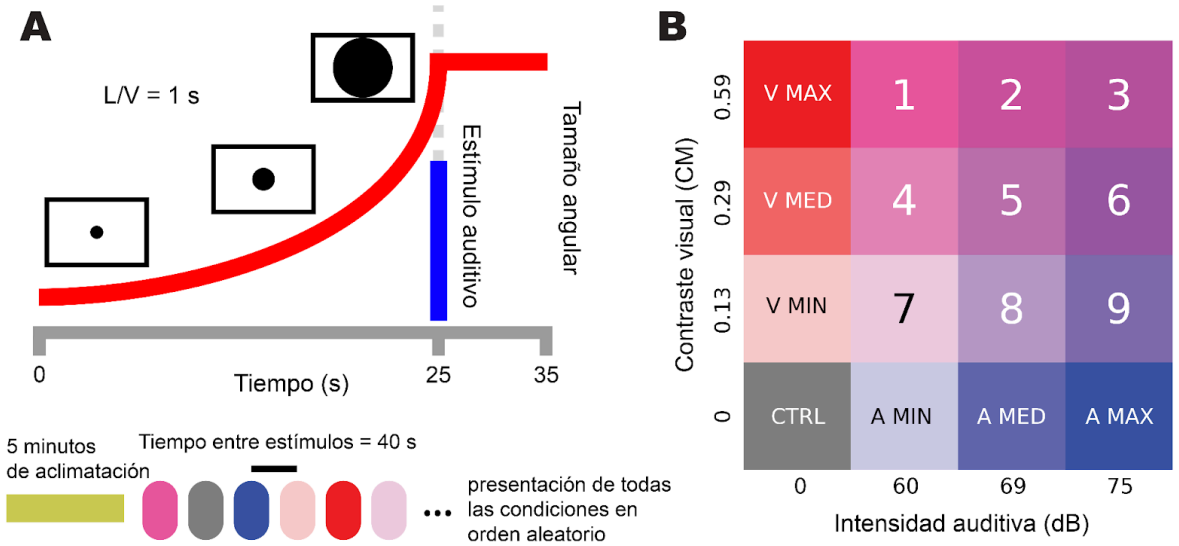


Figura 9. Protocolo de estimulación. (A) Coordinación temporal de estímulos visuales y auditivos para un ensayo multisensorial (arriba) y secuencia temporal de un experimento (abajo). (B) Matriz de estimulación representando las 16 condiciones utilizadas para los experimentos de comportamiento.

2.4 Registro del comportamiento y detección de respuestas evasivas

Los ensayos comportamentales se llevaron a cabo en una arena que consiste en un recipiente de plástico translúcido con fondo plano, de 40 x 40 x 7 mm, con un volumen de 7 ml (Figura 10B). La arena fue llenada con medio E3 y transiluminada utilizando una rejilla de LED infrarrojos (55 x 55 mm, 36 unidades LED) a través de un vidrio difusor opalescente para lograr una iluminación más uniforme.

Una cámara monocromática de alta velocidad (720 x 540 px, 437 fps, Blackfly BFS-U3-04S2M-CS, FLIR) equipada con un objetivo de 35 mm (59872, Edmund Optics) registró el comportamiento de las larvas desde arriba (Video 3). Todo el dispositivo comportamental se montó sobre una mesa antivibratoria y se rodeó con cortinas opacas para evitar estimulación visual no intencionada. Cada ensayo se registró como un video independiente con una duración de 35 segundos.

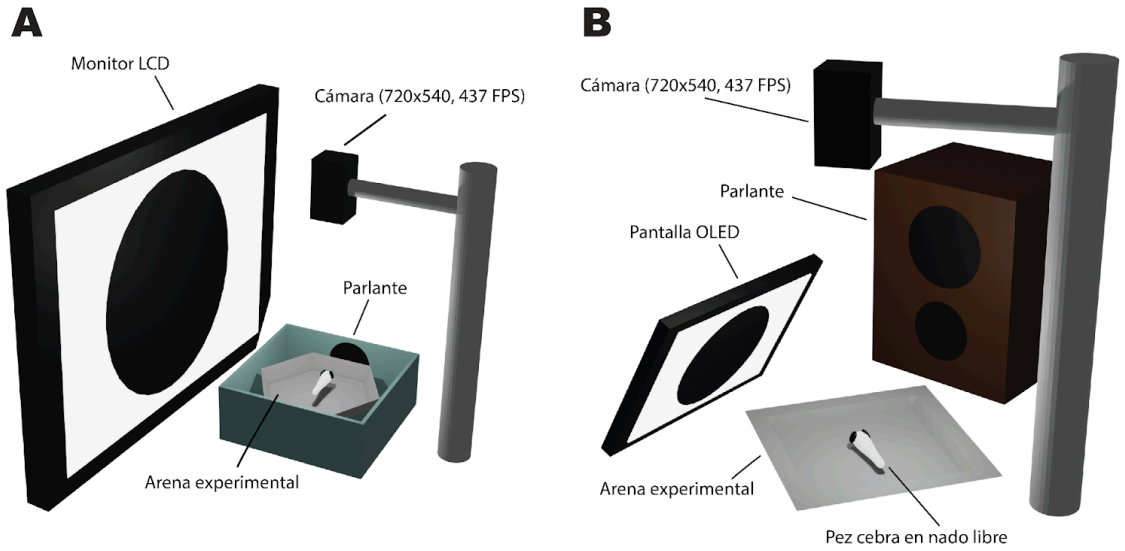


Figura 10. Diagrama del setup experimental comportamental, para experimentos preliminares (PRE-COMP, A) y experimentos finales (COMP, B).

Para experimentos comportamentales preliminares (PRE-COMP, Figura 10A), observadores expertos en el laboratorio miraron cada uno de los videos para identificar las respuestas de escape ejecutadas durante el período de estimulación. Para los estímulos visuales consideramos los escapes ocurridos en una ventana de 3 segundos antes y 2 segundos después del final de la expansión del *looming*. Para los estímulos auditivos, consideramos los escapes ocurridos en una ventana de 5 segundos posteriores a la ocurrencia del sonido. Para estímulos multisensoriales, utilizamos una ventana equivalente a la del estímulo visual.

Durante la observación de estos registros no se clasificaron las respuestas entre SLC y LLC, sino que se identificaron C-starts de manera general. Para diferenciar C-starts de otros comportamientos, se juzgó visualmente la torsión máxima del cuerpo del animal y el tiempo transcurrido entre el inicio y de la respuesta y la torsión inicial máxima.

Esta estrategia nos permitió calcular probabilidades y tiempos de respuesta para PRE-COMP. Sin embargo, proceder de esta manera excluye del análisis la riqueza comportamental de las respuestas evasivas de los peces cebra y no permite determinar los parámetros cinéticos de las respuestas de escape. Asimismo, el proceso de visualización de los videos es una tarea que no solo conlleva una enorme cantidad de tiempo sino que está sujeta a sesgos y errores humanos. Con el objetivo de resolver estos problemas, exploramos en esta tesis distintas estrategias de *tracking*, o seguimiento, de las imágenes de video para determinar la posición de los animales marco a marco.

Para realizar el seguimiento exitoso de un objeto o animal en un video debe contarse con un algoritmo que reconozca la posición de este objeto en cada uno de los fotogramas del video. Existen muchos tipos de algoritmos que logran esto con distintos grados de fidelidad y rapidez, provenientes del campo de la *visión computacional*. A grandes rasgos, estos métodos

se pueden clasificar entre algoritmos *basados en reglas* y algoritmos de *aprendizaje automático* (F. Chen et al., 2022). Los algoritmos basados en reglas utilizan características explícitas del objeto, como su color, forma, textura o movimiento, para identificarlo y seguirlo a lo largo del video. Estos métodos suelen ser más interpretables, pero pueden fallar si el entorno cambia, si hay oclusiones o si el objeto pierde las características distintivas que fueron reconocidas inicialmente. Por otro lado, los algoritmos de aprendizaje automático aprenden a identificar y seguir objetos a partir de grandes cantidades de datos etiquetados. Estos métodos son mucho más robustos ante variaciones en el entorno, iluminación o deformaciones del objeto, pero requieren más recursos computacionales y un esfuerzo de etiquetado previo por parte del experimentador.

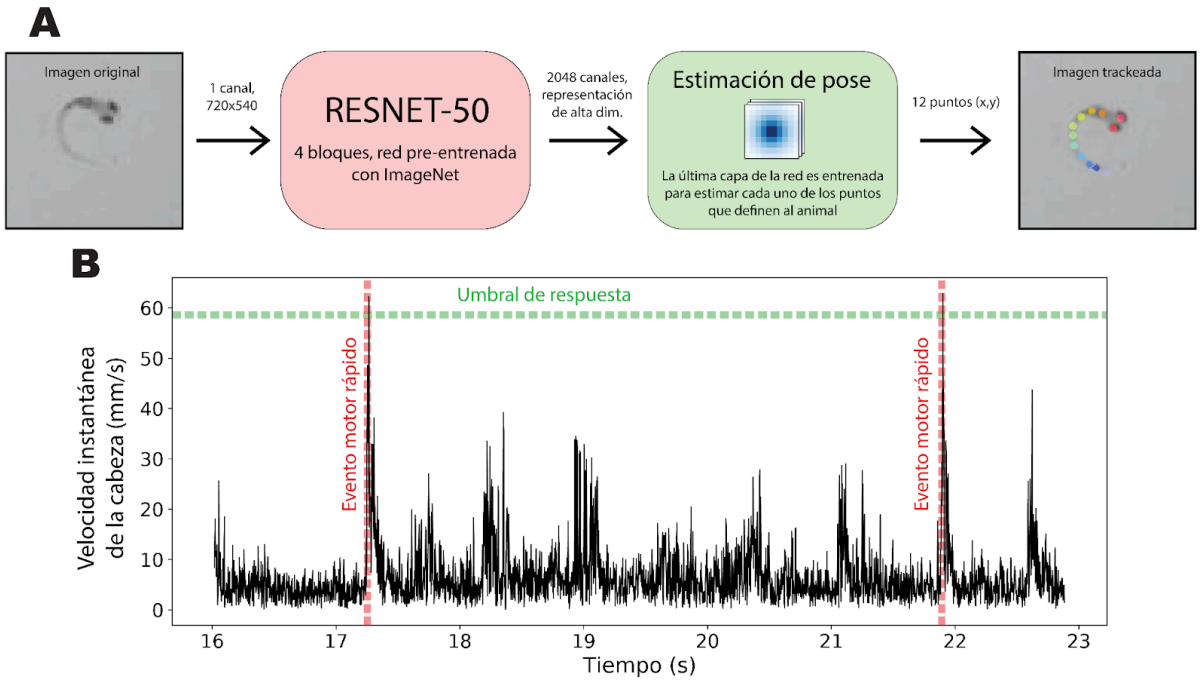


Figura 11. Seguimiento de larvas de pez cebra y determinación de eventos rápidos. (A) Algoritmo de aprendizaje automático utilizado para estimar la pose de los animales durante experimentos de comportamiento. (B) Ejemplo representativo de un registro de velocidad lineal de la cabeza. En verde se marca el umbral establecido para identificar respuestas rápidas, y en rojo se indica el comienzo de estas respuestas identificadas.

En esta tesis, exploramos ambos métodos de *tracking*. Esta exploración será detallada en el Capítulo 3. Sin embargo, finalmente decidimos utilizar un algoritmo de aprendizaje automático. En particular, utilizamos una Red Neuronal Convolucional (CNN, por sus siglas en inglés), entrenada a través de la interfaz proveída por DeepLabCut (Mathis et al., 2018), un proyecto de código abierto que facilita el entrenamiento y aplicación de CNNs para el *tracking* de animales experimentales.

La salida de este algoritmo, para cada video, es un conjunto de series temporales, para cada punto del animal previamente definido por el experimentador y reconocido por la CNN en cada fotograma. Es decir, el video es traducido a un conjunto de valores (x, y) que marcan la posición y postura del animal en cada momento. La CNN entrenada en esta tesis fue diseñada para identificar 12 puntos anatómicos de referencia: un punto para cada ojo, dos puntos para

la vejiga natatoria y ocho puntos a lo largo de la cola (Figura 11A). A partir de estos datos, fue posible calcular una diversidad de parámetros cinéticos, como la velocidad lineal de la cabeza, la aceleración angular de la cabeza o la curvatura total del cuerpo, a lo largo del tiempo.

A diferencia de otros peces, el comportamiento de los peces cebra no se caracteriza por un movimiento continuo, sino que sus movimientos son discretos, ocurren en eventos o *bouts* (Budick & O'Malley, 2000). A partir de los parámetros cinéticos calculados en base a los puntos estimados por la CNN, fue posible caracterizar y clasificar estos eventos de movimiento en la serie experimental COMP, que fueron identificados detectando picos en la serie temporal de la velocidad lineal de la cabeza (Figura 11B). Tras una inspección visual detallada de las grabaciones de video en paralelo a la serie temporal de la velocidad lineal, los eventos que excedieron un umbral de 58.6 mm/s fueron clasificados como respuestas rápidas. Estas respuestas rápidas fueron caracterizadas por diversos parámetros cinéticos y fueron descritas y clasificadas utilizando técnicas de reducción de dimensionalidad que serán detalladas en el Capítulo 3.

2.5 Cuantificación de la integración multisensorial

Existen diversas maneras de medir el efecto de la integración multisensorial. La elección de la métrica utilizada depende del objetivo de análisis, de los estímulos elegidos y otros factores que han sido ampliamente discutidos en la bibliografía (Stevenson et al., 2014). La complejidad de esta cuantificación radica en que el resultado de la estimulación multisensorial debe ser comparado contra la respuesta evocada por cada uno de los componentes unisensoriales presentados por separado, en este caso dos. Una estrategia posible es comparar la respuesta multisensorial contra la suma de las respuestas unisensoriales. Esta aproximación resulta en la identificación de mejoras *sublineales*, *lineales* y *supralineales*, como fue discutido en el Capítulo 1. Sin embargo, esta métrica no resalta el contraste entre una mejora y una depresión multisensorial (ya que una mejora *sublineal* podría seguir siendo un aumento de la respuesta en comparación con los componentes unisensoriales).

Aún más, la comparación contra la suma lineal de las respuestas unisensoriales pierde su sentido cuando el resultado de la estimulación se mide como probabilidad de respuesta. En este caso, la adición de dos probabilidades puede superar el 100%, anulando la validez de la comparación contra la suma lineal de las mismas. Una solución es no utilizar la suma lineal, sino aplicar la ley de probabilidades de eventos independientes, que estipula que la probabilidad de ocurrencia de dos eventos independientes puede calcularse como la suma de las probabilidades de ambos eventos menos su producto. En el caso de las probabilidades de respuesta a un estímulo visual (*p(v)*) y un estímulo auditivo (*p(a)*), esto podría expresarse como:

$$p(v+a) = p(v) + p(a) - p(v) * p(a)$$

en donde *p(v+a)* es la probabilidad de respuesta esperada frente a un estímulo multisensorial que combine ambos componentes si no existiera ningún tipo de integración entre las dos señales, es decir, si ambas respuestas fueran eventos independientes. Cuando *p(v+a)* supera este valor esperado, se interpreta que existe una mejora multisensorial, mientras que si *p(v+a)* es menor a ese valor se identifica como una depresión multisensorial.

Un problema con esta métrica es que resulta relativamente exigente como definición de integración multisensorial. En la práctica, el procesamiento de dos fuentes de estimulación nunca es independiente, como tampoco lo es la respuesta comportamental resultante. Un animal no puede ejecutar dos comportamientos distintos a la vez, y los comportamientos suelen tener períodos refractarios y de habituación, por lo que el estado interno del animal y su pasado reciente marcan límites en el grado de independencia que dos estímulos simultáneos pueden alcanzar, incluso cuando no existe integración multisensorial de manera directa. Por otro lado, incluso cuando la respuesta multisensorial es menor que este valor "esperado", puede ser mayor que la respuesta evocada por cualquiera de los dos componentes, y esto puede tener un valor adaptativo para el animal, aún si no demuestra una sinergia entre ambos estímulos. Estos aumentos, posiblemente relevantes, quedan ocultos por esta métrica (Stevenson et al., 2014).

Una solución es tomar a la máxima respuesta unisensorial como punto de comparación, y contrastar con este valor la respuesta multisensorial. En este esquema, cualquier aumento en la respuesta multisensorial será considerado una mejora. Esta estrategia ha sido ampliamente usada en la bibliografía (Meredith & Stein, 1983, 1986), contando con la ventaja de que puede ser usada a través de contextos distintos con igual validez (para probabilidades de respuesta comportamentales, para frecuencias de potenciales de acción, para proporción de neuronas activas, etc). En esta tesis, en casi todos los casos, esta fue nuestra elección como punto de referencia para comparar las respuestas multisensoriales. Sin embargo, es necesario ser cautelosos con las interpretaciones que se desprenden de estas comparaciones, ya que las "mejoras multisensoriales" pueden ser, en algunos casos, simples conjunciones de respuestas a estímulos distintos cuyo procesamiento no se cruza, en vez de ser el resultado de procesos de integración.

Para cuantificar el grado de integración, tanto para respuestas comportamentales como neuronales, definimos el *índice de Integración Multisensorial*, o IM:

$$IM = (r(multi) - r(max\ uni)) / (r(multi) + r(max\ uni))$$

donde *r(multi)* representa la respuesta al estímulo multisensorial, y *r(max uni)* representa la respuesta al estímulo unisensorial que produjo una mayor respuesta. Es importante señalar que la elección de un máximo unisensorial no implica la afirmación de que las respuestas unisensoriales sean estadísticamente distintas entre ellas, sino que permite comparar la respuesta multisensorial con la unisensorial que resultó más alta en la muestra analizada.

Estas respuestas pueden representar probabilidades de escape, cantidad de neuronas activas, fluorescencia o cualquier parámetro que utilicemos para cuantificar la respuesta a la estimulación. Un valor IM cercano a cero indica que la respuesta obtenida es equivalente a la máxima unisensorial, es decir que no se observa ni una mejora ni una supresión multisensorial. Un valor IM positivo indica que la respuesta obtenida es mayor que la máxima unisensorial, lo cual consideramos una mejora multisensorial, ya que se alcanzan valores de actividad que se logran solo si los estímulos son presentados en conjunto.

2.6 Técnicas de microscopía para el registro de la actividad neuronal

Para registrar la actividad neuronal en peces cebra utilizamos líneas transgénicas que expresan en sus neuronas un sensor fluorescente que permite observar cambios en la concentración intracelular de calcio. GCaMP es una familia de proteínas modificadas genéticamente que combinan una proteína fluorescente verde (GFP) con una proteína sensible al calcio (calmodulina) (Nakai et al., 2001). Cuando una neurona se activa, se produce una entrada de iones de calcio al interior celular, induciendo un cambio conformacional en la proteína GCaMP que intensifica su fluorescencia. De esta manera, los cambios en la intensidad de la luz fluorescente emitida por la proteína funcionan como un indicador indirecto de la actividad eléctrica de las neuronas. Para excitar a las GCaMP se utiliza luz azul, típicamente cerca de los 488 nm. Esta luz es absorbida por la proteína, que en respuesta emite luz en el rango del verde. Existen diferentes tipos de proteínas GCaMP que varían en su sensibilidad a los cambios en la concentración de calcio y en la velocidad con la que responden a dichos cambios. En este trabajo utilizamos específicamente la variante GCaMP6f (T.-W. Chen et al., 2013), que se caracteriza por tener una cinética relativamente rápida, con un tiempo de ascenso de aproximadamente 50 a 75 milisegundos, lo que la hace adecuada para detectar eventos neuronales de corta duración. En nuestros animales, esta proteína se expresa en las neuronas bajo el control transcripcional del promotor HuC (también conocido como *elavl3*), lo que asegura una expresión panneuronal en el cerebro del pez cebra (Park et al., 2000). Esta variante de GCaMP resultó apropiada para nuestros propósitos experimentales, ya que su rapidez y sensibilidad se ajustan bien a la velocidad de adquisición de imágenes que empleamos y al tipo de eventos de actividad neuronal que buscamos registrar.

Para registrar la actividad neuronal medida con este marcador se utilizan técnicas de microscopía de fluorescencia, que combina fuentes de excitación (luz azul) con filtros ópticos que solo dejan pasar la luz emitida por la proteína (verde). En un microscopio de epifluorescencia común, todo el volumen de la muestra es iluminado al mismo tiempo, lo cual produce la excitación simultánea del marcador en todo el tejido (Jensen, 2012). Esto es problemático cuando el objetivo es medir la actividad de neuronas individuales, ya que la luz proveniente de distintas partes del tejido (por ejemplo, de capas superiores o inferiores al plano observado) puede interpretarse equívocamente como actividad de la neurona analizada.

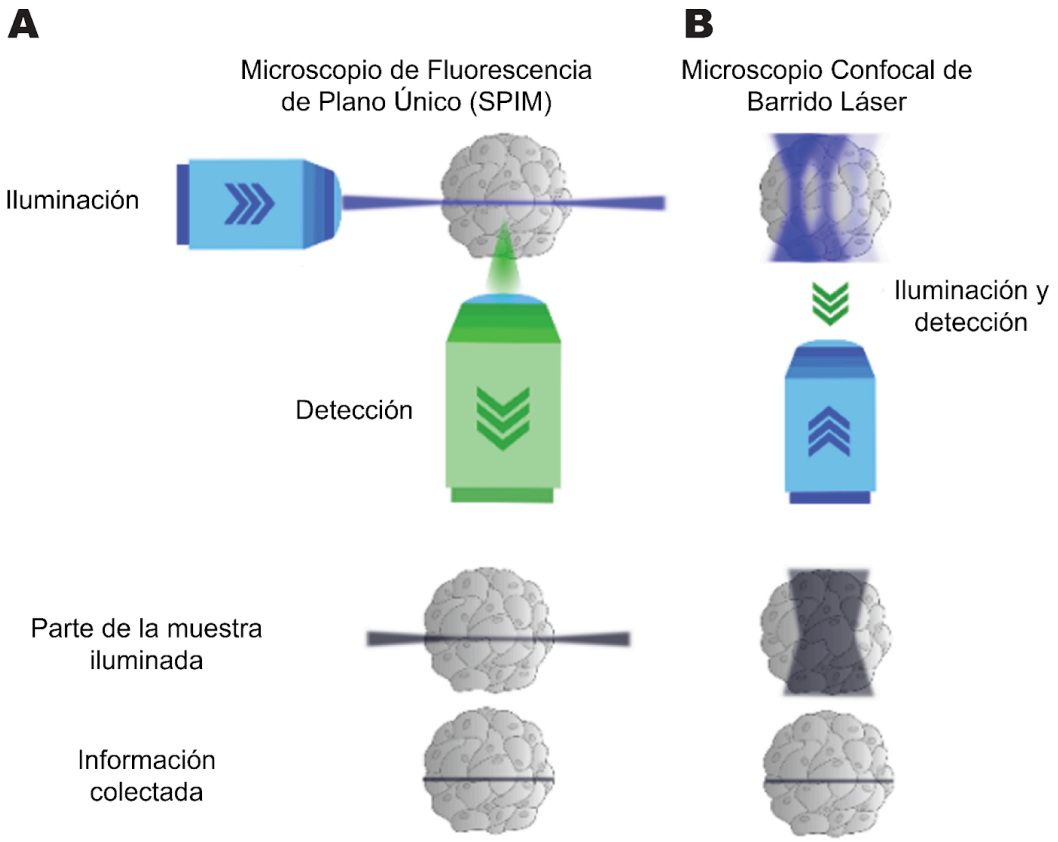


Figura 12. Diferencias entre la microscopía confocal (B) y la microscopía de plano único (SPIM, A). Figura adaptada de www.bruker.com, "Why choose a light sheet microscope".

Una solución a este problema es utilizar microscopía confocal de barrido. En este tipo de microscopía, un haz láser enfocado ilumina secuencialmente (barre) pequeñas regiones del volumen, típicamente con forma de columna cilíndrica (Jensen, 2012). La fluorescencia emitida desde la región excitada es recolectada a través de un orificio, o *pinhole*, el cual bloquea gran parte de la luz proveniente de planos que se encuentran fuera de foco (Figura 12B). Esto permite obtener una imagen con mayor contraste y resolución axial. Repitiendo este escaneo a través de múltiples puntos del plano, el sistema reconstruye una imagen bidimensional de la muestra con una resolución espacial superior a la obtenida con un microscopio de epifluorescencia. Sin embargo, dado que la muestra se excita y se detecta punto por punto, la adquisición de imágenes es relativamente lenta, lo que impone una limitación a la resolución temporal alcanzable durante el registro de señales dinámicas.

La microscopía de plano único (SPIM, por sus siglas en inglés) apunta a resolver este desafío, permitiendo registrar la actividad neuronal con alta resolución espacial sin sacrificar la resolución temporal (Huisken et al., 2004). En esta técnica, la muestra se ilumina lateralmente con una delgada lámina de luz que excita únicamente una sección específica del tejido, correspondiente al plano focal del sistema de detección (Figura 12A). A diferencia de la microscopía confocal de barrido, que ilumina y registra punto a punto, la microscopía de tipo SPIM ilumina y capta un plano entero de manera simultánea, lo cual acelera considerablemente la adquisición de imágenes.

Preparación de las larvas para registros de imágenes de calcio

Las larvas utilizadas en estos experimentos fueron mantenidas en medio E3 estándar a 28 °C en condiciones de incubación controladas. A los 3 dpf, se seleccionaron bajo lupa estereoscópica equipada con luz fluorescente a las larvas que mostraban un nivel de expresión fluorescente adecuada para los experimentos de *imaging* de calcio.

Previo al montaje, las larvas fueron anestesiadas utilizando tricaína 0.2% (MS-222, Sigma) en medio E3. La anestesia permite realizar el proceso de montaje sin causar daño. Las larvas se mantuvieron en esta solución por no más de 30 minutos antes de ser incorporadas al medio de agarosa.

Para los registros de imágenes adquiridos mediante microscopía confocal, las larvas fueron embebidas en agarosa de bajo punto de fusión (4% m/v en E3, A9414-25G, Sigma). Las larvas anestesiadas fueron trasladadas a una placa de Petri de 6 cm, utilizando una pipeta Pasteur. Luego se vertió agarosa líquida sobre la larva y, utilizando una pipeta de punta roma, se posicionó al animal con su cara dorsal hacia arriba. Una vez solidificada la agarosa (aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente), se añadió medio E3 sobre el gel para mantener la hidratación. Las larvas pueden sobrevivir en estas condiciones hasta 24 hs durante la primera semana post-fecundación.

Protocolo de estimulación

En esta tesis, para todos los experimentos de *imaging* realizados en nuestro laboratorio (Capítulos 5 a 8, IMG-TEC e IMG-ROM) utilizamos un microscopio confocal (Zeiss LSM-900) equipado con un objetivo de inmersión en agua de 20× (Zeiss W N-ACHROPLAN 420957). Se usó un láser de 488 nm para excitar las muestras, y la emisión se recolectó a través de un espejo dicroico de 509 nm y un filtro de emisión de 490-620 nm utilizando un detector GaASP-PMT. Por otro lado, los experimentos realizados fuera del laboratorio (Capítulo 9, IMG-SPIM) utilizaron un microscopio de tipo SPIM, en el laboratorio de Germán Sumbre, en el IBENS, École Normale Supérieure de París, Francia. En este sistema, se utilizó un láser de 488 nm (Phoxx 480-200, Omicron). El haz fue expandido y escaneado mediante espejos galvanométricos y enfocado a través de un objetivo de baja apertura numérica (UPlan SAPO 4×, NA 0.16, Olympus) para formar una hoja de luz de 1 mm de ancho y 3.2 μm de grosor. La fluorescencia emitida fue recolectada ortogonalmente usando un objetivo de inmersión en agua de alta NA (Nikon N16XLWD-PF, 16×, NA 0.8), un conjunto de filtros (NF03-488, FF01-525/50, FF01-680SP25, Semrock) y una cámara sCMOS (Orca Flash 4.0, Hamamatsu). La adquisición volumétrica fue realizada en 40 planos coronales espaciados 5 μm, con una exposición de 10 ms por plano, lo que permitió una tasa de adquisición de 2 Hz.

Para los experimentos realizados en microscopio confocal, se presentaron estímulos unisensoriales (un estímulo visual, CM = 0.59, un estímulo auditivo, 75 dB) y su combinación multisensorial, además de una condición control en la que no se realizó ningún tipo de estimulación. En casos puntuales que se discutirán más adelante, se presentaron estímulos adicionales. Cada condición fue presentada un total de 5 veces por experimento, y el orden general de presentación fue aleatorizado. En cada ensayo de estimulación se registró un único plano a 4.3 Hz, en videos de 256 x 256 píxeles. Se realizaron entre una y dos series experimentales completas, registrando planos distintos cuando se realizan dos series experimentales, elegidos dentro del rango del eje dorso-ventral en el que el Tectum es visible (en el caso de IMG-TEC). Además, para todos los planos registrados se adquirió una imagen de referencia, o templado, adquirida a menor velocidad y mayor resolución (1024 x 1024 píxeles). Adicionalmente, registramos una imagen volumétrica del cerebro de cada animal (512 x 512 píxeles, 101 planos, 3 μm entre planos) incluyendo el Tectum completo, con el objetivo de ubicar los registros adquiridos en el espacio definido por un atlas cerebral de referencia (Capítulo 5).

Los videos resultantes de cada ensayo fueron procesados para corregir artefactos de movimiento (momentos en los que la imagen se desplazaba visiblemente como consecuencia del movimiento del animal, principalmente debido a eventos motores y a cambios en la estructura de la matriz de agarosa). Para la corrección de movimiento se utilizó la biblioteca CaImAn (Giovannucci et al., 2019), en Python, que contiene un algoritmo de corrección de movimiento específicamente diseñado para registros de *imaging* de calcio. Este algoritmo alinea cada fotograma a un templado de referencia, que en nuestro caso fue tomado antes de comenzar la secuencia de estimulación. Se admite cierto grado de movimiento en los planos x e y (es decir, desplazamientos horizontales dentro del mismo plano de enfoque), ya que estos pueden ser corregidos eficazmente por el algoritmo. Sin embargo, el movimiento en el eje z (es decir, en profundidad) no puede ser corregido, ya que implica un cambio en el plano focal que altera significativamente la calidad de la señal de fluorescencia y la identificación precisa de las neuronas. Por esta razón, los registros que presentaron desplazamientos considerables en el eje z fueron descartados. Aproximadamente un 25% de los experimentos fueron eliminados debido a esta limitación.

A su vez, el templado fue utilizado para definir regiones cerebrales de interés (PVL, neuropilo tectal, Rombencéfalo) y para la detección semi-automática de regiones de interés (ROIs, por sus siglas en inglés), correspondientes a los somas de neuronas individuales. Este proceso será descrito en más detalle en el Capítulo 5.

Para cada ROI detectado en la imagen se calculó el brillo promedio en cada fotograma, lo cual permitió obtener una serie temporal de la fluorescencia promedio de cada ROI en cada ensayo. Sin embargo, utilizar esta serie temporal cruda para estimar actividad neuronal es problemático. Por un lado, la fluorescencia absoluta observada puede variar entre ROIs, por diversas razones. El nivel de expresión del marcador GCaMP6f puede ser distinto en distintas neuronas. Además, la luz proveniente de neuronas que se encuentren a mayor profundidad en el tejido será más atenuada. Por otro lado, la fluorescencia basal proveniente de una misma

neurona puede variar en el tiempo. Esto puede deberse a otros procesos dependientes de calcio que suceden en la célula y que alteran la intensidad de la fluorescencia en escalas de minutos u horas (Russell, 2011). Además, durante el registro, la excitación continua del tejido puede resultar en un fenómeno denominado fotoblanqueado (o *photobleaching)*, en el que la fluorescencia emitida por el marcador disminuye progresivamente con el tiempo, independientemente de la actividad neuronal, como consecuencia de la degradación fotoquímica de las moléculas fluorescentes (Diaspro et al., 2006).

Para mitigar estas fuentes de variabilidad, la señal se normaliza utilizando una medida relativa de cambio de fluorescencia, comúnmente expresada como ΔF/F. En esta métrica, F representa el nivel de fluorescencia en un momento dado, mientras que F_0 corresponde a un valor de referencia de fluorescencia basal. Al calcular $(F - F_0)/F_0$ se obtiene una estimación proporcional del cambio de fluorescencia respecto a la línea base, lo cual permite comparar respuestas entre diferentes neuronas o condiciones experimentales, independientemente de sus niveles absolutos de fluorescencia. Una decisión crucial para el cómputo de este indicador es la elección de F_0. Si bien exploramos diversas estrategias que serán detalladas en el Capítulo 5, finalmente calculamos F_0 como el percentil 8 de una ventana de 60 cuadros precedente al cuadro actual, en concordancia con bibliografía previa (Romano et al., 2015).

El ΔF/F es una medida cuantitativa y proporcional a la actividad neuronal (T.-W. Chen et al., 2013). Sin embargo, muchas veces es útil contar con una estimación binaria de si una neurona en particular se activó o no frente a un protocolo de estimulación. Para lograr esta binarización, establecimos un umbral de 1.2 desvíos estándar por sobre la media del ΔF/F de cada ROI, y clasificamos como activo a ese ROI en los fotogramas en los que su ΔF/F superó ese umbral. Determinamos que un ROI respondió a un estímulo cuando fue clasificado como activo en al menos un fotograma dentro de una ventana de 2.8 segundos posterior al último fotograma de la expansión visual en los ensayos únicamente visuales o al tiempo de la estimulación auditiva en los ensayos únicamente auditivos y los multisensoriales. Esta ventana de 2.8 segundos (equivalente a 12 cuadros) fue elegida en base a la observación de registros preliminares (Capítulo 5). Los ROIs inactivos durante toda la sesión de registro fueron excluidos de todos los análisis.

2.7 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando Python (v3.9), apoyándose en librerías comunes y de código abierto como SciPy, NumPy y Statsmodels. La significancia estadística fue evaluada a un umbral de $\alpha = 0.05$. Se utilizaron Modelos Lineales Generalizados (GLMs) binomiales para evaluar los efectos de los estímulos visuales y auditivos en las probabilidades de respuesta de escape. Para comparar pares de condiciones, se decidió utilizar estadística no paramétrica siempre que fuese posible para que los resultados no dependan de suponer distribuciones específicas para los datos obtenidos. Se utilizaron Pruebas de Rangos con Signo de Wilcoxon para comparar condiciones pareadas, mientras que las pruebas no pareadas se realizaron utilizando pruebas U de Mann-Whitney.

Para comparar proporciones, se utilizaron Pruebas Z de proporciones. Las barras de error representan el error estándar a menos que se especifique lo contrario. Los gráficos y visualizaciones fueron generados utilizando las librerías Matplotlib y Seaborn.

Cuando se realizaron múltiples comparaciones dentro de un mismo análisis, se optó por realizar directamente las comparaciones individuales ajustando los p-valores mediante la corrección de Bonferroni, en lugar de aplicar una prueba global (como ANOVA o Kruskal–Wallis) previamente. Esta decisión se basa en literatura metodológica que sostiene que el test global no es un prerrequisito lógico ni estadístico para realizar comparaciones específicas, siempre que se controle adecuadamente la tasa de error de tipo I (Ruxton & Beauchamp, 2008). Esta literatura señala que, si existe un marco teórico que guía y acota las comparaciones que se desean hacer, es preferible prescindir de pruebas globales, realizar solo los tests pertinentes y controlar el error de tipo I con correcciones por múltiples comparaciones.

En casos en los que se utilizaron técnicas de reducción de dimensionalidad no lineal, como t-SNE o Kernel-PCA, siempre se realizó una exploración previa de distintas técnicas, y parámetros dentro de cada una de esas técnicas, y se eligió la metodología que permitió preservar la estructura de interés en los datos de baja dimensión de manera más efectiva. En casos en los que se utilizaron técnicas de *clustering* una exploración previa similar fue realizada. Es importante señalar que no utilizamos en ningún caso técnicas de *clustering* para sacar conclusiones sobre la identidad de distintos grupos de datos, sino que nos basamos en agrupamientos evidentes de los puntos analizados y utilizamos técnicas de *clustering* como herramienta para segmentar esos datos en grupos relativamente compactos, y explorar si estos grupos se diferencian en variables relevantes para nuestras preguntas biológicas.

2.8 Inteligencia artificial como copiloto de análisis

Durante el desarrollo de esta tesis, las herramientas de inteligencia artificial generativa, y particularmente los grandes modelos de lenguaje (LLMs, por sus siglas en inglés) demostraron una capacidad de comprender y resolver problemas complejos, especialmente en los campos de lógica, matemática y programación. Esto permitió que el diseño de código, análisis estadísticos, gráficos y otras aplicaciones de interés para la investigación científica pueda realizarse de manera mucho más rápida y eficaz. Incluso cuando los LLMs ofrecen respuestas imperfectas, tomar esas respuestas como punto de partida permite acelerar significativamente el proceso de análisis estadístico y visualización de los datos.

En esta tesis, se utilizaron herramientas de inteligencia artificial generativa con este propósito. En una gran proporción de los casos, el código de Python utilizado para los análisis estadísticos y la visualización de los datos fue generado por ChatGPT (OpenAI), por Claude (Anthropic) o por Gemini (Google). Este código fue siempre revisado cuidadosamente y corregido cuando fue necesario. A su vez, algunos de los fragmentos más técnicos de esta tesis fueron escritos con ayuda de ChatGPT, aunque representan un

porcentaje muy minoritario del texto total y fueron en todos los casos adaptados para que exista una concordancia de estilo con el resto de la tesis.

CAPÍTULO 3: DESARROLLO DE UN PARADIGMA COMPORTAMENTAL PARA EVALUAR LA RESPUESTA DE ESCAPE EN PECES CEBRA

3.1 Calibración y selección de estímulos visuales

En esta tesis se utilizaron siempre estímulos visuales de tipo *looming*, tanto para experimentos comportamentales como para experimentos de *imaging*, donde un disco oscuro se expandió en todos los casos sobre un fondo claro. Este fondo siempre fue blanco, a excepción de los experimentos tratados en el Capítulo 9. Los únicos parámetros que variaron fueron el tono de gris del disco en aproximación (lo cual regula el contraste del disco con el fondo) y la dinámica de expansión del disco, descrita con el parámetro denominado *l/v* (Sección 2.3, Capítulo 2).

Sin embargo, el trabajo de selección de los estímulos visuales comenzó antes de su variación sistemática. En particular, el primer desafío fue la selección de una fuente de estimulación que permitiera presentar esta clave de manera de evocar escapes de una manera robusta. Estudios previos han demostrado que el tamaño angular máximo que despliega el estímulo visual sobre la retina del animal es un parámetro clave (aunque no el único) para la ejecución de respuestas de escape en peces y otras especies (Domenici, 2002; Temizer et al., 2015; Wang & Frost, 1992; Yilmaz & Meister, 2013).

En experimentos comportamentales preliminares, comenzamos usando una pantalla LED (MPI 5001) de 10.9 x 6.5 cm, ubicada a 8 cm de la arena experimental, logrando un ángulo subtendido máximo de 38°. Sin embargo, encontramos que esta pantalla producía probabilidades de respuesta relativamente bajas (nunca mayores al 40%, y usualmente rondando el 10%). Esto podría deberse a que no conseguimos generar contrastes suficientemente altos (las pantallas de tipo LED o LCD funcionan retroiluminado una serie de píxeles que actúan como filtros de esta luz, lo cual significa que las zonas oscuras de la imagen están parcialmente contaminadas por esta fuente de iluminación general). Otra explicación podría ser que, debido a su tamaño reducido, el ángulo máximo subtendido fue insuficiente, aunque reportes previos reportaban tasas de escape altas cuando el looming supera 35° de ángulo subtendido (Figura 7B-C) (Bhattacharyya et al., 2017).

Con el objetivo de mejorar la fuente de estimulación visual, cambiamos la pantalla por un monitor LCD (LG 24MN42A) de 52 x 30 cm, ubicado a 8.5 cm de la arena experimental, logrando un ángulo subtendido máximo de 116°. En este caso, logramos alcanzar el 60% de respuesta, una mejora sustancial respecto a la pantalla anterior. En estas condiciones, variamos sistemáticamente el *l/v* y el contraste del estímulo, con el objetivo de caracterizar cómo estos parámetros modulaban la ejecución de respuestas evasivas en nuestro dispositivo (serie experimental PRE-COMP).

En primer lugar, variamos la dinámica de expansión del *looming* (*l/v*), registrando el comportamiento como fue descrito en el Capítulo 2 e identificando los escapes mediante el análisis visual de los videos. En estos experimentos, variamos el valor de *l/v* desde 0.05 (expansión muy rápida) hasta 1.0 (expansión relativamente lenta) utilizando el contraste máximo (0.98). Como puede observarse en la Figura 13A, estímulos más lentos evocan

respuestas de escape con menor probabilidad (GLM binomial, Respuesta ~ l/v, coef = -1.12, p = 0.005). Esto difiere con lo reportado en la bibliografía (25% de respuesta para *l/v* de 0.19 s hasta un 70% de respuesta para *l/v* de 1.11 s, Figura 7C) (Bhattacharyya et al., 2017; Temizer et al., 2015). El estímulo de *l/v* = 0.05 s fue el más efectivo en estos experimentos preliminares (52% de respuesta), aunque los estímulos más lentos también son capaces de evocar respuestas (29% y 34% de respuesta para *l/v* de 1 s y de 0.4 s, respectivamente).

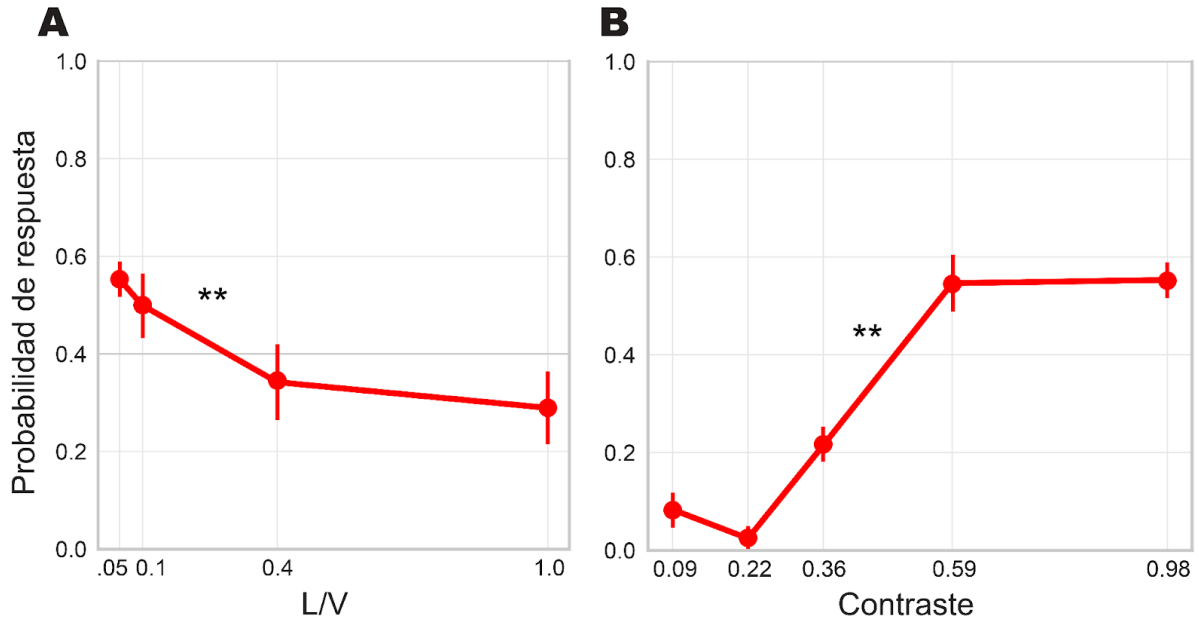


Figura 13. Calibración del estímulo visual en experimentos preliminares. (A) Probabilidad de respuesta de escape en función de la dinámica de expansión (l/v) del estímulo visual (N = 207, n = 322, 9-30 dpf). (B) Probabilidad de respuesta de escape en función del Contraste de Michelson entre el disco en expansión y un fondo blanco (N = 255, n = 554, 9-39 dpf).

En estos mismos experimentos preliminares variamos el contraste del disco con el fondo. Probamos valores de contraste de Michelson en un rango desde 0.09 hasta 0.98. Como se observa en la Figura 13B, estímulos de mayor contraste son más efectivos evocando respuestas de escape (GLM binomial, Respuesta ~ Contraste, coef = 2.60, $p < 0.001$). Contrastes por debajo de 0.36 no evocan prácticamente respuestas mientras que un contraste de 0.60 o 0.98 son equivalentes. Esto concuerda con estudios previos de nuestro laboratorio realizados en peces dorados (Martorell & Medan, 2021; Otero Coronel et al., 2020), demostrando que también en peces cebra el contraste visual tiene una relación con la saliencia de los estímulos.

Con estos experimentos preliminares, caracterizamos la relación entre el contraste, el *l/v* y la probabilidad de respuesta de escape. Sin embargo, una vez que comenzamos a planificar experimentos de *imaging* enfrentamos un inconveniente. Por su tamaño, el monitor LCD utilizado como fuente de estimulación en estos experimentos comportamentales no podía ser ubicado en el microscopio confocal. Para los experimentos de microscopía debimos utilizar una pantalla OLED (Waveshare 1.5 Inch OLED Module), de 2.8 x 2.8 cm. Si bien su tasa de refresco es mucho menor que la alcanzada con el monitor LCD (2 Hz - 15 Hz vs 60 Hz), su

tecnología OLED permite alcanzar negros mucho más oscuros, y su pequeño tamaño posibilita su uso en conjunto con el microscopio confocal apoyándola diectamente sobre la platina durante experimentos de *imaging* (Figura 8). Sin embargo, para poder comparar estos experimentos con los resultados comportamentales, repetimos los ensayos de comportamiento utilizando esta pantalla OLED (serie experimental COMP).

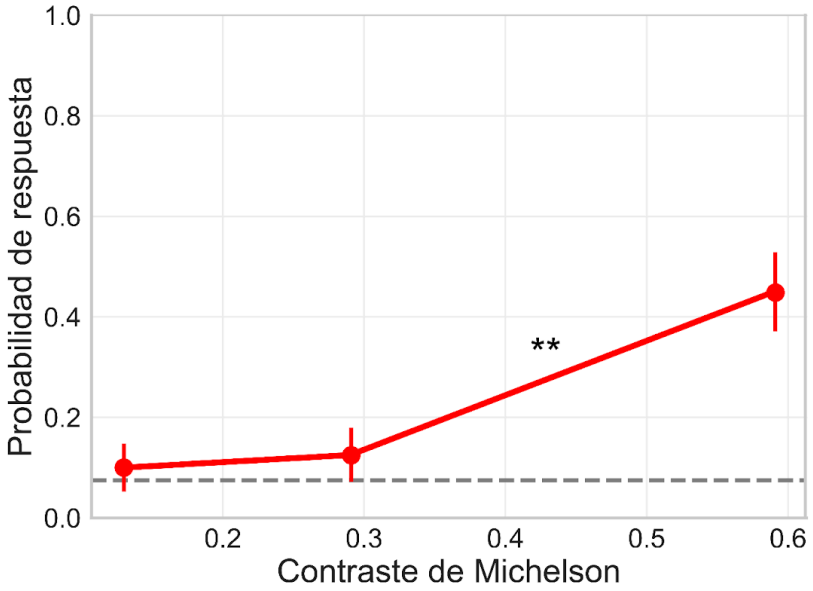


Figura 14. Probabilidad de respuesta unisensorial para estímulos visuales en función del contraste del disco contra el fondo (CM) (N = 40, n = 120, 4-7 dpf). La línea horizontal punteada marca la probabilidad de respuesta durante ensayos control, sin estimulación.

Dado que esta pantalla contaba con una tasa de refresco más baja, no fue posible utilizar estímulos rápidos (l/v = 0.05) que en las calibraciones previas habían demostrado producir mayores probabilidades de respuesta. En cambio, usamos *loomings* lentos (l/v = 1.0) que podían reproducirse de manera relativamente fluida en esta pantalla y habían demostrado evocar respuestas, aunque con menor probabilidad. En estos nuevos experimentos variamos el contraste del disco con el fondo entre un CM de 0.13 hasta uno de 0.59 (Figura 14), nuevamente encontrando que estímulos visuales de mayor contraste son más efectivos en evocar respuestas evasivas (GLM binomial, Respuesta ~ Contraste, coef = 0.41, $p < 0.001$). El estímulo de mayor contraste (CM = 0.59) evocó respuestas en un 45% de los animales.

Una vez elegida la pantalla y los estímulos finales (ver Figura 9), nos preguntamos si la posición de los animales respecto a la pantalla tendría un efecto sobre sus respuestas, dado que, al nadar libremente en la arena experimental, no controlamos la ubicación de los peces al momento de estimulación. Para determinar si la posición de los animales respecto de la pantalla influenciaba la probabilidad de responder, comparamos la distribución de distancias a la pantalla al momento del escape con una distribución de posiciones elegidas en momentos al azar. Como puede observarse en la Figura 15A, encontramos que peces que se encuentran más cerca de la pantalla ejecutan escapes con mayor probabilidad (Prueba U de Mann–Whitney, distribución real contra distribución nula: $p < 0.001$). También, en base a la

distribución nula, se puede observar que los peces muestran un sesgo (menor) hacia encontrarse más cerca de la pantalla en momentos elegidos al azar. Además, se observa un efecto del ángulo del eje del animal respecto a la pantalla: animales que miran hacia el estímulo visual más directamente responden más frecuentemente (Figura 15B, Prueba U de Mann–Whitney, distribución real contra distribución nula: p = 0.005).

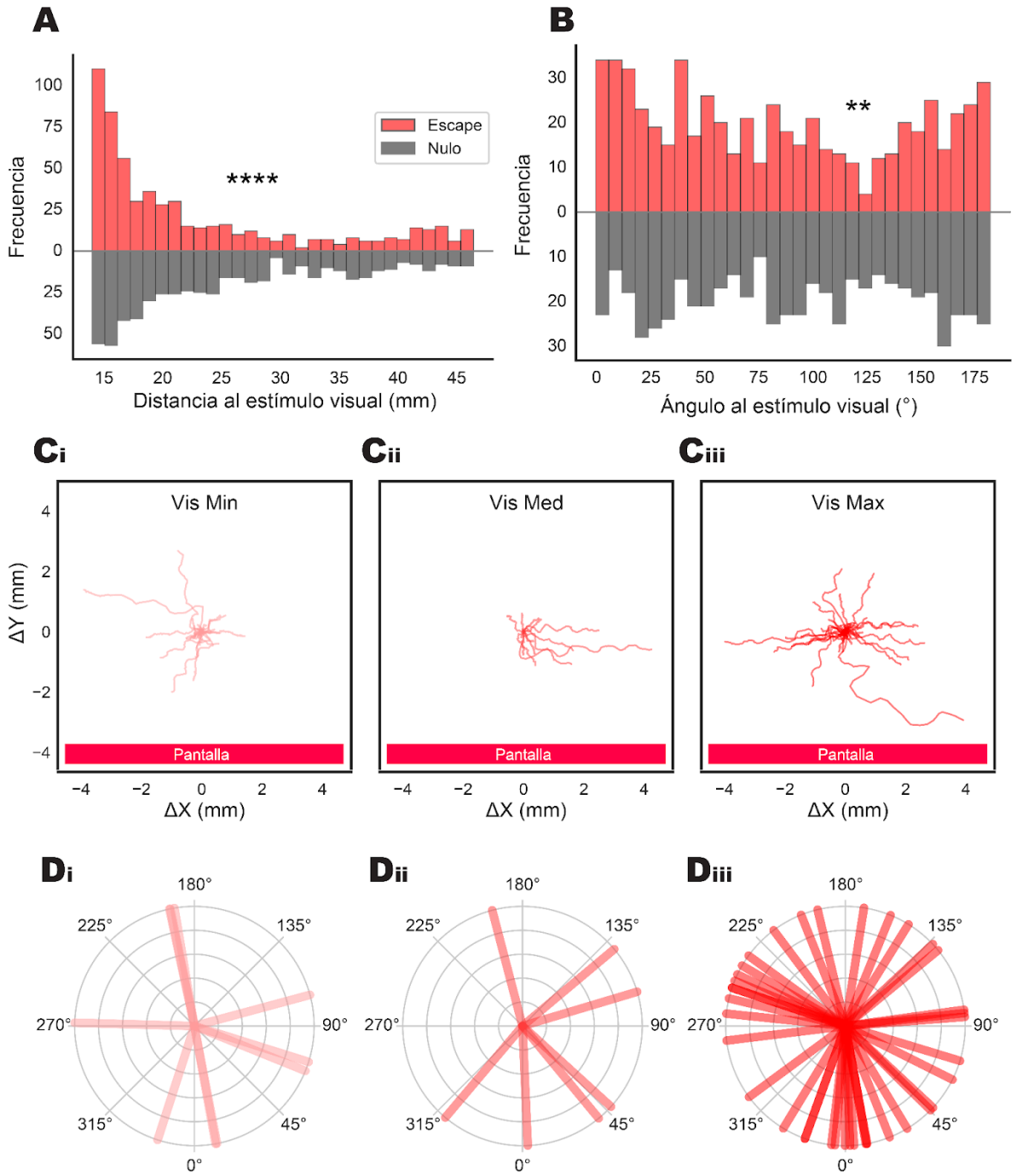


Figura 15. Componente direccional de los estímulos visuales unisensoriales. (A) Frecuencia de escapes observados en función de la distancia a la pantalla OLED (rojo); la distribución gris muestra el mismo análisis realizado sobre puntos temporales al azar en el registro (N = 80, n = 320, 4-15 dpf). (B) Frecuencia de escapes observados en función del ángulo del eje principal del animal a la dirección de la pantalla OLED (rojo); la distribución gris muestra el mismo análisis realizado sobre puntos temporales al azar en el registro. (C_{i-iii})

Trayectorias de escape observadas durante los primeros 50 ms luego del comienzo del evento motor, para las tres intensidades de estímulos visuales unisensoriales. La pantalla se ubica en la parte inferior del gráfico (rectángulo rojo). ($D_{i\text{-}iii}$) Ángulos de escape observados en el tiempo final de la Etapa 1 del C-start, para las tres intensidades de estímulos visuales unisensoriales. El estímulo visual se ubica a 0° del diagrama polar.

Cuando analizamos la dirección de la trayectoria del escape respecto a la fuente de estimulación visual, sin embargo, no vimos un sesgo claro (Figura 15C y 15D, Test de Rayleigh; V_{min}, $p = 0.19$; V_{med}, $p = 0.97$; V_{max}, $p = 0.80$). Es decir, no observamos que los animales ejecuten escapes especialmente en dirección opuesta al *looming*, lo cual sugiere que el componente direccional de nuestro estímulo visual, si bien existe, no pareciera jugar un rol central en la direccionalidad del escape. Es importante señalar que la dirección del escape puede estar modulada por otros factores, como la presencia de obstáculos o barreras físicas en el entorno, que también influyen en la toma de decisiones motoras rápidas (Eaton & Emberley, 1991; Zwaka et al., 2022). Por lo tanto, la ausencia de un sesgo direccional podría deberse a las características de la arena experimental.

3.2 Calibración y selección de estímulos auditivos

En todos los experimentos de esta tesis se utilizaron estímulos auditivos abruptos, que consisten en un único ciclo de una onda sinusoidal de 220 Hz, como fue descrito en el Capítulo 2. Este valor fue seleccionado en base a estudios previos en peces cebra, que indican que esta frecuencia se encuentra dentro del rango auditivo de estos animales (Cervi et al., 2012; Lu & DeSmidt, 2013b; Poulsen et al., 2021c). Sin embargo, si bien la onda reproducida por el parlante fue precisamente de esta frecuencia, el estímulo es tan abrupto y breve que el rango de frecuencias efectivo alcanzado es mucho más amplio.

El parámetro que variamos para regular la intensidad del estímulo fue la amplitud de la onda sonora, medida en decibeles (dB). Durante experimentos comportamentales preliminares (PRE-COMP), presentamos estímulos auditivos para establecer una relación entre la amplitud del sonido y la probabilidad de respuesta de escape. Para esto, se utilizó un parlante miniatura de 2.8 cm de diámetro (Visaton K28 WP) instalado directamente en la cámara de registro, y se midieron los decibeles en agua utilizando un hidrófono (Sensor SQ34), reportados en función de la presión de referencia de agua (re. 1 μP).

Estos experimentos demostraron que sonidos de mayor amplitud evocan respuestas evasivas con mayor probabilidad (Figura 16A, GLM binomial, Respuesta ~ Amplitud, coef = 0.11, $p < 0.001$). En particular, el estímulo de mayor intensidad logró evocar respuestas de escape en el 76% de los animales, una efectividad mucho mayor a la que logramos con el estímulo visual de mayor contraste.

Luego de realizar estos experimentos preliminares, fue necesario adaptar el sistema de estimulación auditiva a las condiciones específicas del setup de *imaging*, adyacente al confocal. En este entorno, los animales no se encuentran inmersos en suficiente volumen de agua como para permitir el uso del parlante originalmente empleado, que se ubicaba en

contacto directo con el agua. Para poder comparar los experimentos de *imaging* con los de comportamiento, reemplazamos el parlante Visaton K28 por el Thonet & Vander HK096-03451, que opera en aire, como fue descrito en el Capítulo 2. Con este equipo, conseguimos producir estímulos en un rango desde 60 dB hasta 75 dB (calculados en base a la presión de referencia utilizada para aire, 20 µPa). Este rango se superpone parcialmente con el conseguido previamente utilizando el otro parlante (68 dB hasta 94 dB, re. 20 µPa). Es importante recalcar que estos valores no son determinantes para nuestra selección de estímulos, sino que elegimos la intensidad de los estímulos en base a su probabilidad de respuesta. Los valores en dB se reportan únicamente con el fin de asegurar reproducibilidad.

Con estos nuevos estímulos, realizamos una nueva serie de experimentos comportamentales (COMP), como fue descripto en la sección anterior, y encontramos que la probabilidad de respuesta seguía correlacionando positivamente con la amplitud de estimulación (Figura 16B, GLM binomial, Respuesta ~ Amplitud, coef = 0.80, $p < 0.001$). En particular, el estímulo de mayor amplitud logra evocar respuesta de escape en un 70% de los animales evaluados, de manera similar al parlante original.

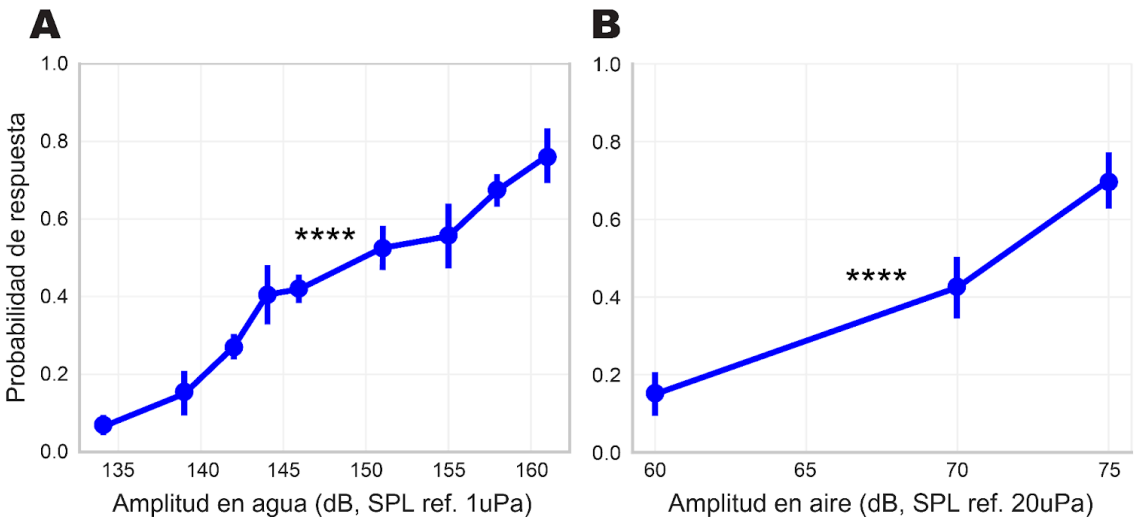


Figura 16. Calibración de intensidad de estímulos unisensoriales auditivos. (A) Probabilidad de respuesta de escape en función de la amplitud de estímulos auditivos durante experimentos preliminares (N = 282, n = 872, 9-30 dpf). (B) Probabilidad de respuesta de escape en función de la amplitud de estímulos auditivos durante experimentos finales (N = 40, n = 120, 4-7 dpf).

En este caso, también nos preguntamos si la posición de los animales en la arena experimental tendría algún efecto en la tasa de respuesta frente al estímulo auditivo. Encontramos que la distancia al parlante no produce un efecto neto sobre la chance de ejecutar un escape (Figura 17A), aunque sí observamos una mayor tasa de escape cerca de los bordes de la arena (Prueba U de Mann–Whitney, distribución real contra distribución nula: $p < 0.014$), algo que podría ser explicado por las características acústicas del recipiente. No encontramos evidencia de que el ángulo del eje principal del animal respecto al parlante tuviera algún efecto sobre la probabilidad de ejecutar un escape (Figura 17B, Prueba U de Mann–Whitney, distribución real contra distribución nula: $p = 0.089$), ni tampoco

encontramos sesgos en la dirección de escape respecto a la dirección de proveniencia del estímulo auditivo (Figura 17C y 17D, Test de Rayleigh; A_{min}, p = 1.0; A_{med}, p = 0.09; A_{max}, p = 0.19). Esto sugiere que el componente direccional de este estímulo no juega un rol significativo en este contexto, aunque esto podría deberse a otros factores, como el tamaño de la arena experimental, como fue discutido en la sección anterior.

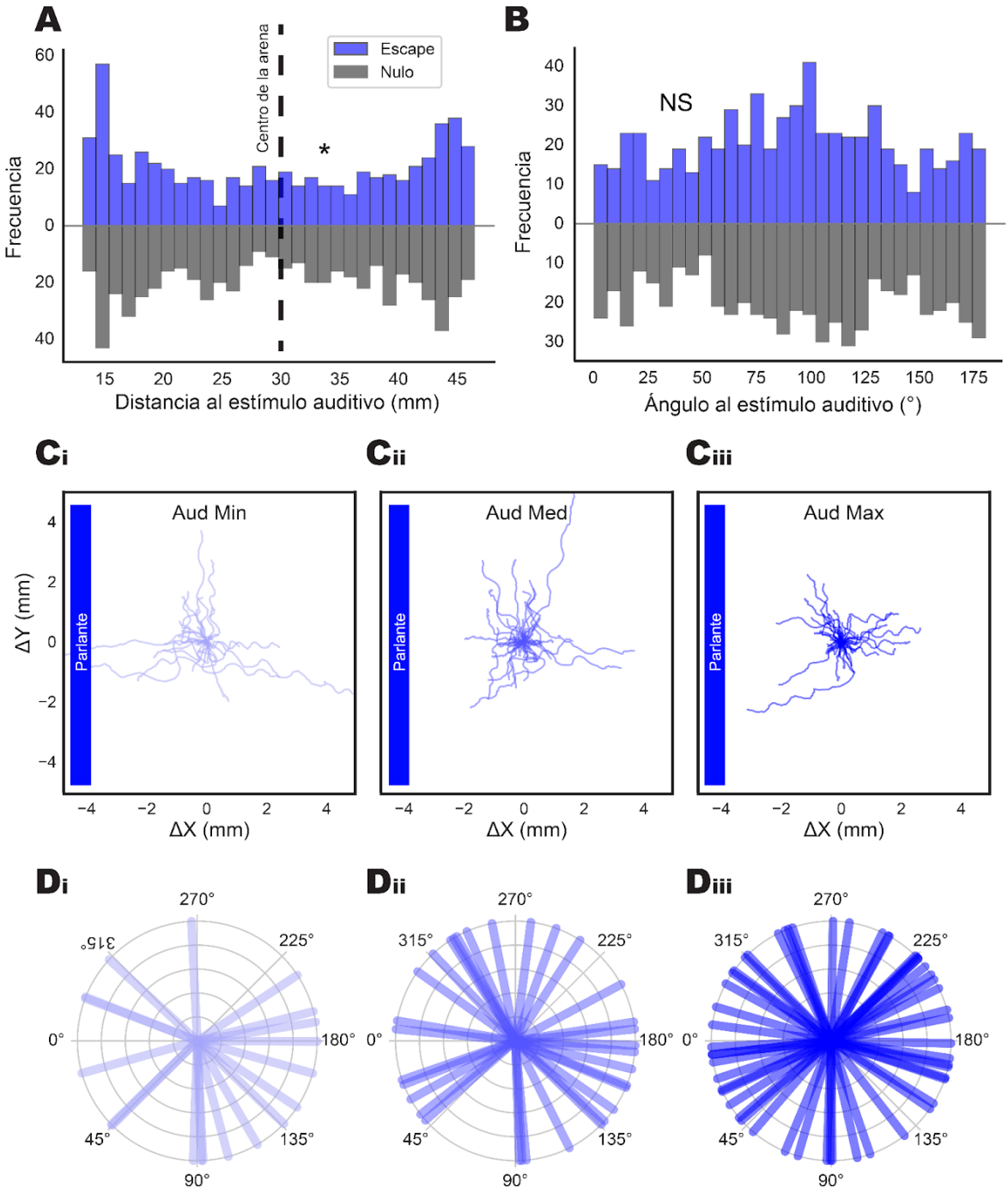


Figura 17. Componente direccional de los estímulos auditivos unisensoriales. (A) Frecuencia de escapes observados en función de la distancia al parlante (azul); la distribución gris muestra el mismo análisis realizado sobre puntos temporales al azar en el registro (N = 80, n = 320, 4-15 dpf). (B) Frecuencia de escapes observados en función del ángulo del eje principal del animal a la dirección del parlante (azul); la distribución gris muestra el mismo análisis realizado sobre puntos temporales al azar en el registro. (C_{i-iii}) Trayectorias de

escape observadas durante los primeros 50 ms luego del comienzo del evento motor, para las tres intensidades de estímulos auditivos unisensoriales. El parlante se ubica en la parte izquierda del gráfico (valores de x negativos). ($D_{i\text{-}iii}$) Ángulos de escape observados en el tiempo final de la Etapa 1 del C-start, para las tres intensidades de estímulos auditivos unisensoriales. El estímulo auditivo se ubica a 0° del diagrama polar.

3.3 Desarrollo de un algoritmo de tracking basado en reglas

Para cuantificar el comportamiento de los animales de manera más rica que la clasificación entre escape o no escape durante la estimulación, desarrollamos una solución que permitiera *trackear* a los peces durante todo el registro comportamental. El objetivo era no solo obtener la posición del animal (por ejemplo, la posición de la cabeza) sino también poder estimar la postura completa de su cuerpo, logrando así distinguir momentos de relativa inactividad, eventos de nado (*bouts*) lentos y escapes rápidos, específicamente escapes de tipo SLC y LLC (Figura 3C). Este proceso presentó desafíos técnicos complejos, debido principalmente a tres factores: la relativa transparencia de los peces, su pequeño tamaño en comparación con la arena experimental (que debía ser registrada en su totalidad) y la resolución espacial limitada de la cámara que, si bien permitía adquirir imágenes a alta velocidad (437 cuadros por segundo), no permitía capturar la forma del pez con alta definición (las imágenes son de 720 x 540 píxeles, donde el pez ocupa alrededor de 40 píxeles de largo y 5 píxeles de ancho, es decir, el 0.05% de la imagen).

Nuestra primera aproximación fue el desarrollo de un algoritmo de *tracking* basado en reglas, diseñado para el seguimiento de peces cebra sobre un fondo invariante. Para esto, utilizamos Python, en combinación con la librería OpenCV, para el análisis y procesamiento de las imágenes obtenidas durante experimentos preliminares de comportamiento. Este algoritmo (Figura 18) puede ser descrito de la siguiente manera:

1. A partir del video completo, en el que la cámara y la arena experimental están estáticas, se toma la mediana de todos los píxeles. Si el pez no se encuentra inmóvil durante la mayor parte del video, el valor encontrado para cada píxel corresponderá a su aspecto en los fotogramas en los que el pez no se encuentra en esa posición, es decir, se corresponderá con el fondo (arena experimental). Esto permite estimar el aspecto de la arena experimental durante ese video sin incluir ninguna imagen del animal que ocluya parte de ese fondo.
2. Contando con esta imagen de referencia, se realiza la sustracción de ese fondo de cada fotograma del video. Esta operación permite detectar píxeles que tengan una amplia diferencia con el fondo, lo cual sucede específicamente en donde se encuentra el animal. El resultado de este paso es un nuevo video, en donde casi todos los píxeles tienen un valor muy cercano a 0 (negro) con excepción de la silueta del pez.
3. Sobre cada uno de los fotogramas anteriores, se aplica un umbral para detectar sólo aquellos píxeles cuya diferencia con el fondo es suficiente para considerarlos parte de la silueta. Se identifica el contorno de esta única silueta, a la cual se le pide que sea continua.

4. Aprovechando que los ojos del pez cebra son los puntos más oscuros de su cuerpo, el siguiente paso es detectar, sobre la imagen original, los píxeles más oscuros dentro del contorno definido en el paso 3. Esto permite identificar cuál es el extremo de ese contorno que se corresponde con la cabeza.
5. Una vez que se identifica la cabeza, se toma un paso a una distancia fija en la dirección de la imagen que maximice la diferencia con el fondo. Esto marcará el segundo punto del cuerpo del animal. Este proceso se repite N veces, de esta manera reconstruyendo la forma completa del pez en cada fotograma, desde la cabeza hasta la punta de la cola.

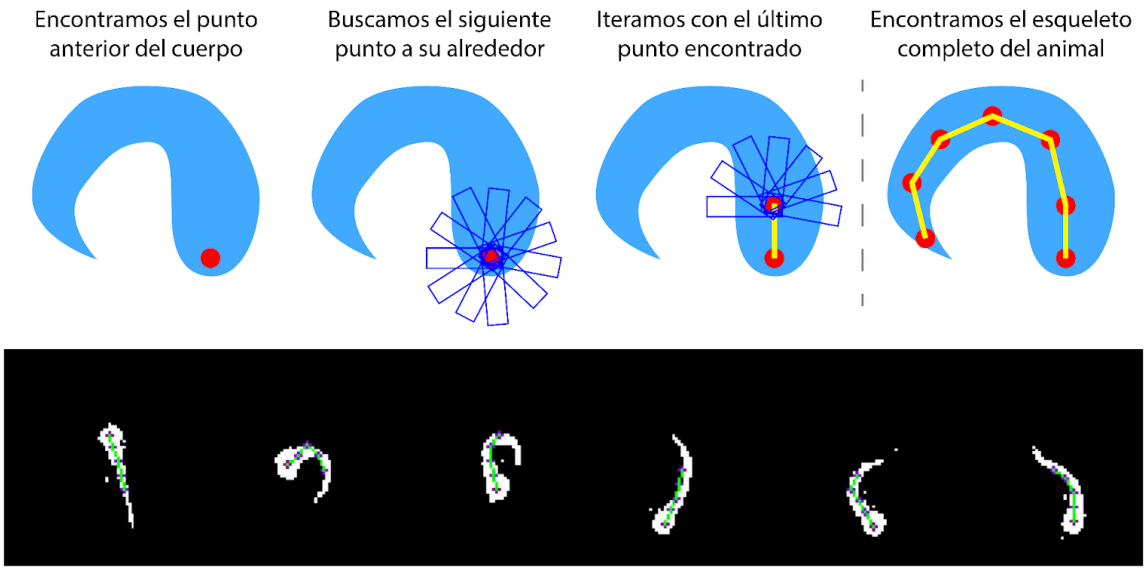


Figura 18. Algoritmo de tracking basado en reglas. Diagrama describiendo los pasos en los que consiste el algoritmo (paneles superiores) y ejemplo representativo de esqueletos completos para 6 fotogramas consecutivos durante una respuesta de escape (paneles inferiores).

Luego de diseñado el algoritmo, existió un trabajo fino de optimización para minimizar el tiempo de procesamiento de cada fotograma y mejorar la tasa de acierto. Parte de este proceso resultó en la modificación de la arena experimental debido a que la placa de Petri originalmente utilizada presentaba un fondo de gris heterogéneo y sus bordes proyectaban sombras que reducían mucho el contraste del pez cuando se ubicaba en esa zona. Se reemplazó entonces la placa de Petri redonda por una arena translúcida hexagonal de 27 mm de lado en la base, 39 mm de lado en la superficie y 18 mm de profundidad (PRE-COMP) que, a pesar de presentar un fondo homogéneo, contaba con bordes demasiado definidos entre el fondo del recipiente y sus paredes, ocasionando una gran cantidad de artefactos en este algoritmo de *tracking*. Finalmente, reemplazamos esta arena por un recipiente traslúcido cuadrado de 27 mm de lado en la base, 35 mm de lado en la superficie y 7 mm de profundidad (COMP, Figura 10), cuya leve curvatura permitía que el fondo del video de registro fuera casi completamente liso. Además, su menor tamaño permitía disminuir el área de registro de la cámara, efectivamente aumentando la cantidad de píxeles disponibles para

registrar la forma de los animales. Esta nueva arena fue la utilizada durante la última serie experimental comportamental (COMP).

Si bien este proceso de optimización resultó exitoso en muchos casos, en una parte significativa de los videos existían fotogramas específicos en los que el algoritmo fallaba, confundiendo al pez con estructuras no relacionadas, como burbujas o sombras en la arena experimental. Decidimos por lo tanto intentar una estrategia distinta y entrenar un modelo de aprendizaje automático como reemplazo del algoritmo de *tracking* basado en reglas.

3.4 Entrenamiento de un algoritmo de Deep Learning para el tracking de peces cebra

Los algoritmos de aprendizaje automático, y en particular los de aprendizaje profundo, tienen la ventaja de ser mucho más versátiles que los procedimientos basados en reglas explícitas. Al aprender una función implícita que conecta *inputs* (en este caso, fotogramas crudos provenientes del registro comportamental) con *outputs* (la posición precisa de los puntos que determinan la ubicación y postura del animal en ese fotograma), es posible realizar esta detección en situaciones mucho más diversas, en donde el fondo, el contexto o el tamaño de los animales, entre otros factores, podrían variar significativamente. Sin embargo, esto requiere de más recursos computacionales para entrenar y correr este modelo, y del etiquetado manual del animal en la mayor diversidad de situaciones posibles para que el modelo entrenado sea robusto.

Implementamos esta estrategia utilizando DeepLabCut (DLC) (Mathis et al., 2018), un *software* de código abierto que permite el entrenamiento y ejecución de modelos de aprendizaje profundo para la estimación de postura de animales experimentales. En particular, DLC ofrece una interfaz de usuario que facilita el etiquetado de fotogramas elegidos, el entrenamiento del modelo y la posterior evaluación de videos completos utilizando el modelo entrenado. Seleccionamos un modelo pre-entrenado de tipo ResNet-50, un tipo de Red Neuronal Convolucional muy utilizada en la bibliografía para la detección de objetos en imágenes (Figura 11A) (He et al., 2016).

Desarrollamos un software de visualización y selección de fotogramas en Python, con el objetivo de elegir fácilmente aquellos fotogramas que resultaron de mayor interés para el entrenamiento. Priorizamos la selección de fotogramas que contenían escapes, así como también aquellos en los que el animal se encontraba en posiciones extrañas o inusuales. De esta manera, maximizamos la variabilidad de los datos de entrenamiento, evitando así que el modelo aprenda simplemente a predecir la postura más usual de los peces, que es la que toman cuando se encuentran inmóviles o nadando lentamente. Elegimos 152 fotogramas bajo estos criterios, y utilizamos la interfaz de DLC para etiquetarlos. Un observador experto definió 12 puntos guía en cada fotograma, incluyendo 2 puntos para los ojos, 2 para la vejiga natatoria y 8 para la cola (Figura 11A). La red fue entrenada con el 95% de estos frames,

utilizando una placa gráfica NVIDIA GeForce RTX 3060 con 12 GB de VRAM, durante 300 mil iteraciones.

La evaluación del modelo en el 5% de los frames que no fueron usados para entrenarlo evidenció un problema. El error de las predicciones, calculado como la distancia promedio desde los puntos predichos hasta la posición correcta de los puntos, determinada por el experimentador, era mayor en los datos de evaluación que en los datos de entrenamiento (Figura 19A, comparar E1 contra T1). Esto indica que el modelo no está logrando generalizar adecuadamente: en lugar de aprender los patrones generales que le permitirían identificar la postura del animal en cualquier situación, memoriza parcialmente ejemplos específicos del entrenamiento. Este fenómeno, conocido como *overfitting*, o sobreajuste, es común cuando un modelo se ajusta demasiado a los datos que ha visto y pierde capacidad para adaptarse a nuevos datos.

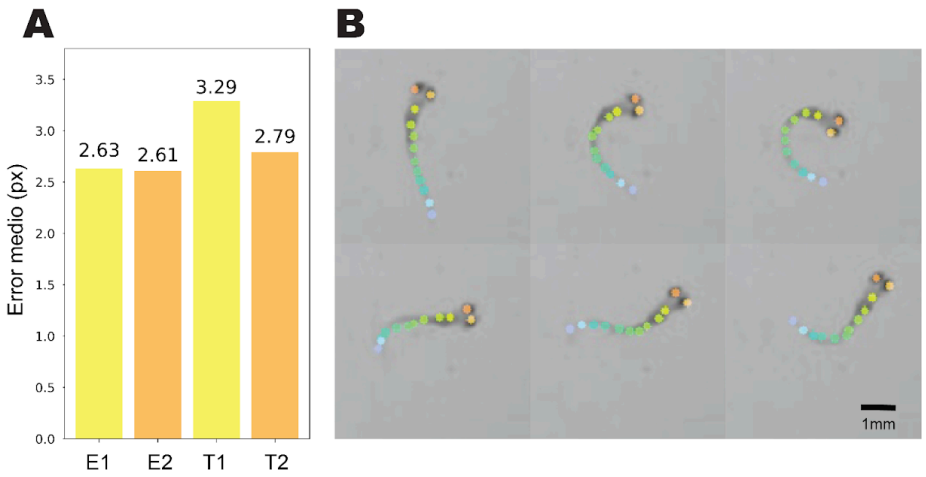


Figura 19. Algoritmo de aprendizaje automático para el tracking de larvas de pez cebra. (A) Error medio del modelo para el set de entrenamiento al final de la primera etapa (E1) y al final de la segunda etapa (E2). Error medio del modelo para el set de testeo (datos con los que el modelo no fue entrenado) al final de la primera etapa (T1) y al final de la segunda etapa (T2). (B) Ejemplo representativo de postura estimada para seis fotogramas consecutivos durante un escape.

Para remediar este problema, hicimos una nueva selección de 125 fotogramas seleccionados del set en los que el modelo cometió errores, priorizando la variabilidad en el tipo de errores cometidos. Etiquetamos estos nuevos fotogramas, los agregamos al set de datos inicial y realizamos una segunda ronda de entrenamiento durante 120 mil iteraciones más. Esta estrategia fue exitosa en reducir el *overfitting* del modelo, que decreció en un 72% (la diferencia entre E2 y T2 es mucho menor que la diferencia entre E1 a T1), lo cual se tradujo en una tasa mucho menor de fotogramas en los que el modelo captura incorrectamente la postura de las larvas. Esto resultó en un algoritmo mucho más robusto (Figura 19B) que permitió el *tracking* de los 1280 videos registrados (19.5 millones de fotogramas).

3.5 Detección de comportamientos evasivos identificables

Una vez que obtuvimos los puntos estimados definiendo la posición y postura del animal en cada fotograma de todos los videos a analizar, utilizamos estos datos para el cómputo de parámetros cinéticos de interés. En particular, promediamos la posición de los dos ojos como una estimación del extremo anterior del animal, y calculamos la velocidad instantánea de este punto a través de todos los fotogramas de cada video. Esto resultó en series temporales que cuantifican la velocidad lineal del animal a través del tiempo. Dado que el comportamiento de los peces cebra está compuesto por eventos motores discretos, fue posible encontrar todos los comportamientos de interés poniendo un umbral en la velocidad lineal y quedándonos con aquellos momentos del registro en los que el animal se encontraba efectivamente en movimiento (Figura 11B). Aún más, filtrando estos eventos de manera tal que su velocidad máxima fuera mayor que un valor determinado (58.6 mm/s, ver Capítulo 2), logramos incluir en nuestro set de datos final solo eventos rápidos que se corresponden con lo que visualmente identificamos como C-starts (Figura 20A). Sin embargo, dentro de esos "eventos rápidos" podrían existir tanto escapes como momentos de natación muy rápida y, aún dentro de los escapes, podrían distinguirse SLC y LLC. Por lo tanto, de cada uno de estos eventos extrajimos 36 descriptores cinéticos de interés, que se muestran en la Tabla 2.

Variable	Media	Máximo	Mínimo	Rango	Descriptores
Velocidad lineal de la cabeza	x	x			2
Velocidad lineal del punto final de la cola	x	x			2
Velocidad angular de la cabeza	x	x			2
Suma de los ángulos de la cola	x	x		x	3
Velocidad lineal del punto medio de la cola	x	x			2
Distancia de la cabeza al punto final de la cola	x		x		2
Aceleración lineal de la cabeza	x	x		x	3
Aceleración lineal del punto final de la cola	x	x		x	3
Aceleración angular de la cabeza	x	x		x	3
Jerk de la cabeza	x	x		x	3
Jerk del punto final de la cola	x	x		x	3
Suma de la curvatura de la cola	x	x		x	3
Ángulo entre la cabeza y el vector velocidad	x	x			2
Velocidad de cambio de la curvatura	x	x		x	3
Total					**36**

Tabla 2. Parámetros cinéticos de interés extraídos de eventos comportamentales rápidos para generar un espacio de alta dimensión que los describa.

De esta manera, logramos describir a los eventos rápidos como puntos en un espacio de 36 dimensiones. Este número de descriptores, o la elección de estos descriptores en particular, es parcialmente arbitrario. Nuestra hipótesis era que estos descriptores, en su conjunto, contenían información suficiente para permitirnos clasificar estos eventos en comportamientos específicos (SLC y LLC). Para corroborarlo, fue necesario reducir estas dimensiones para poder visualizar la estructura de los datos. Con ese objetivo, implementamos Kernel-PCA (Schölkopf et al., 1998), una técnica de reducción de dimensionalidad no lineal, que permite capturar relaciones complejas entre las variables originales al proyectar los datos en un espacio de menor dimensión preservando, en la medida de lo posible, su estructura intrínseca.

La Figura 20 muestra el resultado de este proceso para todos los eventos utilizados en la reducción de dimensionalidad (Figura 20B) y para aquellos que se encontraban dentro de la ventana de análisis, que abarca 2 segundos y se centra en el tiempo de estimulación (fin del *looming* u ocurrencia del estímulo auditivo, Figura 20C). Encontramos que los eventos se dividían claramente en dos grupos, que posiblemente representaban dos comportamientos diferentes. Estos grupos estaban separados principalmente por el componente 1 del Kernel-PCA (eje *x* en la Figura 20B y 20C), lo cual permitió diferenciarlos operativamente poniendo un umbral en esta dimensión (línea punteada vertical).

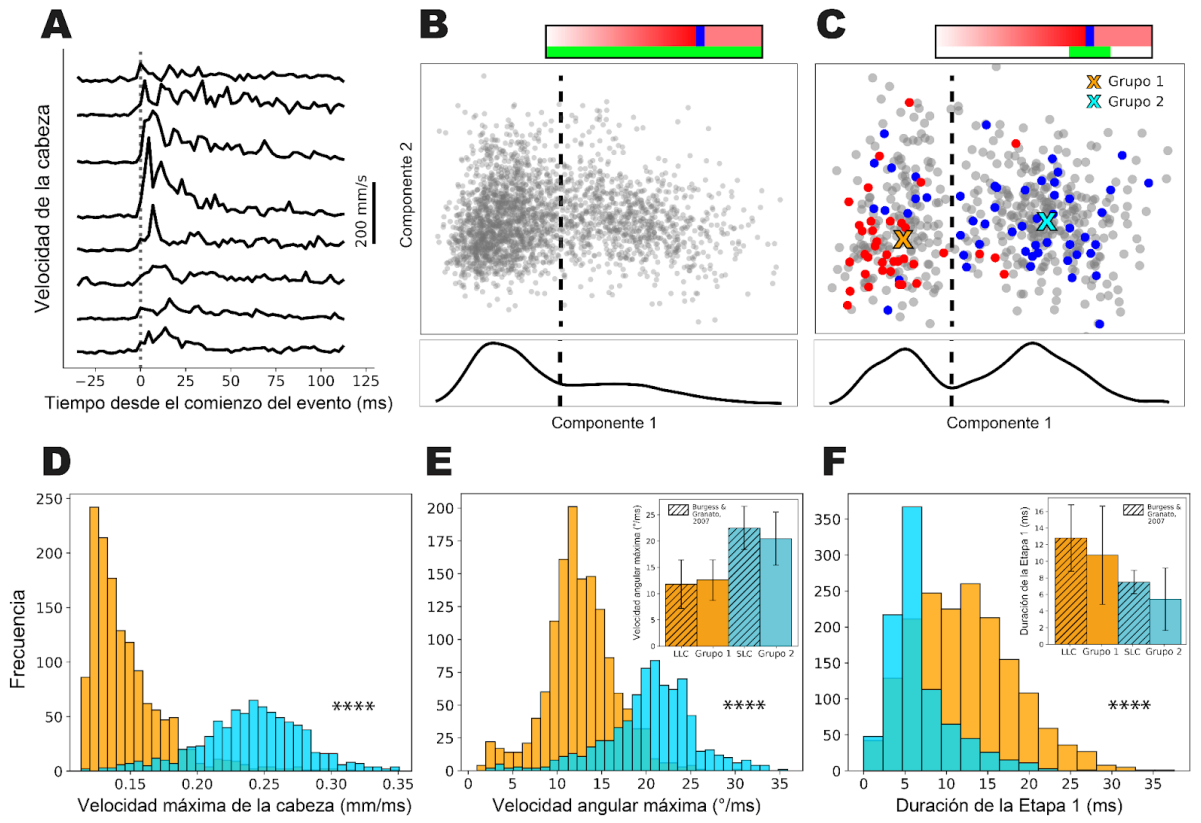


Figura 20. Identificación de distintos comportamientos de escape rápido. (A) Velocidad lineal de la cabeza en función del tiempo, para 8 ejemplos representativos de eventos rápidos, alineados al comienzo del evento. (B)

Resultado de la reducción de dimensionalidad realizada mediante Kernel-PCA. Cada punto es un evento registrado en cualquier momento del ensayo (N = 40, n = 640, 4-7 dpf). Línea punteada marca el punto de corte que separa los dos grupos encontrados. En rojo y en azul se pintan los puntos asignados al Grupo 1 y al Grupo 2, respectivamente. Debajo del gráfico de dispersión se muestra la distribución de estos eventos en el primer componente obtenido a través de la reducción de dimensionalidad. El diagrama superior muestra la temporalidad de los estímulos (en rojo el estímulo visual, en azul el estímulo auditivo) y la ventana de análisis de la cual se recopilaron los eventos analizados, en verde. (C) Resultado de la reducción de dimensionalidad realizada mediante Kernel-PCA. Cada punto es un evento registrado dentro de una ventana peri-estímulo (verde, diagrama superior). Cruces naranja y cian marcan el centro de masa de los dos clusters encontrados. Debajo del gráfico de dispersión se visualiza la distribución de los eventos en el Componente 1. El mínimo local que separa ambos picos fue utilizado para definir la línea de corte. (D) Distribución de velocidades lineales máximas alcanzadas por eventos del Grupo 1 (naranja) y del Grupo 2 (cian). (E) Distribución de velocidades angulares máximas alcanzadas por eventos del Grupo 1 y del Grupo 2. Inset muestra la media de esta variable para ambos grupos, en comparación con resultados de Burgess & Granato, 2007 (barras sombreadas). (F) Distribución de duraciones de la Etapa 1 para eventos del Grupo 1 y del Grupo 2. Inset muestra la media de esta variable para ambos grupos, en comparación con resultados de Burgess & Granato, 2007.

Para caracterizar estos dos grupos, comparamos la distribución de velocidades lineales máximas, velocidades angulares máximas y la duración del primer giro del C-start (Etapa 1). Encontramos que el Grupo 1 contenía eventos más lentos que el Grupo 2, lo cual se evidenció a través de todas las variables que medimos (Figura 20D-F, Prueba U de Mann–Whitney: $p < 0.001$ para las tres variables analizadas). Por otro lado, la examinación visual de los videos en los momentos de los eventos reconocidos por este algoritmo reveló que todas estas respuestas se correspondían con C-starts, pero las del Grupo 1 eran más lentas que las del Grupo 2. Sospechando que el Grupo 1 correspondía a respuestas de escape tipo LLC y que el Grupo 2 incluìa principalmente escapes de tipo SLC, comparamos los parámetros cinéticos de los dos grupos con los reportados para los comportamientos de tipo LLC y SLC por Burgess y Granato en 2007. Como puede observarse en los *insets* de las Figuras 20E y 20F, tanto la duración de la Etapa 1 del C-start como su velocidad angular máxima en nuestros grupos se corresponden de manera casi idéntica con los encontrados por este trabajo previo. En base a este análisis, consideramos que nuestro método de clasificación de comportamientos evasivos resulta exitoso, y en el resto de esta tesis se consideran a los eventos ubicados dentro del Grupo 1 como LLC y a los eventos ubicados dentro del Grupo 2 como SLC.

Finalmente, nos preguntamos si nuestros estímulos unisensoriales visuales y auditivos evocan estos dos tipos de comportamientos con distinta probabilidad. Para analizar esto, coloreamos en la Figura 20C los puntos correspondientes a escapes evocados durante ensayos visuales de intensidad máxima (rojo) y a aquellos evocados durante ensayos auditivos de intensidad máxima (azul). Sorprendentemente, encontramos que la enorme mayoría de los escapes evocados por estímulos visuales eran de tipo LLC, mientras que casi todos los evocados por estímulos auditivos eran de tipo SLC. De esta manera, demostramos que cada uno de nuestros estímulos unisensoriales es capaz de evocar una respuesta comportamental distinta con muy alta especificidad.

3.6 Efecto del desarrollo en la respuesta a estímulos aversivos

Dado que en esta tesis trabajamos con larvas de pez cebra que se encuentran en pleno desarrollo (de 4 a 7 dpf principalmente, ver Capítulo 2) durante nuestros protocolos experimentales, resultaba de gran importancia conocer el efecto del desarrollo sobre las respuestas a estímulos que nos interesan. En particular, nos preguntamos si la respuesta a estímulos visuales de tipo *looming* y a estímulos auditivos abruptos cambiaría a lo largo de los días de desarrollo.

Comenzamos midiendo esto en experimentos preliminares (PRE-COMP), en los que utilizamos el monitor LCD y el parlante sumergido como dispositivos de estimulación, en animales de 6 a 39 dpf (secciones 3.1 y 3.2). En estos ensayos no encontramos una fuerte dependencia de las respuestas al estímulo visual con la edad (Figura 21A, GLM binomial, Respuesta ~ Edad, coef = -0.007, p = 0.383). Para el estímulo auditivo, en cambio, encontramos una tendencia a aumentar la frecuencia de escape con el paso de los días (Figura 21B, GLM binomial, Respuesta ~ Edad, coef = 0.04, p < 0.001), con animales de 6 dpf respondiendo en un 17% de los ensayos y animales de 30 dpf respondiendo en un 46% de los ensayos. Nótese que, en el cálculo de probabilidades de este análisis, se combinaron las respuestas a los distintos estímulos visuales y a los distintos estímulos auditivos.

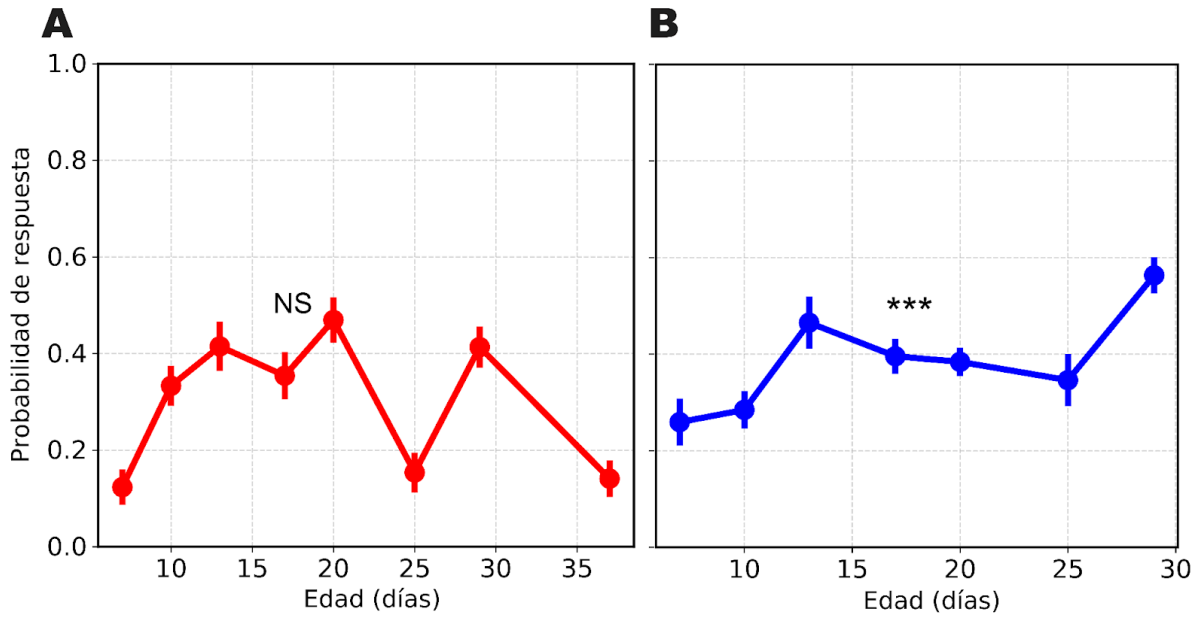


Figura 21. Efecto de la edad en la respuesta de escape. Probabilidad de respuesta en función de la edad en días post-fecundación, en condiciones unisensoriales visuales (A, N = 303, n = 811, 6-39 dpf) y auditivas (B, N = 309, n = 1016, 6-30 dpf). En ambos casos, los datos se binearon para la visualización de modo que cada punto es el promedio de un intervalo de tres dpf. ***p<0.001

En experimentos posteriores (COMP), ya utilizando los estímulos compartidos por el *setup* de *imaging*, medimos la respuesta a estímulos visuales, auditivos y su combinación en 80 animales de 4 dpf a 15 dpf. Además, medimos la tasa de respuesta espontánea de estos animales (es decir, eventos rápidos ejecutados que no estuvieran asociados a ningún estímulo

controlado por nosotros). En estos nuevos ensayos, observamos que la respuesta a estímulos auditivos tenía una fuerte caída entre los días 7 y 12 post-fecundación (Figura 22A). Crucialmente, esta misma caída se puede observar en los ensayos multisensoriales, que incluyen un estímulo auditivo y un estímulo visual, e incluso puede observarse una menor tasa de actividad espontánea en este período de tiempo, que pasa de ser relativamente baja a nula.

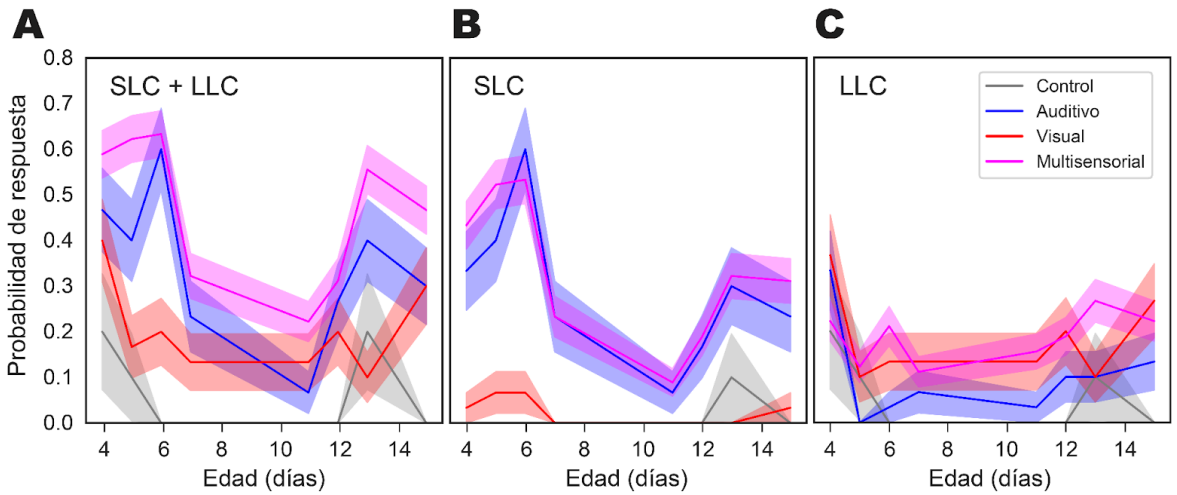


Figura 22. Efecto del desarrollo en la respuesta de escape. (A) Probabilidad de respuesta de escape en función de la edad de las larvas, para todas las respuestas de escape registradas, para cada tipo de estimulación (visual, auditiva, multisensorial y control) (N = 80, n = 1280, 4-15 dpf). (B) Probabilidad de respuesta de escape en función de la edad de las larvas, para respuestas de escape de tipo SLC. (C) Probabilidad de respuesta de escape en función de la edad de las larvas, para respuestas de escape de tipo LLC.

Para estudiar este resultado más en detalle, observamos las probabilidades de respuesta a estímulos auditivos y visuales, pero separándolas por SLC y LLC. Curiosamente, para ambas modalidades de estimulación, la respuesta de tipo SLC cae fuertemente entre los 7 y 12 dpf (Figura 22B). Las respuestas auditivas muestran una caída muy similar a la observada en el análisis de todas las respuestas conjuntas, mientras que las respuestas visuales, que solo son SLC en una muy baja frecuencia de manera basal, caen a 0% en este período de tiempo. Por otro lado, la probabilidad de evocar una respuesta de tipo LLC parece caer entre los 5 y los 12 dpf (Figura 22C). En esta tesis nos concentramos en la integración multisensorial de larvas de entre 4 y 7 dpf, excluyendo mayormente el período donde disminuye la probabilidad de respuestas tipo SLC.

3.7 Efecto de la habituación en la respuesta ante estímulos aversivos

Otro factor que consideramos importante estudiar y conocer en nuestro paradigma comportamental es el efecto de la habituación sobre la respuesta de escape. La habituación es un proceso neurobiológico mediante el cual la respuesta de un organismo a un estímulo repetido disminuye con el tiempo, sin que ello implique fatiga sensorial o motora (R. F. Thompson & Spencer, 1966). En nuestros experimentos finales, cada pez pasó por 15 ensayos que incluyeron algún tipo de estimulación (3 unisensoriales visuales, 3 unisensoriales

auditivos y sus 9 combinaciones). Por esta razón, era relevante saber si este protocolo de estimulación repetida generaba una caída significativa en la respuesta.

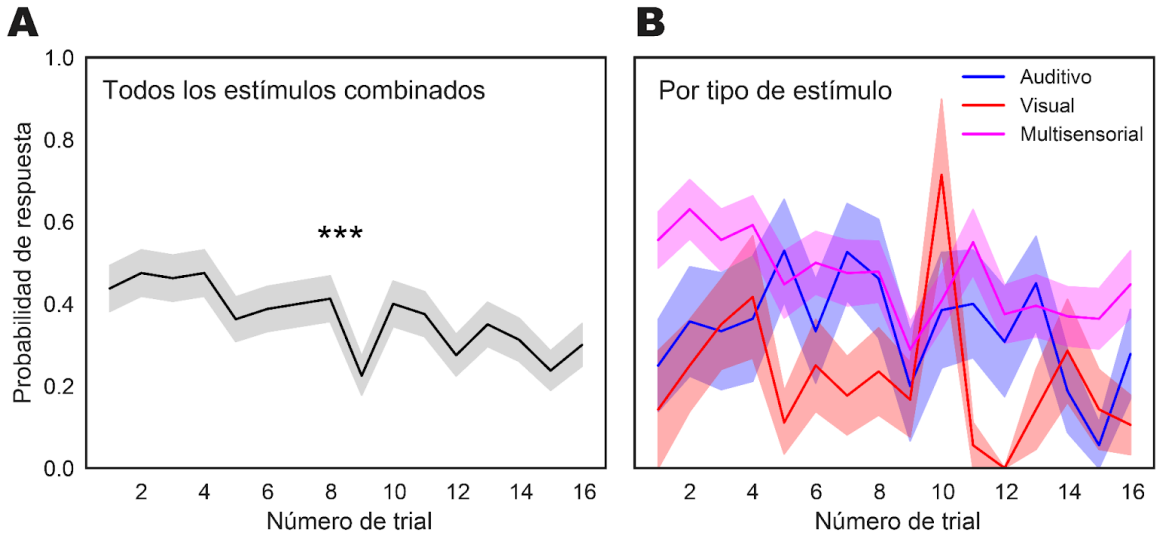


Figura 23. Habituación de la respuesta de escape. (A) Probabilidad de respuesta de escape en función del número de ensayo presentado al animal, para todos los tipos de estímulos (N = 40, n = 640, 4-7 dpf). (B) Probabilidad de respuesta de escape en función del número de ensayo presentado al animal, para cada tipo de estímulo (visual, auditivo y multisensorial). ***p<0.001

Para estudiar esto, calculamos la probabilidad de respuesta durante la secuencia de estimulación, a través de todos los animales, independientemente del tipo de estímulo utilizado. En la Figura 23A se muestran los resultados de este análisis. Si bien existe una caída de la probabilidad de respuesta a medida que se suceden los estímulos (GLM binomial, Respuesta ~ Secuencia, coef = -0.05, $p < 0.001$), esta caída es sólo del 13% (comienza siendo 42% en el primer ensayo y termina en 29% en el último). Crucialmente, esta caída no depende de la condición de estimulación (Figura 23B, GLM binomial: Test de razón de verosimilitud—Likelihood Ratio (LR)— para comparar modelos con y sin interacción Secuencia × Condición, p=0.937). Dado que nuestros estímulos siempre fueron presentados en orden aleatorio, esta caída de la respuesta no altera nuestras conclusiones, aunque causa una disminución de la probabilidad de respuesta final reportada para cada estímulo.

CAPÍTULO 4: INTEGRACIÓN MULTISENSORIAL EN COMPORTAMIENTOS EVASIVOS

4.1 Integración multisensorial en la probabilidad de escape en larvas de pez cebra

El objetivo principal de los ensayos comportamentales fue establecer las características de la integración multisensorial en larvas de pez cebra. Específicamente, nos preguntamos si la combinación de nuestros estímulos visuales y auditivos evocaba una probabilidad de respuesta distinta de la evocada por los estímulos unisensoriales por separado. Además analizamos si el nivel de integración multisensorial dependía de la saliencia de los componentes unisensoriales. Comenzamos midiendo esto en experimentos preliminares (PRE-COMP), utilizando como estímulos el monitor LCD y el parlante sumergible (Figura 10, Capítulo 2), y larvas de peces cebra de 10 a 18 días de edad. En particular, utilizamos dos niveles distintos de contraste para el *looming* (0.36 y 0.98, tercer y quinto punto de la curva de calibración realizada en la Figura 13B, Sección 3.1) y tres niveles distintos de amplitud para el estímulo auditivo (134 dB, 142 dB y 146 dB, re. 1 µPa cubriendo el rango comprendido entre el primer y el quinto punto de la curva de calibración realizada en la Figura 16A, Sección 3.2). El comportamiento en estos videos fue registrado y evaluado por observadores expertos para definir la ocurrencia o no ocurrencia de respuestas de escape, ya que estos ensayos se realizaron previamente al desarrollo del algoritmo de *tracking* de aprendizaje automático.

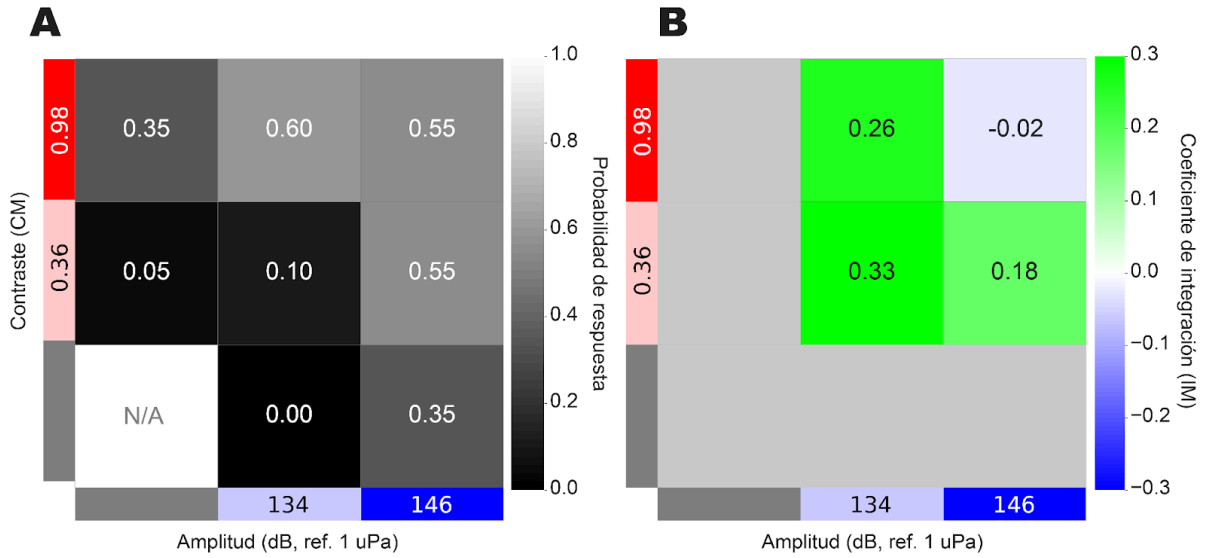


Figura 24. Integración multisensorial en la respuesta de escape de experimentos preliminares. (A) Probabilidad de respuesta de escape para cada condición de estimulación (N = 20, n = 160). Los números dentro de cada celda representan la proporción de ensayos en los que se registró una respuesta de escape durante la ventana de estimulación. (B) Coeficiente de integración multisensorial (IM) para cada condición de estimulación multisensorial.

Los resultados de estos experimentos (PRE-COMP) se muestran en la Figura 24. Como puede observarse, tanto el contraste visual como la amplitud del estímulo auditivo lograron modular la probabilidad de respuesta de escape en condiciones unisensoriales, alcanzando un 35% de respuesta tanto para el estímulo visual de mayor contraste como para el estímulo

auditivo más intenso (Figura 24A, GLM binomial, Respuesta ~ Contraste + Amplitud, coef. visual = 2.06, $p < 0.001$, coef. auditivo = 0.01, $p = 0.003$). Debe notarse que el estímulo auditivo máximo usado en estos ensayos es mucho menos intenso que el máximo utilizado en las calibraciones mostradas en el Capítulo 3 (161 dB, ref. 1 μPa, Figura 16A). Esto se debe a que, si un estímulo evoca respuestas con muy alta probabilidad por sí solo, es difícil ver efectos de la mejora multisensorial debido a un *efecto techo*. Por esta razón, restringimos los estímulos auditivos a la porción de la curva de calibración de menor saliencia.

El estímulo auditivo de menor intensidad no generó por sí mismo ninguna respuesta. Esto ilustra la dificultad de trabajar con estímulos sensoriales de baja saliencia: es necesario para nuestros objetivos, ya que el efecto de la integración multisensorial es especialmente notorio cuando las señales presentadas son ambiguas, pero corremos el riesgo de utilizar estímulos subumbrales o de una probabilidad de respuesta tan baja que implique un gran número de ensayos para detectar alguna respuesta. Los estímulos visuales, afortunadamente, evocaron respuestas en ambos casos.

La probabilidad de evocar respuestas evasivas es mayor en todas las condiciones multisensoriales, respecto a la máxima probabilidad de evocar una de estas respuestas con sus componentes unisensoriales. Esto es evidencia de que combinar estas dos fuentes de estimulación produce una mejora multisensorial. Aún más, en algunos de estos casos la mejora es *supralineal*. Por ejemplo, en la combinación de estímulos de menor saliencia (V: 0.36 CM, A: 134 dB) la probabilidad de respuesta ante el estímulo visual es 0% y ante el estímulo auditivo es 5%, por lo que la suma lineal de ambas probabilidades, si los estímulos no se integrasen, sería de 5%. Sin embargo, cuando combinamos los dos estímulos, observamos respuesta en el 10% de los animales. Lo mismo es cierto, aunque en menor medida, en los otros estímulos multisensoriales. La única excepción es la condición multisensorial que combina ambos estímulos en su intensidad máxima. En este caso, la mejora multisensorial existe, pero resulta *sublineal*. Es decir, la probabilidad de respuesta observada (55%) es mayor que la respuesta a cualquiera de los dos componentes unisensoriales (35% en ambos casos) pero es menor que la suma de las probabilidades unisensoriales (70%), así como también es menor que la probabilidad esperada por la ley de probabilidades de eventos independientes (Sección 2.5, 58%).

Para cuantificar este efecto en mayor detalle, calculamos coeficientes de Integración Multisensorial (IM) para cada condición multisensorial, como fue descripto en el Capítulo 2, siempre comparando la probabilidad de respuesta multisensorial con la máxima probabilidad de respuesta unisensorial (Figura 24B). Efectivamente, la integración multisensorial es mayor para combinaciones de menor saliencia, lo cual corrobora el principio de efectividad inversa descrito en la bibliografía e introducido en el Capítulo 1.

Estos resultados reproducen nuestros hallazgos en peces dorados (Martorell & Medan, 2022). Sin embargo, era crucial para nuestros objetivos poder confirmar que este mismo fenómeno existe en animales más jóvenes, específicamente en el rango de edades y con los estímulos que usamos en los experimentos de *imaging*. Por esta razón, realizamos una nueva serie de

experimentos comportamentales con larvas de 4 a 7 dpf, usando la pantalla OLED y el parlante externo, como fue descrito en el Capítulo 3. Utilizamos tres niveles de contraste visual (0.13, 0.29 y 0.59 CM) y tres de intensidad auditiva (60, 69 y 75 dB, re. 20 µPa) y sus 9 combinaciones, sumados a una condición control en la que no se presentó ningún tipo de estímulo. En estos experimentos, la detección de respuestas se realizó de manera automática utilizando el modelo entrenado con DLC.

La Figura 25 muestra los resultados de este experimento (COMP). Una vez más, tanto el contraste visual como la amplitud sonora son efectivos en modular la probabilidad de evocar respuestas rápidas, alcanzando un 45% con el estímulo visual máximo y un 70% con el estímulo auditivo máximo (Figura 25A, los mismos datos fueron cuantificados en el capítulo anterior, Figura 14 y Figura 16B). En todos los casos, la probabilidad de respuesta es mayor que la probabilidad en ausencia de estimulación (7%, control), indicando que los animales son capaces de percibir y responder a todos los estímulos presentados. Las condiciones multisensoriales mostraron un aumento en la probabilidad de respuesta respecto al máximo unisensorial, aunque esto no sucedió en todos los casos. En las combinaciones que incluían al estímulo auditivo de mayor saliencia (75 dB re. 20 µPa), la probabilidad de respuesta multisensorial resultó similar o incluso menor a la máxima unisensorial (auditiva, 70%). Esto podría deberse al *efecto techo* mencionado anteriormente, ya que el estímulo auditivo máximo alcanza una probabilidad de respuesta muy elevada. Al igual que en la Figura 24 (PRE-COMP), la combinación de los dos estímulos de menor saliencia (0.13 CM y 60 dB re. 20 µPa) produce una mejora *supralineal*: la probabilidad de respuesta multisensorial (33%) es mayor a la suma de las probabilidades unisensoriales (10% + 15% = 25%).

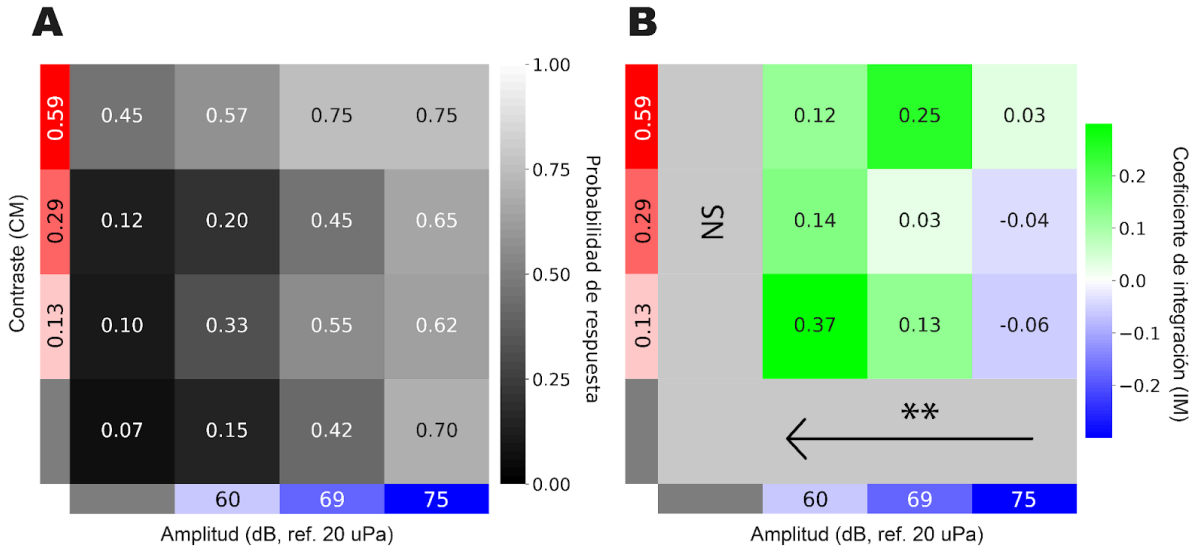


Figura 25. Integración multisensorial en la respuesta de escape (COMP). (A) Probabilidad de respuesta de escape para cada condición de estimulación (N = 40, n = 640, 4 a 7 dpf). Los números dentro de cada celda representan la proporción de ensayos en los que se registró una respuesta de escape durante la ventana de estimulación. (B) Coeficiente de integración (IM) para cada condición de estimulación multisensorial. La flecha indica la dirección en la que aumenta el IM en función de la intensidad de estimulación auditiva, **p = 0.009.

A continuación, calculamos los índices de integración (IM) sobre estos valores (Figura 25B). Estos valores, en su conjunto, son significativamente mayores a 0 (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p = 0.037$), corroborando que los animales tienden a aumentar su probabilidad de respuesta en presencia de estímulos audiovisuales de peligro coordinados temporalmente. Sin embargo, tal como se discutió en la Figura 25A, la combinación del estímulo auditivo de mayor intensidad con estímulos visuales de contraste bajo o medio no produce una mejora multisensorial, sino que arroja IM negativos. Estadísticamente, hay una relación inversa entre la intensidad del estímulo auditivo y el grado de mejora multisensorial que produce (GLM Gaussiano, IM ~ Contraste + Amplitud, coef. visual = -0.006, $p = 0.90$, coef. auditivo = -0.11, $p = 0.009$). Esto se relaciona directamente con el principio de efectividad inversa (Sección 1.2). El contraste visual, sin embargo, no presenta esa relación, posiblemente porque el estímulo unimodal no alcanza valores de respuesta tan altos como los estímulos auditivos.

Este experimento (COMP) replica los resultados de PRE-COMP en animales más jóvenes (4-7 dpf) y utilizando los estímulos que se usarán en la sección de *imaging*. Además, permite concluir que los estímulos visuales de tipo *looming* y los estímulos auditivos abruptos son efectivamente integrados por los peces cebra, produciendo mejoras multisensoriales sobre la probabilidad de respuestas evasivas, especialmente cuando los componentes combinados son de baja saliencia.

4.2 Integración multisensorial en la selección de comportamientos evasivos

Si bien las respuestas de escape en general mostraban integración multisensorial (Figura 25B), nos preguntamos si este fenómeno dependía del tipo de escape: SLC y LLC. Además, sabiendo que nuestras dos modalidades de estimulación evocan preferencialmente comportamientos diferentes (estímulos auditivos evocan mayoritariamente SLC y estímulos visuales evocan mayoritariamente LLC, ver Capítulo 3), resultaba de interés estudiar cómo la combinación de estas dos modalidades influye en la selección de comportamientos evasivos, y si esta depende de la saliencia relativa de los componentes.

En primer lugar, volvimos a analizar las probabilidades de respuesta evocadas en la serie experimental COMP para cada uno de los 16 tipos de ensayo, pero esta vez cuantificamos por separado respuestas SLC y LLC (Figura 26). En coincidencia con los resultados del Capítulo 3, cada uno de estos dos comportamientos es evocado preferencialmente por uno de las dos modalidades de estimulación. En el caso de los SLC, el estímulo auditivo máximo evoca la respuesta en un 70% de los casos, mientras que el estímulo visual máximo solo evoca SLC en el 10% de los animales (Figura 26A). A su vez, la probabilidad de ejecutar un SLC está principalmente determinada por la intensidad del estímulo auditivo (GLM binomial, Respuesta ~ Contraste + Amplitud, coef. visual = 0.15, $p = 0.08$, coef. auditivo = 1.18, $p < 0.001$). Por otro lado, en el caso de los LLC, el estímulo auditivo máximo solo evoca esta respuesta un 12% de las veces, mientras que la probabilidad de LLC para el estímulo visual máximo es de un 35% (Figura 26B). En este caso, la probabilidad de ejecutar un LLC está

determinada por la intensidad del estímulo visual (GLM binomial, Respuesta ~ Contraste + Amplitud, coef. visual = 0.48, $p < 0.001$, coef. auditivo = -0.04, $p = 0.69$).

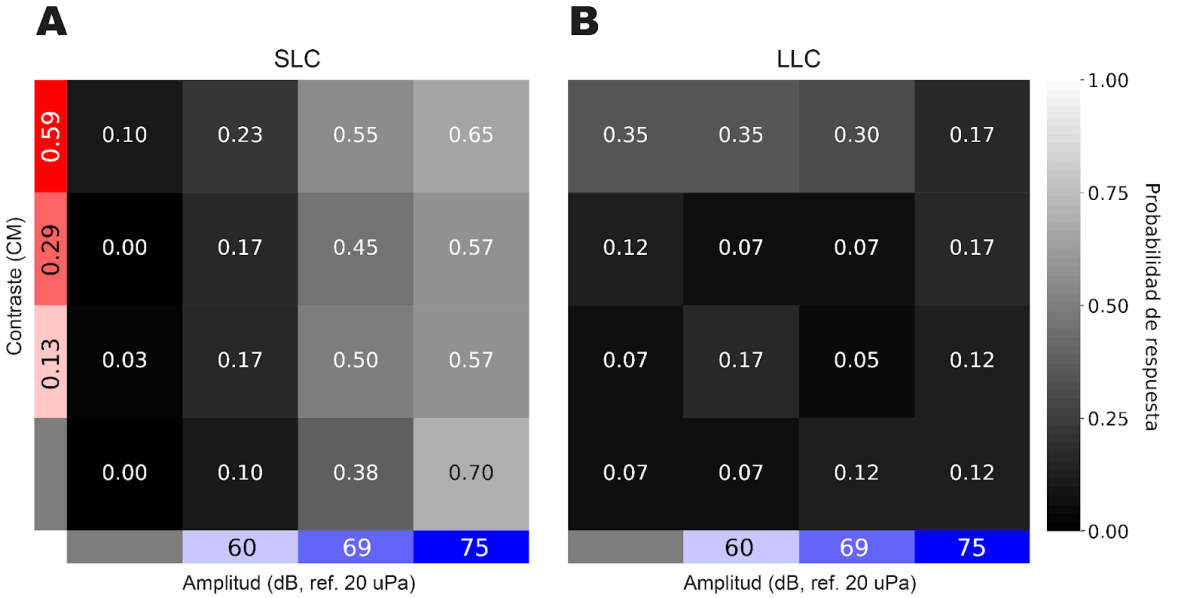


Figura 26. Probabilidad de respuesta de escape para cada tipo de comportamiento y para cada condición de estimulación. (A) Probabilidad de evocar un SLC durante cada condición de estimulación. (B) Probabilidad de evocar un LLC durante cada condición de estimulación.

En las combinaciones multisensoriales, este patrón se mantiene, aunque pueden observarse algunas mejoras multisensoriales para la probabilidad de evocar respuestas de tipo SLC, especialmente para condiciones cuyo componente auditivo es de media o baja intensidad, donde la adición de un estímulo visual produce mejoras *supralineales* en todos los casos.

Al calcular el IM para todas las condiciones multisensoriales, encontramos que los coeficientes correspondientes a los SLC tienen una clara relación con la intensidad de ambas modalidades (Figura 27A). La intensidad del estímulo auditivo (aquel que pareciera comandar la ejecución de este comportamiento) es inversamente proporcional a la mejora multisensorial, acordando con el principio de efectividad inversa. La intensidad del estímulo visual, sin embargo, es directamente proporcional a esta mejora (GLM Gaussiano, IM ~ Contraste + Amplitud, coef. visual = 0.04, $p = 0.02$, coef. auditivo = -0.19, $p < 0.001$). Esto podría explicarse debido a la baja efectividad de la modalidad visual en gatillar este tipo de respuestas.

El IM de las respuestas de tipo LLC, en cambio, no se organiza en función de las intensidades de estimulación (Figura 27B). Ni la saliencia auditiva ni la saliencia visual muestran una relación significativa con el efecto de la integración multisensorial sobre la probabilidad de respuesta (GLM Gaussiano, IM ~ Contraste + Amplitud, coef. visual = -0.06, $p = 0.59$, coef. auditivo = -0.05, $p = 0.66$). Esto podría deberse a que estas probabilidades, para este comportamiento, son relativamente bajas en todas las condiciones de estimulación, por lo que

la estimación del IM es poco robusta como para detectar este tipo de correlaciones con el tamaño muestral utilizado.

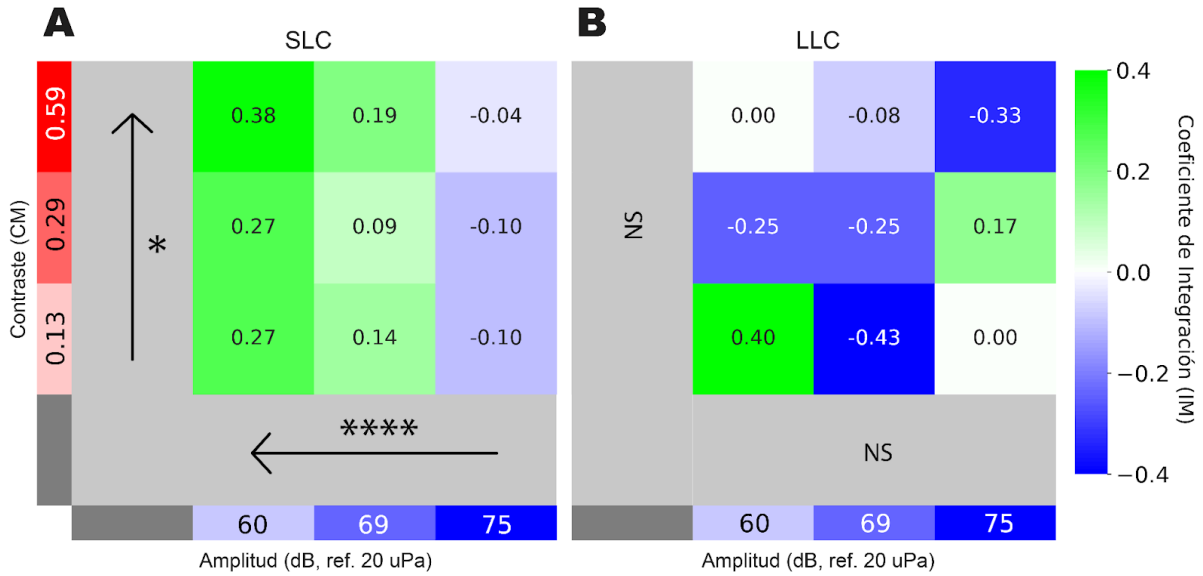


Figura 27. Coeficientes de integración multisensorial (IM) para cada tipo de comportamiento y para cada condición de estimulación. (A) IMs calculados para SLCs en cada condición de estimulación. (B) IMs calculados para LLCs en cada condición de estimulación. Las flechas indican la dirección en la que aumenta el IM en función de la intensidad de estimulación, cuando esa relación es significativa respecto al eje correspondiente.*p = 0.02, ****p <0.001.

Finalmente, nos propusimos investigar si la selección de estos dos comportamientos podría ser modulada por la combinación de estímulos de modalidades diferentes. Una posibilidad es que el animal decida responder siempre de acuerdo al estímulo de mayor saliencia presentado (por ejemplo, si el estímulo auditivo es más efectivo que el estímulo visual, los animales elegirían hacer SLC en todos o casi todos los casos). Otra posibilidad es que el comportamiento seleccionado sea determinado probabilísticamente según la combinación de las saliencias relativas de ambos estímulos. Es decir, la combinación de un estímulo auditivo un poco más efectivo que su contraparte visual produciría SLC un poco más frecuentemente que LLC, y esta diferencia en la frecuencia de ambas respuestas estaría relacionada con la diferencia entre las saliencias de los componentes. Por otro lado, también es posible que la combinación de estímulos audiovisuales produzca algún otro tipo de patrón comportamental, como un tercer tipo de respuesta (por ejemplo, respuestas de *freezing*), o que produzca SLC y LLC en alguna proporción que sea independiente de la saliencia de los componentes.

Para determinar cuál de estas hipótesis era la correcta, calculamos dos índices para cada una de las condiciones multisensoriales. En primer lugar, calculamos la diferencia entre la probabilidad de evocar SLC y la probabilidad de evocar LLC con una combinación específica de estímulos audiovisuales. En segundo lugar, calculamos la diferencia entre la probabilidad de evocar cualquier respuesta de escape (SLC o LLC, indistintamente) para el componente unisensorial visual y el auditivo de cada combinación.

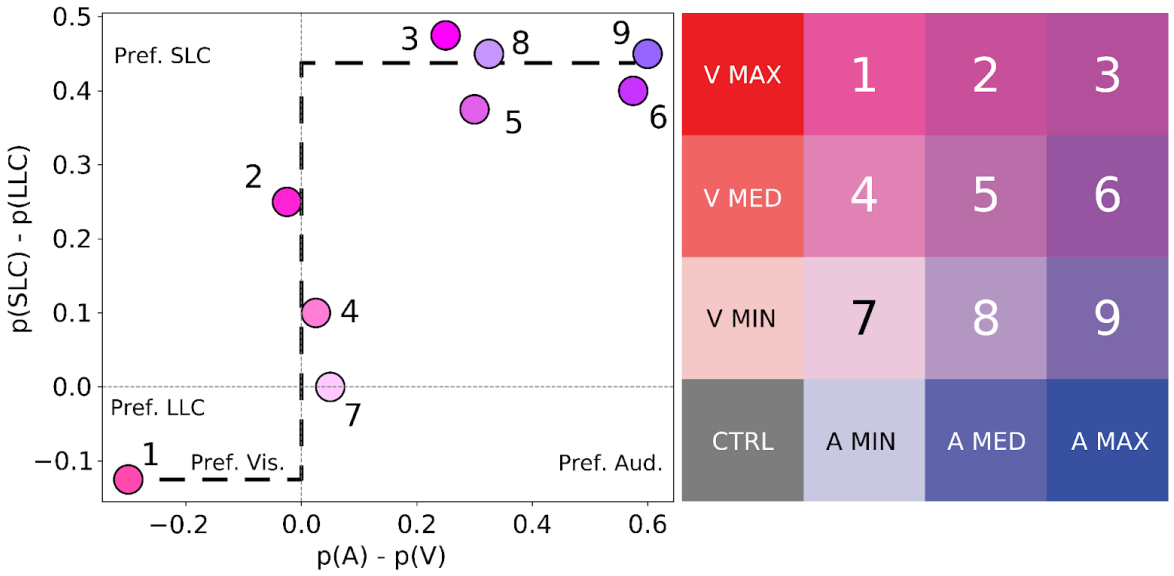


Figura 28. Diferencia entre la probabilidad de evocar SLC y la probabilidad de evocar LLC, en función de la diferencia entre la probabilidad de evocar cualquier respuesta de escape para el componente unisensorial visual y para el componente unisensorial auditivo, para cada condición de estimulación multisensorial. Se muestra la grilla de estimulación como referencia para reconocer a qué condición corresponde cada punto. Valores más altos en el eje X representan mayor saliencia auditiva respecto a la saliencia visual, mientras que valores más altos en el eje Y representan mayor preferencia por ejecutar SLC por sobre LLC. La curva negra punteada representa una función discontinua, tan solo de manera ilustrativa.

En la Figura 28 se observa la relación entre las saliencias de los componentes unimodales y las probabilidades de evocar SLC o LLC para las 9 condiciones multisensoriales. Esta figura evidencia que, cuando el estímulo auditivo es más efectivo que el visual, la combinación de ambos tiende a evocar respuestas de tipo SLC (GLM Gaussiano, (p(SLC) - p(LLC)) ~ (p(A) - p(V)) coef. = 0.92, p = 0.01). Sin embargo, esta relación no parece depender gradualmente de la saliencia relativa de ambos estímulos, sino que, una vez que la saliencia auditiva es un poco mayor a la visual, la preferencia por evocar SLC alcanza un máximo, y viceversa. Esto es ilustrado en la figura como una función discontinua (línea punteada negra). Además, la preferencia alcanzada para cada uno de los dos comportamientos no es simétrica: un estímulo auditivo más efectivo que uno visual establece una fuerte preferencia por respuestas de tipo SLC (p(SLC) - p(LLC) alrededor de 0.43, puntos 3, 5 y 8), pero un estímulo visual igualmente más efectivo sólo establece una débil preferencia por ejecutar respuestas de tipo LLC (punto 1 de la Figura 28, p(SLC) - p(LLC) alrededor de -0.12).

Estos hallazgos demuestran que la combinación de estímulos audiovisuales modula la selección de comportamientos evasivos, estableciendo una preferencia por el comportamiento comandado por la modalidad de mayor saliencia. Las implicancias de este resultado serán abordadas en mayor detalle en la Discusión (Capítulo 10).

CAPÍTULO 5: DESARROLLO DE UN PARADIGMA DE REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL

5.1 Selección y automatización de la presentación de estímulos visuales y auditivos

Uno de los objetivos centrales de esta tesis es el registro de actividad neuronal en respuesta a estímulos visuales y auditivos en el Tectum de larvas de pez cebra. Para lograr esto, fue necesario seleccionar dispositivos de estimulación que fuesen compatibles con la adquisición de imágenes mediante microscopía confocal. El microscopio confocal que utilizamos para las series experimentales IMG-TEC e IMG-ROM (ver Tabla 1) es de uso compartido con todo un instituto de investigación, por lo que no se pueden realizar modificaciones en su estructura o disposición para acomodar cualquier dispositivo. En cambio, fue imperativo encontrar una pantalla y un parlante que pudieran disponerse a distancias y ángulos razonables del animal que estaría inmerso en agarosa y bajo un objetivo de inmersión en agua.

Como fue descrito anteriormente, utilizamos estímulos visuales de tipo *looming*. Elegimos usar una OLED Waveshare de 1,5″, principalmente por su capacidad para producir altos niveles de contraste y por su pequeño tamaño (38 × 38 mm). Esto permitió ubicar la pantalla a 3 cm del animal, a un ángulo de 45 grados respecto de su eje anteroposterior, alineada con su ojo derecho (Figura 29). La configuración del microscopio confocal en estas condiciones resultó en una tasa de adquisición de 4.3 Hz, mientras que la pantalla logró una tasa de refresco de entre 2 y 15 Hz. Esto implicó que la organización temporal de respuestas neuronales a estímulos muy rápidos no podría ser estudiada en detalle. Por estas razones, elegimos utilizar estímulos visuales lentos (l/v = 1.0).

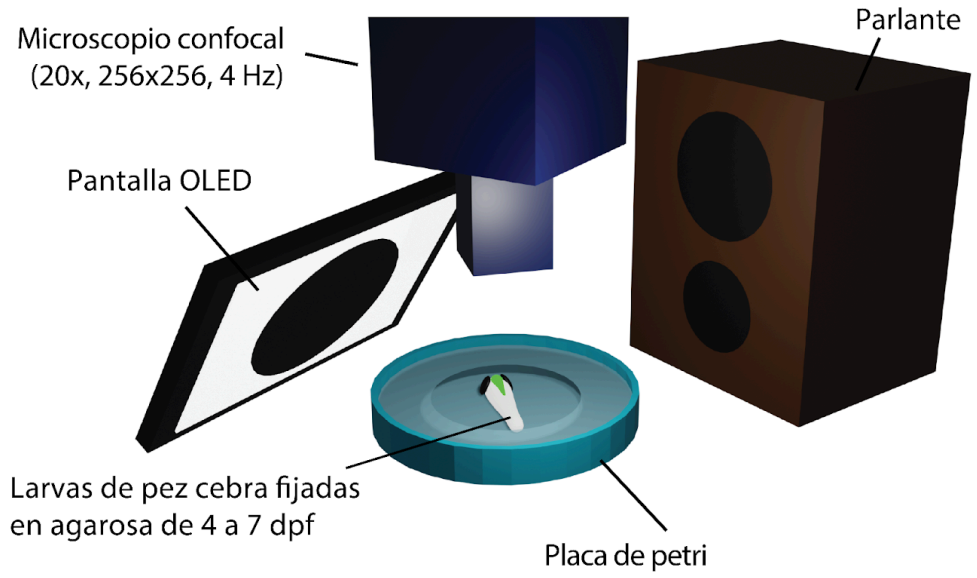


Figura 29. Diagrama de setup experimental para experimentos de *imaging* en microscopio confocal.

Con el estímulo auditivo debimos afrontar desafíos similares. En experimentos comportamentales preliminares utilizamos parlantes sumergibles, que permiten una transmisión eficiente del sonido directamente al medio acuoso donde se encuentran los peces.

Sin embargo, la configuración del microscopio confocal implica que la larva de pez cebra se ubique en una pequeña cantidad de agarosa cubierta de agua (~1 ml) confinada sobre la platina del microscopio. Este volumen no es suficiente para colocar y operar adecuadamente un parlante sumergible. Alternativamente, se podría ubicar un parlante en contacto directo con el fondo del recipiente, transmitiendo las vibraciones a través del material (Bhandiwad et al., 2013; Kohashi et al., 2012; Marsden & Granato, 2015; Pantoja et al., 2016). En nuestro caso particular, esto resultó inviable dado que la platina del microscopio y los sistemas de transiluminación ocupan esta posición. Frente a estas restricciones, utilizamos un parlante convencional (Thonet & Vander HK096-03451) transmitiendo el sonido inicialmente en aire y luego en agua, a costa de una atenuación que seguramente fue significativa.

Para la sincronización entre la presentación de los estímulos y la adquisición de imágenes con el microscopio desarrollamos una interfaz en Processing (The Processing Foundation) que envía un pulso TTL a la cámara asociada al confocal y luego gatilla la activación del parlante, la pantalla o ambos. La activación de la cámara permite a su vez iniciar la adquisición de imágenes de forma automática y precisa.

5.2 Calibración de las condiciones de registro en el microscopio confocal

La adquisición de imágenes neuronales mediante microscopía confocal implica optimizar múltiples parámetros que se encuentran en tensión entre sí. Por un lado, es deseable contar con una alta resolución espacial, que permita identificar claramente cada soma neuronal individual. Sin embargo, en un microscopio de barrido, incrementar la resolución espacial (más píxeles por imagen) aumenta proporcionalmente el tiempo de adquisición, disminuyendo la resolución temporal, por lo que la señal neuronal estará peor estimada en el tiempo. Es posible aumentar la resolución espacial sin sacrificar resolución temporal disminuyendo el tiempo de exposición de cada píxel, pero esto implica adquirir menos luz por píxel y, por lo tanto, imágenes más ruidosas y una peor estimación de la actividad neuronal. Si uno no hace ninguno de estos compromisos, debe reducirse la resolución espacial (menos píxeles por neurona), pero esto conlleva afrontar problemas de borde, ya que una mayor proporción de los píxeles capturados contendrán señales provenientes de más de una neurona. Esto requiere encontrar un punto de equilibrio entre estos factores para lograr una adquisición óptima.

Luego de diversas optimizaciones, adquirimos imágenes de la actividad neuronal de 256 x 256 píxeles (320 μm x 320 μm, 0.8 píxeles/μm) a una frecuencia de 4.3 Hz. Si bien este tamaño de imagen es suficiente para la correcta estimación de la actividad de neuronas individuales, no permite identificar los límites de cada soma durante la adquisición. Por esta razón, capturamos una única imagen adicional, denominada *templado*, con una resolución más alta y un mayor tiempo de exposición (1024 x 1024 píxeles, 320 μm x 320 μm, 3.2 píxeles/μm, adquirida a lo largo de 22 segundos). De esta manera, obtuvimos un mapa anatómico detallado del área registrada, sobre el cual se realizó la segmentación de las regiones de interés (ROIs) correspondientes a cada neurona.

5.3 Segmentación semiautomática de regiones de interés

Una vez obtenidas las imágenes de la actividad neuronal para cada ensayo, el paso siguiente consistió en identificar la posición de somas individuales en los templados. Aunque herramientas de segmentación automatizada o semiautomatizada basada en algoritmos entrenados previamente como Cellpose (Stringer et al., 2021) o Suite2p (Pachitariu et al., 2016) son ampliamente utilizadas en el campo, fueron desarrolladas principalmente para marcadores fluorescentes expresados en el núcleo de las neuronas. En nuestro caso, utilizamos un marcador fluorescente citoplasmático, lo que genera un patrón característico donde los somas presentan bordes brillantes y centros oscuros. Si bien existen adaptaciones de los algoritmos más usados a estas condiciones, algunas pruebas preliminares fallidas nos condujeron a tomar la decisión de implementar un algoritmo de segmentación semi-automático optimizado para nuestros propios registros. Este algoritmo, desarrollado en Python, se compone de los siguientes pasos:

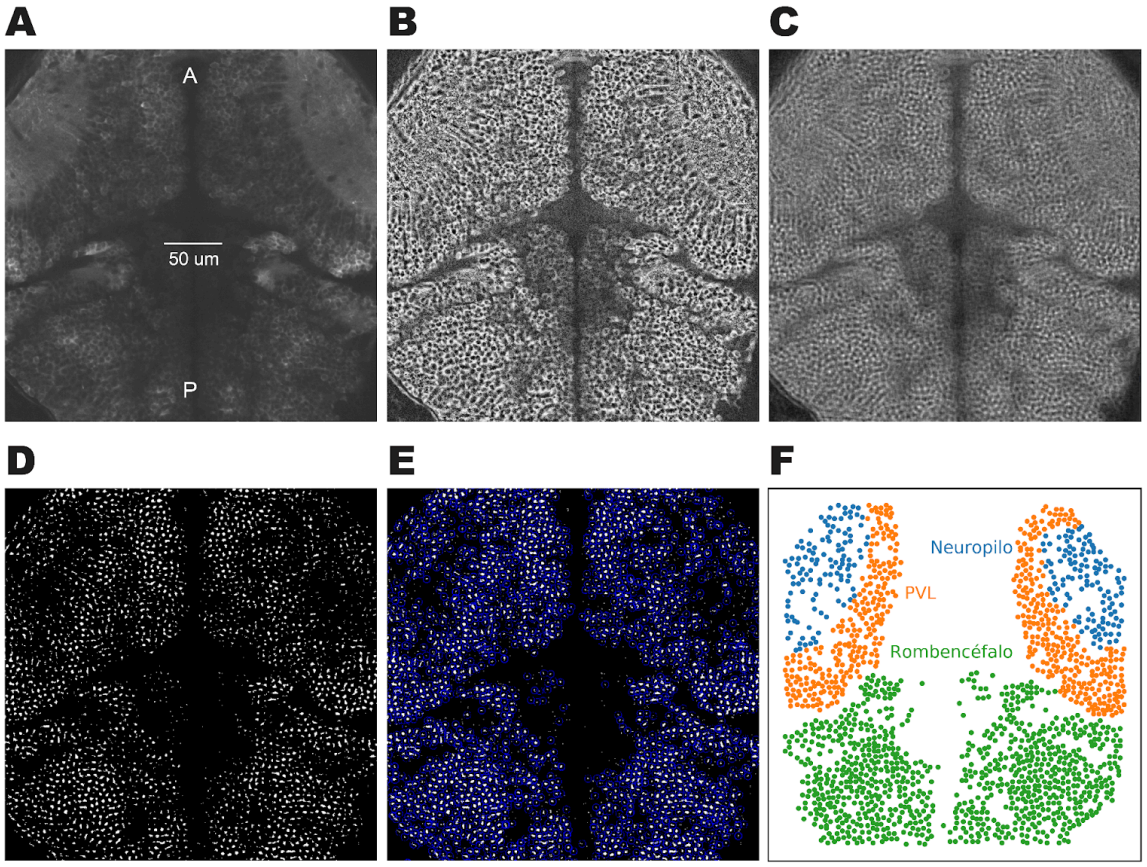


Figura 30. Algoritmo de segmentación de Regiones de Interés (ROIs) semiautomático. (A) Templado original crudo. (B) Imagen resultante luego de aplicar un filtro de contraste local adaptativo (CLAHE). (C) Resultado de la convolución entre la imagen anterior y un kernel de detección de anillos. (D) Máscara obtenida a partir de la imagen anterior, aplicando un umbral seleccionado manualmente. (E) ROIs encontrados graficados sobre la máscara final. (F) ROIs encontrados separados por áreas cerebrales de interés. Se omiten ROIs no analizados.

1. Aplicamos un filtro de contraste local adaptativo (CLAHE, por sus siglas en inglés) sobre el templado (Figura 30A), lo cual permite normalizar la intensidad lumínica en distintas partes de la imagen, resultando en bordes celulares cuyo valor de escala de grises es aproximadamente el mismo independientemente de la fluorescencia de cada neurona en particular (Figura 30B), que puede variar por su actividad momentánea, por su posición en el campo óptico y por su expresión basal, entre otros factores.
2. Realizamos una convolución de la imagen normalizada con un *kernel* diseñado para detectar estructuras anulares. Este proceso resulta en una imagen cuya intensidad es alta en zonas que coinciden con el centro de círculos oscuros rodeados por un borde claro (Figura 30C), patrón característico de somas neuronales marcados citoplasmáticamente con sensores de calcio.
3. Luego, aplicamos un umbral sobre la imagen resultante de la convolución, elegido de tal manera que sólo los píxeles correspondientes a los centros de somas claramente identificados serán considerados en la imagen final (Figura 30D).
4. Encontramos los contornos de cada uno de los centros hallados en el paso anterior, y tomamos su centroide como la localización de un soma individual (Figura 30E).
5. Tomamos un círculo de diámetro fijo centrado en cada uno de los puntos calculados en el paso anterior (Figura 30F). Todos los píxeles contenidos en ese círculo representan al ROI que será analizado en los pasos subsiguientes. El diámetro de ese círculo corresponde al diámetro promedio de los somas del Tectum, que son bastante homogéneos.

La Figura 30 muestra un ejemplo de este proceso para un plano de la serie experimental IMG-TEC. Un proceso análogo a este se realizó con planos centrados en el Rombencéfalo para la serie experimental IMG-ROM.

5.4 Alineación volumétrica con atlas cerebral estándar

La actividad neuronal registrada obtiene valor si podemos identificar con precisión las regiones del cerebro en las que se ubica cada ROI. Para lograr esta identificación, es necesaria la alineación de nuestros registros con un marco de referencia conocido, o atlas cerebral. Esto, por una parte, permite determinar la localización de cada ROI en una estructura y, por otra parte, permite combinar la información de ROIs de diferentes experimentos en un marco de referencia común a todos los animales.

Con este objetivo, realizamos adquisiciones volumétricas completas (*z-stacks*) del cerebro de cada animal registrado, con una resolución de 512 x 512 píxeles (1.6 píxeles/μm) cada 3 micrones, resultando en 101 planos (320 μm x 320 μm x 300 μm). Luego, elegimos uno (o dos) de esos planos, para realizar la secuencia de estimulación sensorial mientras medimos la fluorescencia en función del tiempo durante. Conociendo la posición de ese plano dentro del *z-stack,* alineamos el plano de registro al atlas de referencia.

Para la alineación, recurrimos al atlas estándar de Z Brain (Randlett et al., 2015), que ofrece un conjunto de etiquetas anatómicas para diversas áreas cerebrales basado en un cerebro típico de larva de pez cebra de 6 dpf. Este procedimiento presentó varios desafíos técnicos. En primer lugar, no todos los animales registrados en nuestros experimentos tenían exactamente 6 dpf (utilizamos animales de 4 a 7 dpf). En esta etapa del desarrollo, existen diferencias significativas en la morfología del cerebro en este rango de edades, lo cual dificulta la alineación con el atlas. En segundo lugar, el marcador fluorescente con el que está teñido el atlas Z Brain es de expresión nuclear, mientras que nuestro marcador es citoplasmático.

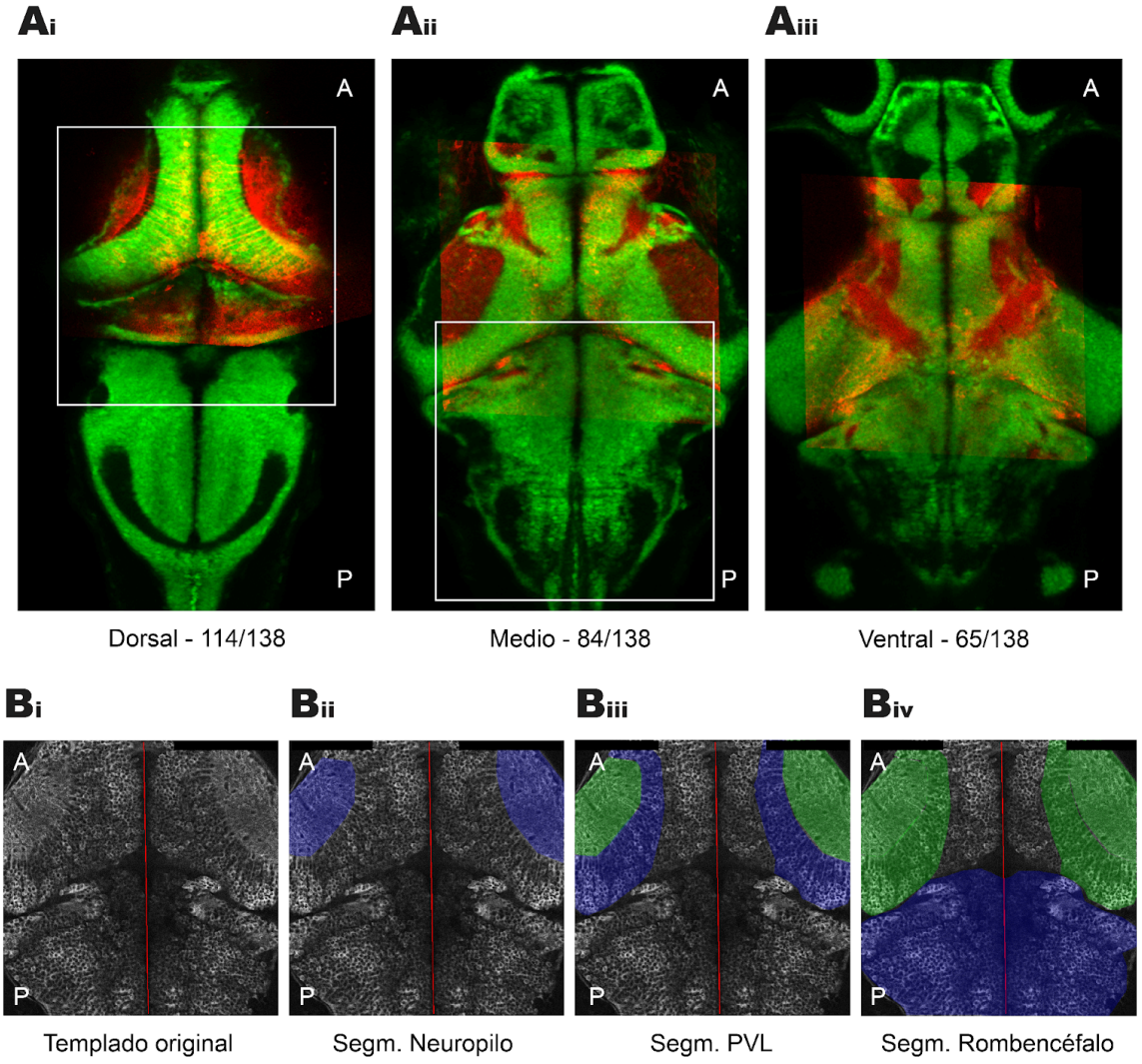


Figura 31. Alineación y segmentación anatómica de áreas cerebrales de interés. (A_{i-iii}) Alineación de imágenes volumétricas de un cerebro representativo (rojo) con el atlas cerebral de referencia de Z-brain (verde) para tres planos tomados como ejemplo del volumen total (114, 84 y 65 de 138 planos totales, respectivamente). El recuadro blanco en A_i señala de manera aproximada la región visible en B, correspondiente a la región de interés para la serie experimental IMG-TEC. El recuadro blanco en A_{ii} señala de manera aproximada la región de interés para la serie experimental IMG-ROM, no ejemplificada en B. (B_{i-iv}) Capturas de pantalla tomadas del proceso de segmentación manual de áreas cerebrales de interés para IMG-TEC. Se observa el templado original (B_i), el neuropilo tectal segmentado (B_{ii}, región azul), la PVL segmentada (B_{iii}, azul) y el Rombencéfalo

segmentado (Biv, azul). En verde se grafican regiones segmentadas con anterioridad en cada paso. La línea roja marca siempre la línea media del animal.

A pesar de estas limitaciones, alineamos nuestros volúmenes cerebrales con este atlas utilizando un algoritmo desarrollado en MATLAB por el laboratorio de Germán Sumbre (École Normale Supérieure). Brevemente, el procedimiento consiste en identificar puntos anatómicos claramente reconocibles tanto en nuestros volúmenes capturados como en el atlas estándar. Entre 10 y 20 puntos de referencia son necesarios para obtener una alineación satisfactoria, corroborada visualmente por un observador experto. Algunos de los marcadores anatómicos utilizados fueron el límite rostral del Tectum, el límite dorsal de las habénulas, el borde posterior del cerebelo, entre otros.

Las alineaciones realizadas mediante este procedimiento resultaron suficientemente precisas como para estimar de manera confiable las coordenadas de cada ROI en el cerebro estándar de referencia (Figura 31A). Sin embargo, existía una posibilidad de que algunos ROIs fueran identificados como pertenecientes a regiones incorrectas debido a un efecto borde. Es decir, ROIs ubicados cerca del límite entre dos áreas anatómicas adyacentes podrían ser incorrectamente asignados a la región vecina.

Para evitar este problema, aprovechamos el hecho de que nuestras regiones de interés (el neuropilo tectal, la PVL del Tectum y el Rombencéfalo) son claramente identificables por un observador con conocimiento de anatomía cerebral de peces cebra. Desarrollamos una interfaz gráfica que permite segmentar manualmente regiones anatómicas enteras sobre los planos registrados y que luego identifica automáticamente los ROIs que se encuentran dentro de cada una de estas áreas segmentadas (Figura 31B). Esta estrategia minimizó el riesgo de asignaciones incorrectas, asegurando que los ROIs analizados correspondieran a las áreas anatómicas de interés.

5.5 Procesamiento de la actividad neuronal

Una vez segmentados los ROIs y ubicados anatómicamente, el siguiente paso consistió en extraer la actividad neuronal para cada uno de ellos a partir de los videos obtenidos durante la adquisición. Dado que cada ROI corresponde a un conjunto específico de píxeles en la imagen, la estrategia consistió en calcular la intensidad promedio de fluorescencia dentro de cada ROI, para cada fotograma del video registrado. Este procedimiento resultó en una serie temporal que estima la actividad fluorescente de cada ROI a través del tiempo (Figura 32A).

Sin embargo, estas series temporales no pueden utilizarse directamente como estimadores de la actividad neuronal. Por un lado, la señal fluorescente puede disminuir a lo largo del experimento debido al fenómeno de fotoblanqueo o *photobleaching* (Diaspro et al., 2006). Adicionalmente, procesos celulares que no se corresponden con la actividad neuronal evocada por nuestros estímulos pueden producir fluctuaciones lentas en la fluorescencia, ya que también dependen del calcio (Russell, 2011). Estas fluctuaciones deben ser diferenciadas de las respuestas neuronales. Por otro lado, distintas células pueden expresar niveles variables

del sensor de calcio, lo que genera una fluorescencia basal distinta entre ROIs. Por estas razones, es fundamental normalizar la señal fluorescente para cada ROI. Esto se hace calculando el ΔF/F, como fue descrito en el Capítulo 2.

Este parámetro depende críticamente del cómputo del valor basal de fluorescencia (F_o). Sin embargo, la bibliografía ofrece una variedad de estrategias para calcularlo. La principal dificultad que se presenta en la estimación de F_o es discernir entre la información correspondiente a la fluorescencia basal, que puede variar en el tiempo, y la información que proviene de actividad neuronal evocada que debe diferenciarse de esta línea de base. En esta tesis utilizamos una opción frecuente en la bibliografía que consiste en tomar un percentil bajo (usualmente el percentil 8) de la distribución de valores de fluorescencia del registro como valor basal, en ventanas temporales suficientemente amplias (~10-15s) como para incluir tanto períodos de actividad como de inactividad neuronal (Romano et al., 2015). Una vez obtenido el ΔF/F (Figura 32B), definimos el umbral de activación para cada ROI como el valor de ΔF/F 1.2 desvíos estándar por encima de la media. Siempre que un ROI supera este umbral se considera activo. Este umbral fue seleccionado mediante el análisis visual de múltiples registros, de tal manera que la actividad clasificada como positiva coincidiera con los eventos considerados relevantes por un observador experto. Es importante mencionar que, si este umbral fuese distinto al valor que separa de manera óptima señal de ruido, podría subestimarse el efecto de la estimulación, pero nunca podría capturarse un efecto espurio si el mismo no existiera.

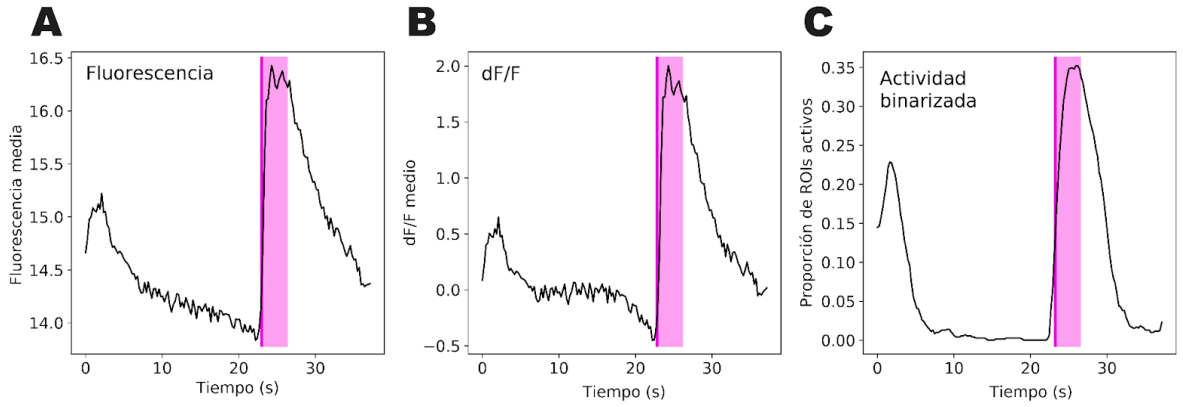


Figura 32. Procesamiento de la señal de fluorescencia. (A) Fluorescencia media (brillo del pixel) no procesada en función del tiempo, para todos los ROIs, durante un ensayo ejemplo de un experimento representativo. (B) Trazo medio del ΔF/F medio en función del tiempo, para los mismos ROIs que en A. (C) Proporción de ROIs activos en función del tiempo, calculado en base a la actividad binarizada de todos los ROIs incluídos en A. En todos los casos, la línea magenta indica el momento de estimulación (fin del *looming* u ocurrencia del estímulo auditivo) y el área sombreada rosa indica la ventana de análisis.

Si bien usualmente este método de definición de la línea de base es robusto, puede incluir información de las respuestas neuronales. Si las respuestas son particularmente intensas o duraderas elevarán espuriamente la línea de base y, como consecuencia, se subestimarán algunas respuestas neuronales. Para resolver este problema, implementamos una segunda iteración del mismo proceso: luego del cálculo inicial del ΔF/F, identificamos los momentos

de la señal en los que ocurrían respuestas neuronales y recalculamos la línea de base (F_o) excluyendo estos momentos de la señal original de fluorescencia. Esto permitió obtener una nueva línea de base a partir de la cual recalculamos el ΔF/F y repetimos la definición del umbral. Esta segunda iteración produjo una estimación más precisa de la actividad neuronal (Figura 32C) y constituyó la versión definitiva de nuestros datos para todos los análisis posteriores.

En base a registros preliminares en respuesta a nuestros estímulos definimos una ventana temporal de interés de 2.8 segundos posteriores a la presentación del estímulo auditivo, o a la finalización del *looming* (Figura 32A-C, sombreado magenta). Cualquier ROI cuya actividad superó el umbral en al menos un fotograma durante esa ventana fue clasificado como activo en ese ensayo. Definimos la consistencia de un ROI como el número total de ensayos en los cuales ese ROI se activó en respuesta a una cierta condición de estimulación.

5.6 Registro del comportamiento durante experimentos de imaging

Uno de los principales objetivos de este trabajo es relacionar la actividad neuronal registrada con el comportamiento observable de las larvas. Idealmente, esto implicaría registrar simultáneamente señales neuronales y los movimientos corporales del animal. En muchos estudios de *imaging* de calcio en larvas de pez cebra que buscan correlacionar actividad neural y comportamiento, se inmoviliza la cabeza en agarosa pero se deja la cola libre para nadar, y se monta una cámara adicional (generalmente una cámara de alta velocidad colocada adyacente al microscopio) para filmar los movimientos de la cola durante la estimulación (Ahrens et al., 2013; Kim et al., 2017). Sin embargo, en nuestro *set-up* experimental, las restricciones físicas del microscopio y el hecho de que este sea un equipo compartido con otros grupos impiden colocar una cámara adicional para registrar movimientos de animales con la cola liberada de la agarosa, como sí hicimos en otras condiciones experimentales (ver Capítulo 9).

Sin embargo, observando los registros de actividad neuronal, notamos dos tipos de desplazamiento de la imagen capturada. Por un lado, existían movimientos lentos y graduales, posiblemente causados por ligeros desplazamientos de la matriz de agarosa a lo largo del tiempo. Por otro lado, observamos movimientos abruptos y breves de la imagen que retornaban rápidamente a su posición original. Visualmente, estos eventos abruptos parecían corresponder a movimientos generados por el propio animal, posiblemente intentos motores frenados por la matriz de agarosa en la que estaba completamente inmerso. Estos movimientos, además, parecían producirse con mayor frecuencia durante la estimulación sensorial, sugiriendo que podían ser efectivamente eventos motores relacionados con respuestas comportamentales (Video 4).

Para cuantificar este fenómeno, utilizamos los resultados obtenidos del algoritmo de corrección de movimiento previamente aplicado a los videos registrados (Capítulo 2), el cual alinea todos los fotogramas al templado. Este algoritmo ofrece, como uno de sus *outputs*, la

cantidad de píxeles que fue necesario desplazar a cada fotograma para alinearlo correctamente a la imagen utilizada como templado. La derivada de esta serie temporal corresponde a la velocidad de desplazamiento de la imagen cuadro a cuadro. Estos registros corroboraron nuestras observaciones iniciales, mostrando un desplazamiento gradual de las imágenes al cual se superponían eventos abruptos y discretos (Figura 33A). Esto nos permitió identificar los fotogramas en los que se producían eventos abruptos, considerándolos como posibles eventos motores.

Estos eventos resultaron ser considerablemente más frecuentes durante la presentación de estímulos multisensoriales que durante la presentación del máximo unisensorial, que resultó ser el estímulo auditivo (Figura 33B, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.029). Notablemente, este patrón de respuesta coincide con nuestros resultados comportamentales con animales en nado libre (Capítulo 4). Dado que estos comportamientos suceden en respuesta a estímulos aversivos y exhiben integración multisensorial de manera similar a lo observado en experimentos con larvas en nado libre, es factible que los eventos observados se correspondan con intentos de escape por parte del animal.

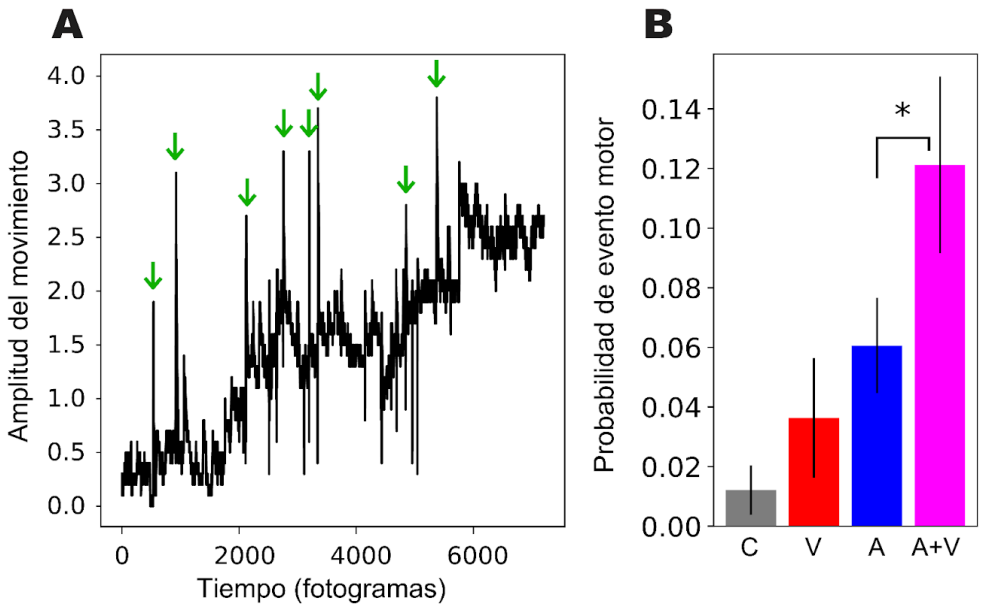


Figura 33. Detección de eventos de movimiento en experimentos de *imaging*. (A) Desplazamiento de la imagen necesario para alinear cada fotograma con el templado, en función del tiempo. Flechas verdes indican eventos rápidos de movimiento, en los que la imagen se desplaza rápidamente y luego vuelve a la posición inicial. Notar que en esta figura están concatenadas todas las imágenes adquiridas de un mismo plano a lo largo del tiempo por lo que el número de fotogramas es mucho mayor que en un ensayo individual en respuesta a un estímulo. (B) Probabilidad de observar un evento motor en cada condición de estimulación analizada (C, control, gris; V, visual, rojo; A, auditivo, azul, A+V, multisensorial, magenta) (n_eventos = 157, N = 33). *p = 0.029.

A continuación, buscamos correlaciones entre los eventos motores observados y la actividad neuronal en el Rombencéfalo, un área conocida por su rol pre-motor, con el objetivo de identificar neuronas cuyas respuestas estuvieran significativamente asociadas a estos eventos. Para descartar que estos movimientos y sus respuestas asociadas fueran artefactos generados,

por ejemplo, por la vibración del parlante durante la presentación de estímulos auditivos, analizamos específicamente eventos motores ocurridos fuera de la ventana de estimulación. Calculamos, para cada ROI del Rombencéfalo, la proporción de eventos (espontáneos) en los cuales se activaba simultáneamente con los movimientos detectados. Como control negativo, generamos una distribución nula seleccionando momentos aleatorios fuera de la ventana de estimulación y calculando, para cada ROI, la proporción de estos tiempos aleatorios en los que estaban activos. De esta manera, estimamos la probabilidad de estar activo en un dado tiempo debido al azar. Al comparar ambas distribuciones (barras verdes vs. barras grises en la Figura 34A), encontramos que un número significativo de ROIs respondía en una proporción mucho más alta durante eventos motores espontáneos que la esperada por azar. Todos los ROIs cuya probabilidad de activación durante estos eventos fuera mayor al percentil 99 de la distribución nula fueron definidos como neuronas asociadas al movimiento (NAM, área verde en Figura 34A).

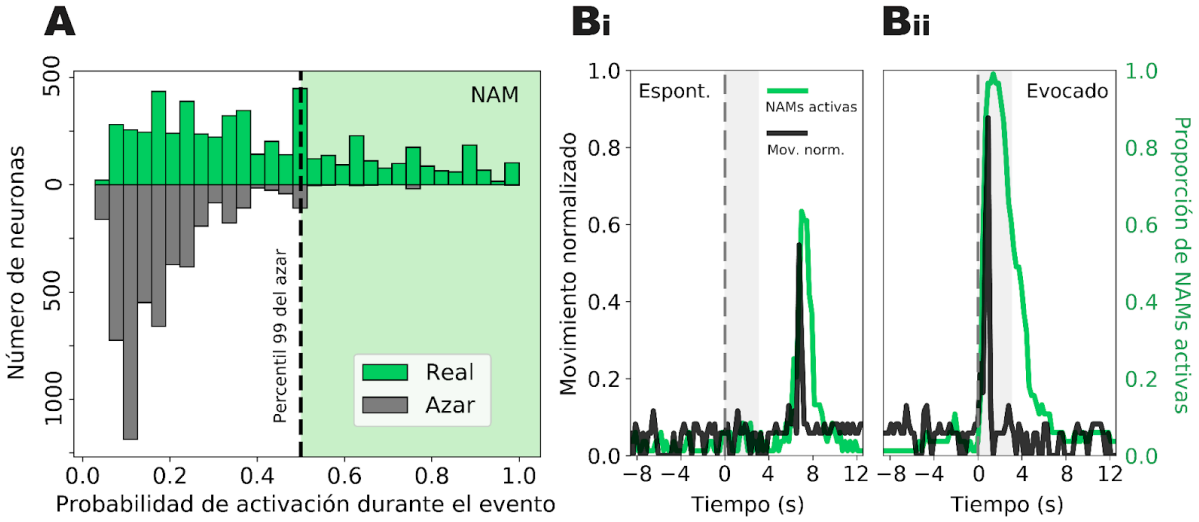


Figura 34. Identificación de Neuronas Asociadas al Movimiento (NAMs). (A) Distribución de ROIs según su probabilidad de activación durante eventos motores espontáneos, a través de todos los experimentos analizados (histograma verde). El histograma gris representa una distribución nula, calculada de la misma manera sobre puntos temporales tomados al azar durante los registros. (B) Ejemplos representativos de respuestas neuronales asociadas a eventos motores, en un caso espontáneo (B_i) y en un caso evocado (B_{ii}). Trazos negros representan el movimiento detectado en función del tiempo, normalizado entre 0 y 1. Trazos verdes representan la proporción de NAMs activas en función del tiempo. Líneas punteadas representan el tiempo de estimulación, y la sección sombreada en gris representa la ventana de análisis.

Al analizar los patrones de activación de estas neuronas, observamos un aumento significativo de la proporción de neuronas del Rombencéfalo activas durante estos eventos motores espontáneos (Figura $34B_i$). Crucialmente, este mismo aumento ocurrió durante eventos motores evocados por estímulos sensoriales (Figura $34B_{ii}$), confirmando que las NAM se activan tanto en movimientos espontáneos como en los evocados.

El desarrollo de esta metodología nos permitió investigar la relación entre la actividad neuronal y comportamientos motores en larvas completamente inmersas en agarosa. Con este

objetivo, utilizaremos la respuesta de las NAM como estimador del comportamiento en los Capítulos 7 y 8.

CAPÍTULO 6: EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN UNISENSORIAL EN EL TECTUM

6.1 Filtrado y selección de experimentos

El Tectum exhibe respuestas robustas a estímulos visuales, un fenómeno ampliamente documentado en la bibliografía y confirmado por nuestros experimentos preliminares. Sin embargo, la evidencia de respuestas auditivas directas en esta estructura es considerablemente más escasa (Poulsen et al., 2021; Thompson et al., 2016; Vanwalleghem et al., 2017). Esto realza la importancia de estudiar la codificación tectal de información auditiva, uno de los objetivos centrales de esta tesis. Por otro lado, implica la necesidad de asegurar que los estímulos auditivos utilizados fueron efectivamente percibidos y que la información correspondiente alcanzó el Tectum en cada experimento analizado. Por esta razón, durante el análisis de la serie experimental IMG-TEC (ver Tabla 1), seleccionamos únicamente aquellos experimentos en los que existiera evidencia clara de procesamiento auditivo tectal.

En primer lugar, según los métodos descritos en el Capítulo 5, excluimos del análisis a cualquier ROI que no mostrara actividad significativa (es decir que no superaron el umbral definido en la Sección 5.5) durante la ventana temporal de análisis post-estímulo en ninguno de los 5 ensayos de ninguna de las condiciones de estimulación presentadas. En segundo lugar, decidimos excluir del análisis cualquier experimento en el cual no se detectara al menos un ROI en el Tectum Periventricular (PVL) que respondiera consistentemente al estímulo auditivo. Para aplicar este criterio de selección, calculamos primero un perfil de consistencia auditiva para la PVL de cada experimento. Definimos la consistencia de respuesta de un ROI como el número de ensayos (sobre un total de cinco presentaciones) en los que dicho ROI exhibió actividad significativa en respuesta a un estímulo (Sección 5.5). De esta manera, si un ROI respondió 5 de 5 veces en las que se presentó el estímulo auditivo, tuvo una consistencia de 5, mientras que, si no respondió a ninguna de las presentaciones, tendrá consistencia 0. Luego de determinar la consistencia de cada ROI de la PVL, determinamos la consistencia máxima observada dentro de la PVL para cada experimento individual. Crucialmente, realizamos el mismo procedimiento para los ensayos control (en los que no se realizó ningún protocolo de estimulación).

Basándonos en esta comparación, elegimos un umbral de consistencia de 3 como punto de corte mínimo para la inclusión de experimentos en análisis posteriores. Es decir, no incluímos experimentos en los que ningún ROI de la PVL tuviera una consistencia de al menos 3 para la condición auditiva (Figura 35, área sombreada, notar diferencia entre barras azules, que muestran cantidad de experimentos que cumplen el requisito para la condición auditiva, y barras grises, que muestran la cantidad de experimentos que cumplen ese requisito para la condición control). Este criterio de selección resultó en la inclusión de 33 planos, tomados de 24 animales, de un total de 114 (68 animales). Todos los análisis presentados en este capítulo y en el capítulo 7 se realizaron exclusivamente sobre este conjunto de experimentos.

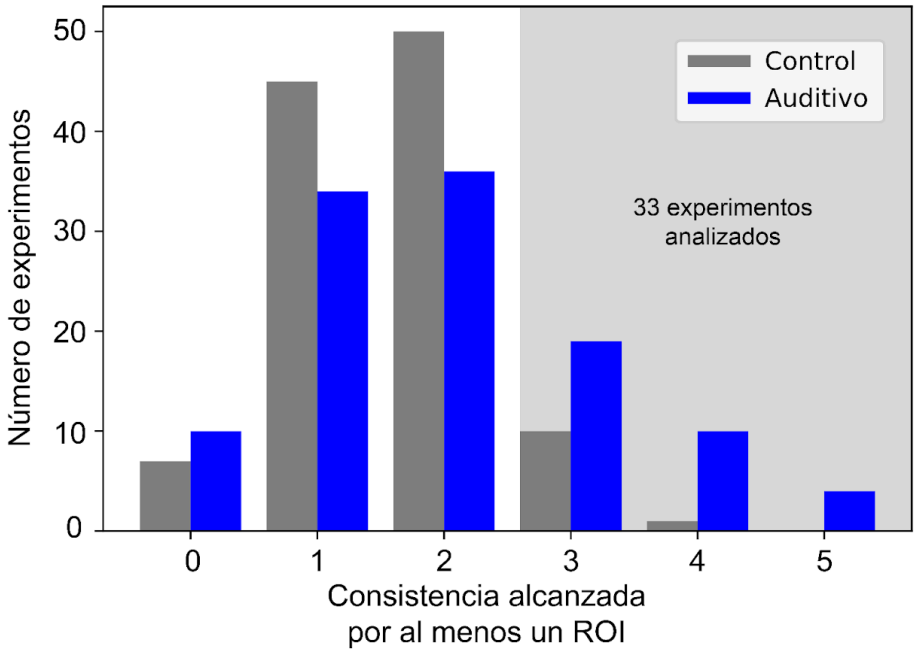


Figura 35. Número de experimentos en los cuales detectamos al menos un ROI cuya consistencia fue al menos la señalada en el eje x, para ensayos control (gris) y ensayos auditivos (azul). Analizamos solo experimentos que contienen al menos un ROI cuya consistencia ante estímulos auditivos es de 3 o más (área sombreada en gris), incluyendo 33 experimentos en total.

6.2 La respuesta del Tectum Periventricular a estímulos auditivos

La actividad neuronal en la PVL de los experimentos seleccionados resultó considerablemente mayor en los ensayos auditivos en comparación con los ensayos control. Las Figuras 36A y 36B muestran las respuestas poblacionales para ambas condiciones, representadas como la proporción de ROIs activos a lo largo del tiempo para todos los ensayos analizados (n = 165) de todos los experimentos (N = 33) incluídos en el análisis. Cada trazo de la Figura 36A-B muestra la proporción de ROIs activos a cada tiempo para un ensayo. Mientras que se observa un nivel basal de actividad espontánea (curvas grises) en los ensayos control (Figura 36A), se observa un incremento en la proporción de ROIs activos en la mayoría de los ensayos de manera coordinada con la presentación del sonido (Figura 36B, curvas azules). El tiempo exacto de inicio, la duración y la amplitud de estas respuestas poblacionales variaron entre ensayos.

En la Figura 36C se muestra el promedio de las curvas de respuesta poblacional de todos los ensayos a través de todos los experimentos en la condición control y en respuesta al estímulo auditivo. Mientras que la actividad espontánea se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo (aproximadamente un 3% de los ROIs de la PVL activos en cada fotograma), la actividad evocada por el estímulo auditivo experimenta un claro incremento tras la presentación del sonido, alcanzando un máximo aproximadamente 1 segundo después de la estimulación (con aproximadamente un 8% de los ROIs totales activos en ese momento). Para confirmar la robustez de este efecto a nivel individual, comparamos la proporción de

ROIs activos durante la ventana de análisis post-estímulo entre la condición control y la auditiva (área gris en la Figura 36C), dentro de cada experimento. Este análisis reveló un aumento significativo y consistente en la proporción de ROIs activos en respuesta al estímulo auditivo para la enorme mayoría de los experimentos analizados (Figura 36D, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$).

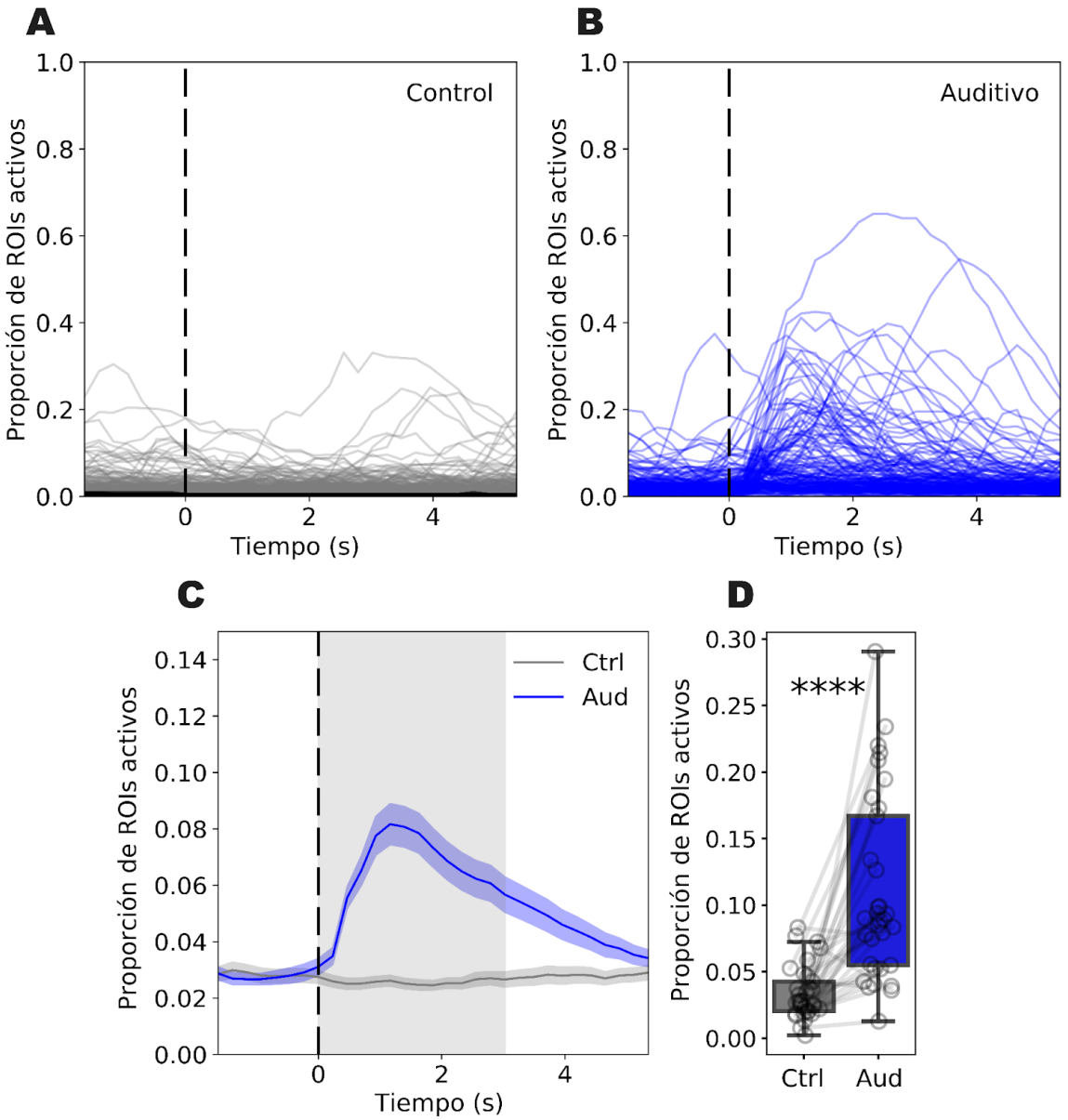


Figura 36. Respuesta poblacional de la PVL espontánea y frente a estímulos auditivos. (A) Proporción de ROIs activos en cada ensayo control (N = 33, n = 165). (B) Proporción de ROIs activos en ensayos auditivos. La línea punteada vertical representa el tiempo de estimulación auditiva. (C) Proporción media de ROIs activos en la PVL en función del tiempo, para ensayos control (gris) y auditivos (azul). El área gris representa la ventana de análisis. (D) Proporción de ROIs activos en ensayos control y ensayos auditivos, para cada experimento. Cada círculo representa la proporción media de ROIs activos para los cinco ensayos de la condición correspondiente en un experimento. Puntos unidos con líneas provienen del mismo experimento. ****$p < 0.001$.

A continuación, nos preguntamos si las respuestas poblacionales auditivas estarían topográficamente organizadas, o si los ROIs activados, en cambio, se distribuirían al azar en

el plano tectal analizado. En un ejemplo representativo (Figura 37A), se puede apreciar que los ROIs activados por un estímulo auditivo están, de hecho, espacialmente agrupados. Para cuantificar esta observación, calculamos la distancia media entre vecinos más cercanos para la subpoblación de ROIs activos en cada experimento. Esta métrica proporciona una medida de cuán *compacta* es una respuesta poblacional: cuanto menor sea la distancia media entre vecinos más cercanos, más compacta debería ser una respuesta. Sin embargo, es importante notar que esta medida depende intrínsecamente de la proporción total de ROIs activos: una mayor proporción aumenta la probabilidad de que cualquier ROI tenga un vecino cercano por azar. Para poder comparar respuestas independientemente de la proporción de ROIs activos calculamos esta misma métrica para una selección aleatoria de ROIs dentro de cada experimento y condición, preservando el mismo número de ROIs que fueron identificados como activos en los datos reales. Luego, comparamos la métrica de distancia real contra la misma métrica obtenida de la distribución nula. Encontramos que las respuestas auditivas son significativamente más compactas que lo predicho por azar (Figura 37B, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$), confirmando así nuestra observación inicial de que las neuronas que responden al estímulo auditivo tienden a estar espacialmente agrupadas. Sin embargo, la ubicación de estos agrupamientos de ROIs sensibles al estímulo auditivo en la PVL no se conserva entre experimentos.

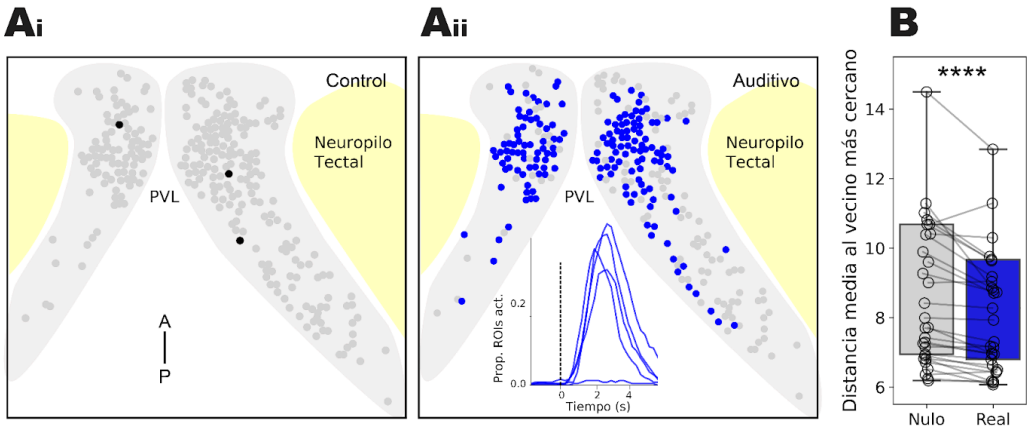


Figura 37. Organización anatómica de la respuesta auditiva en la PVL. (A) Ejemplo representativo de ROIs activos en la PVL, para ensayos control (A_i) y auditivos (A_{ii}). Los puntos grises representan ROIs segmentados en la PVL que nunca respondieron al estímulo auditivo y los azules representan ROIs que sí respondieron. El área sombreada gris representa el área bilateral analizada en la PVL, mientras que el área sombreada amarilla representa de manera esquemática el neuropilo tectal (para referencia anatómica ver Figura 5B). El *inset* de A_{ii} muestra la proporción de ROIs activos en la PVL para los 5 ensayos auditivos luego del tiempo de estimulación (línea punteada vertical). (B) Distancia media entre vecinos más cercanos, para el patrón de ROIs activos durante la condición auditiva (azul) y para subsets aleatorios de ROIs (gris). Cada par de puntos representa un experimento. ****$p < 0.001$.

La proporción de ROIs activos en la PVL aumenta significativamente con la presentación del estímulo auditivo (Figura 36). Sin embargo, esto no incluye información sobre la intensidad de las respuestas evocadas. Una posibilidad es que el estímulo auditivo reclute un mayor número de neuronas en la PVL sin producir un aumento en la intensidad de la respuesta de

calcio evocada. En cambio, las respuestas de estas neuronas podrían, además, estar incrementando su intensidad.

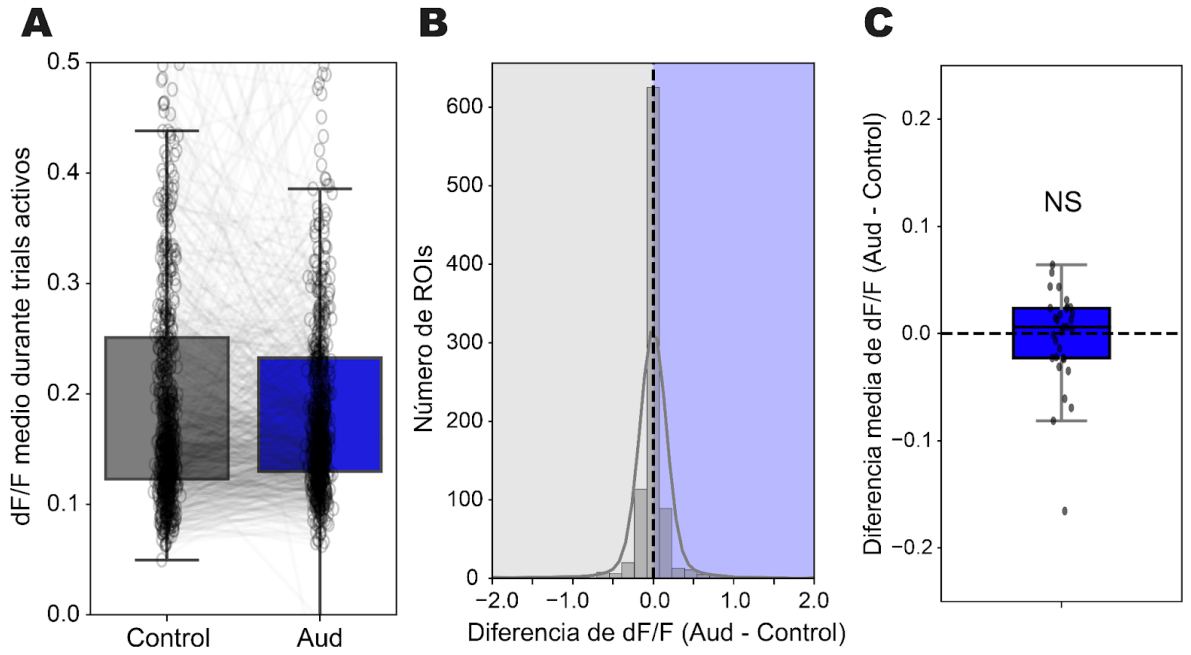


Figura 38. ΔF/F promedio en la PVL durante respuestas espontáneas y auditivas, para ROIs individuales (n = 930). (A) ΔF/F medio para ROIs activos durante la ventana de análisis en la PVL en función del tiempo, para ensayos control (gris) y auditivos (azul). Puntos unidos con líneas representan ROIs individuales que se activaron al menos una vez en ensayos control y en ensayos auditivos. Se incluyen ROIs de todos los experimentos analizados. (B) Diferencia entre el ΔF/F medio de ROIs activos durante la ventana de análisis en ensayos control y ensayos auditivos. La diferencia se calcula por ROI, y se muestra la distribución de estas diferencias para ROIs provenientes de todos los experimentos analizados. El área sombreada azul representa ROIs cuyas respuestas auditivas fueron más intensas que sus respuestas espontáneas (control). (C) Promedio de las diferencias de ΔF/F entre la condición auditiva y la condición control, para ROIs activos, para cada experimento. Cada punto representa el promedio de los coeficientes graficados en B para un experimento. Valores positivos representan experimentos en los que los ROIs activos alcanzaron, en promedio, ΔF/F mayores durante ensayos auditivos que durante ensayos control.

Para comprobarlo, comparamos la magnitud del ΔF/F para respuestas ocurridas en ensayos control y para respuestas ocurridas en ensayos auditivos, para cada uno de los ROIs analizados, con el objetivo de detectar si la magnitud de respuestas evocadas por estímulos sonoros sería mayor a la de la actividad espontánea registrada en las mismas neuronas (Figura 38A, cada par de puntos unidos representa la intensidad de respuesta de un ROI específico para las condiciones control y auditiva). Para este análisis, fue importante evitar pseudo-réplicas estadísticas al analizar ROIs provenientes del mismo experimento de manera individual, pero aún así preservar la información acerca de la diferencia de actividad de neuronas individuales. Para lograr esto, calculamos la diferencia entre la magnitud de las respuestas control y auditivas para cada ROI. La distribución de estas diferencias para ROIs provenientes de todos los experimentos analizados se muestra en la Figura 38B. Luego, calculamos la media de estas diferencias por experimento, obteniendo medidas que preservan información acerca del aumento de la actividad dentro de los mismos ROIs sin incurrir en pseudo-réplicas. Estos valores no resultaron significativamente mayores a 0, indicando que la

magnitud de las respuestas de ROIs individuales ante estímulos auditivos en la PVL no es mayor que la magnitud de las respuestas espontáneas (Figura 38C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p = 0.85$).

6.3 La respuesta del Neuropilo Tectal a estímulos auditivos

El Tectum de peces cebra se divide funcional y anatómicamente en la capa periventricular (PVL) y el neuropilo tectal, como se mencionó en el Capítulo 1 (Figura 5B). El neuropilo tectal contiene algunos somas de interneuronas y los árboles dendríticos de las neuronas cuyos somas residen en la PVL, además de recibir una gran cantidad de aferencias provenientes de diversas áreas cerebrales, incluyendo la retina, el tálamo y otras regiones sensoriales. El neuropilo presenta una estructura laminada, donde distintas capas reciben diferentes tipos de información y cumplen funciones distintas (Baier & Scott, 2024). Debido a que el neuropilo es una región de interacción entre aferencias y eferencias del Tectum, resultaba de interés investigar si el estímulo auditivo evocaba respuestas en el neuropilo y, en caso afirmativo, si presentaba alguna estructura anatómica particular relacionada con las capas de esta región. Para analizar esta respuesta, fue ventajoso contar con un sensor de calcio que se expresara en el citoplasma de las neuronas. Dado que la mayoría de las sinapsis se realizan en los árboles neuríticos, era esperable encontrar una respuesta al menos igualmente intensa a la encontrada en la PVL.

Pese a que existen algunos somas en el neuropilo tectal, la abundancia mucho mayor de procesos neuríticos contaminaría la fluorescencia de esos pocos ROIs correspondientes a somas neuronales. Por esta razón, no analizamos respuestas de neuronas individuales. En cambio, subdividimos el área del neuropilo visible en nuestros registros en una grilla regular de celdas cuadradas (5 μm de lado). Cada una de estas celdas fue tratada como un ROI. Es importante destacar que, bajo este paradigma de análisis, no interpretamos la actividad de estos ROIs como independiente de sus vecinos, sino que utilizamos la proporción de ROIs (celdas) activas en cada punto temporal como una medida de la extensión del área del neuropilo que exhibe actividad significativa. Ni siquiera inferimos aquí que dicha actividad provenga de los somas de la PVL o de aferentes del Tectum dado que no realizamos experimentos para distinguirlas. La principal ventaja de esta estrategia comparada con tomar el promedio de la actividad de todo el neuropilo como una única área de interés es la posibilidad de estudiar si hay una representación anatómica de las respuestas observadas.

En la Figura 39 se muestra cómo evoluciona la proporción de área activa en el neuropilo a lo largo del tiempo en ensayos control (gris, Figura 39A) y en ensayos de estimulación auditiva (azul, Figura 39B), para todos los experimentos analizados. Al igual que observamos en la PVL, existen respuestas espontáneas en el neuropilo, pero estas son relativamente escasas y no están agrupadas en una ventana temporal específica. Por el contrario, las respuestas evocadas por el estímulo auditivo son más sincrónicas y ocurren con una frecuencia mayor. En términos de la extensión de esta actividad, algunos ensayos individuales pueden llegar a abarcar hasta un 50% del área visible del neuropilo, aunque en promedio el área que se activa

producto del estímulo auditivo es del 12% (Figura 39C) mientras que el área activa de manera basal durante los ensayos control se mantiene alrededor del 3%. Cuando comparamos el área activada durante la ventana de análisis entre la condición control y la auditiva dentro de cada experimento, esta diferencia resulta significativa (Figura 39D, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$), replicando el patrón observado en la PVL.

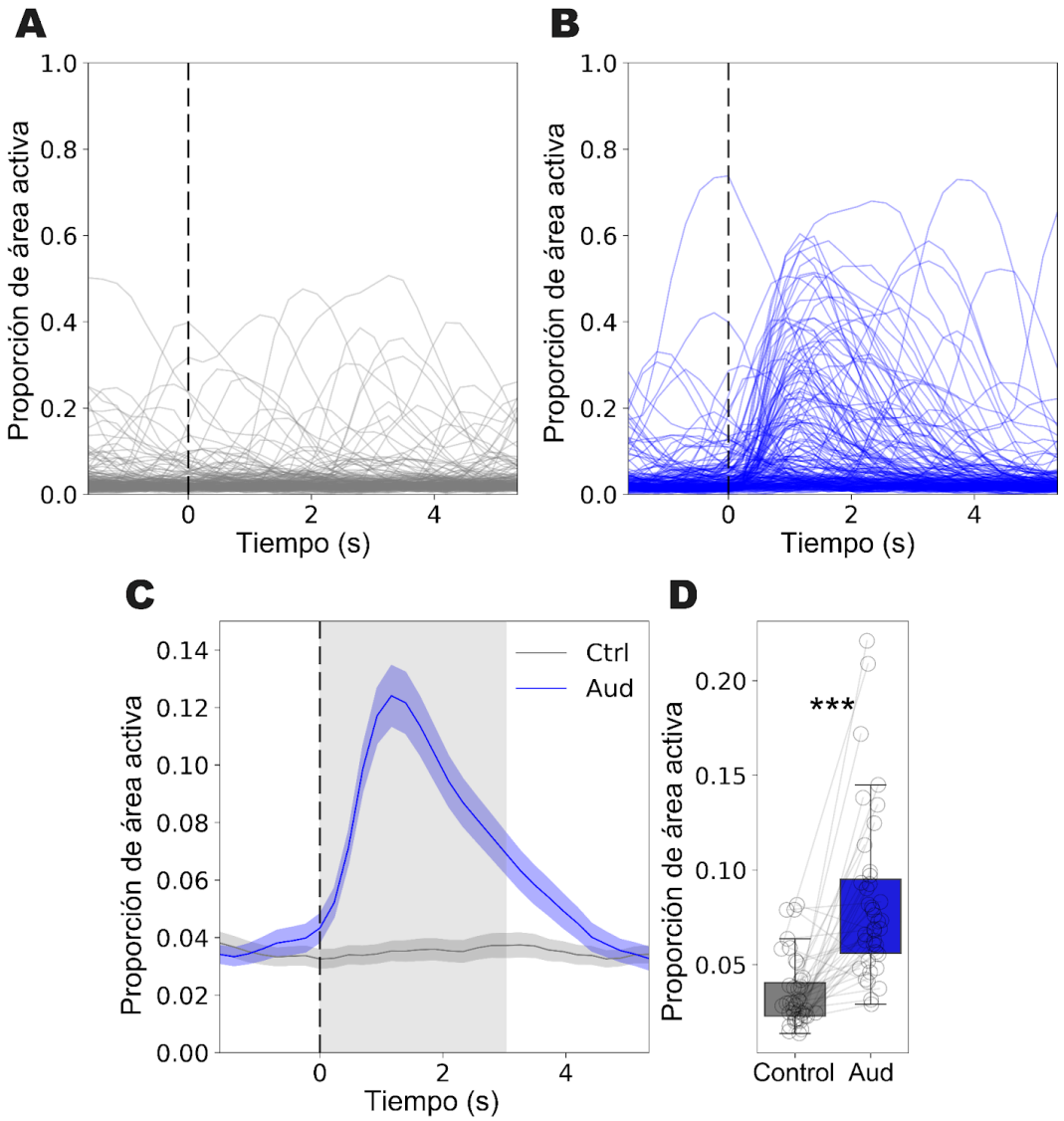


Figura 39. Respuesta poblacional del neuropilo tectal a estímulos auditivos. (A) Proporción de área activa en cada uno de los ensayos control registrados (N = 33, n = 165). (B) Proporción de área activa en cada uno de los ensayos auditivos registrados. La línea punteada vertical representa el tiempo de estimulación. (C) Proporción media de área activa en función del tiempo, para ensayos control (gris) y auditivos (azul). (D) Diferencia entre la proporción de área activa en ensayos control y ensayos auditivos, para cada experimento. ***$p < 0.001$.

Es importante notar que el hecho de que la actividad auditiva parezca comenzar antes de la ocurrencia del estímulo (Figura 39C) refleja un artefacto del análisis. En particular, cuando binarizamos el $\Delta F/F$ para determinar la actividad / no actividad de los ROIs aplicamos un filtro gaussiano a la señal con el objetivo de reducir el ruido y mejorar la precisión de este umbral de decisión. Esto contamina levemente los tiempos previos a la estimulación con

actividad posterior a la misma. Dado que en esta tesis no analizamos en detalle la temporalidad de la actividad neuronal ni la sincronicidad de distintos eventos, esto no resulta problemático para nuestros objetivos.

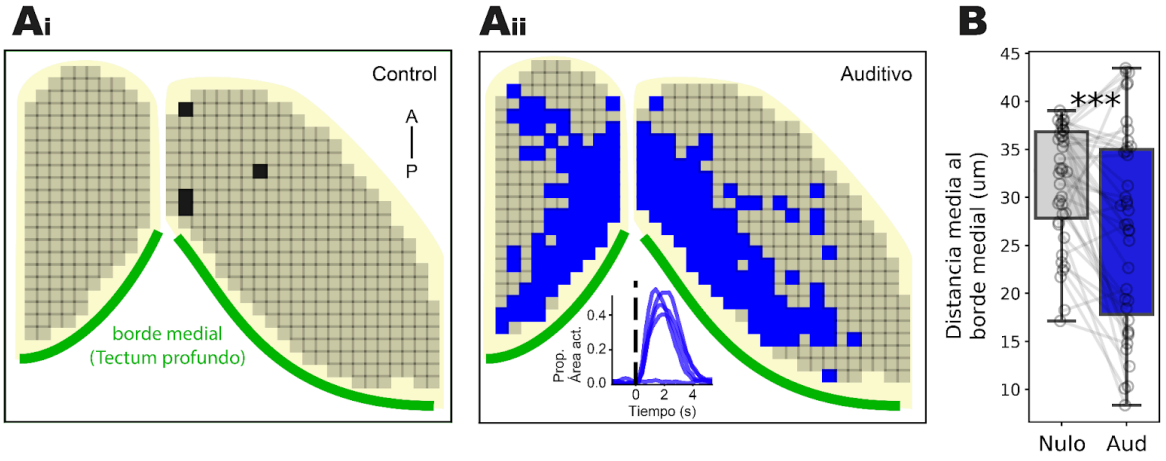


Figura 40. Organización anatómica de la respuesta auditiva en el neuropilo tectal. (A) Ejemplo representativo de celdas activas en el neuropilo, para ensayos control (A_i) y auditivos (A_{ii}). El área amarilla representa esquemáticamente el neuropilo tectal. La curva verde representa el borde medial del neuropilo (correspondiente al neuropilo profundo, borde adyacente a la PVL). El *inset* de A_{ii} muestra la proporción de área activa a través del tiempo para los cinco ensayos auditivos correspondientes a este experimento. La línea vertical punteada marca la ocurrencia del estímulo auditivo. (B) Distancia media al borde medial del neuropilo (curva verde en A), para las celdas activas en alguno de los 5 ensayos auditivos (azul) o en distribuciones al azar del mismo número de celdas (nulo, gris) de cada experimento. ***p = 0.002.

A continuación, nos preguntamos si la actividad auditiva mostraba un patrón espacial relacionado con la estructura laminar del neuropilo. En el ejemplo representativo mostrado en la Figura 40A_{ii}, se puede observar que el área activada en respuesta al sonido parece localizarse preferentemente cerca del borde medial de ambos lóbulos tectales de manera bilateral y aproximadamente simétrica. Para cuantificar esta observación, medimos, para cada ensayo auditivo, la distancia entre cada celda activa durante la ventana de análisis y el punto más cercano de una curva que define el borde medial del neuropilo (indicadas como curvas verdes en la Figura 40A). Calculamos el promedio de estas distancias para todas las celdas activas en un ensayo, obteniendo una distribución de distancias medias que caracteriza la ubicación del área activada por nuestro estímulo auditivo en el eje latero-medial, a través del cual se suceden las láminas del neuropilo. Realizamos el mismo cálculo para una selección al azar del mismo número de celdas para cada experimento (modelo nulo). Los resultados, presentados en la Figura 40B, muestran que la distancia al borde medial es significativamente menor en la condición auditiva que la distancia obtenida por azar (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.002). Esto confirma que la respuesta auditiva en el neuropilo tiende a concentrarse en las regiones más cercanas al borde medial, que corresponden a sus capas más profundas. Este hallazgo se condice con estudios previos realizados en otras especies, que demuestran que el Tectum recibe aferencias de modalidades sensoriales no visuales predominantemente en sus capas profundas (Hiramoto & Cline, 2009; Kardamakis et al., 2016; Knudsen, 1982).

6.4 La respuesta del Tectum Periventricular a estímulos visuales

Si bien es sabido que el Tectum responde a una gran variedad de estímulos visuales (Del Bene et al., 2010; Dunn et al., 2016; Temizer et al., 2015), era de interés para nuestros objetivos conocer específicamente cómo responde esta estructura a nuestro estímulo de tipo *looming*. En nuestros experimentos usamos CM = 0.59 (V_{max}) para asegurar una alta saliencia visual (Figura 9B). Procedimos a realizar un análisis análogo al detallado para el estímulo auditivo en las secciones 6.2 y 6.3, pero enfocándonos ahora en el estímulo visual. Una vez más, comenzamos analizando las respuestas de ROIs correspondientes a somas de la capa periventricular (PVL).

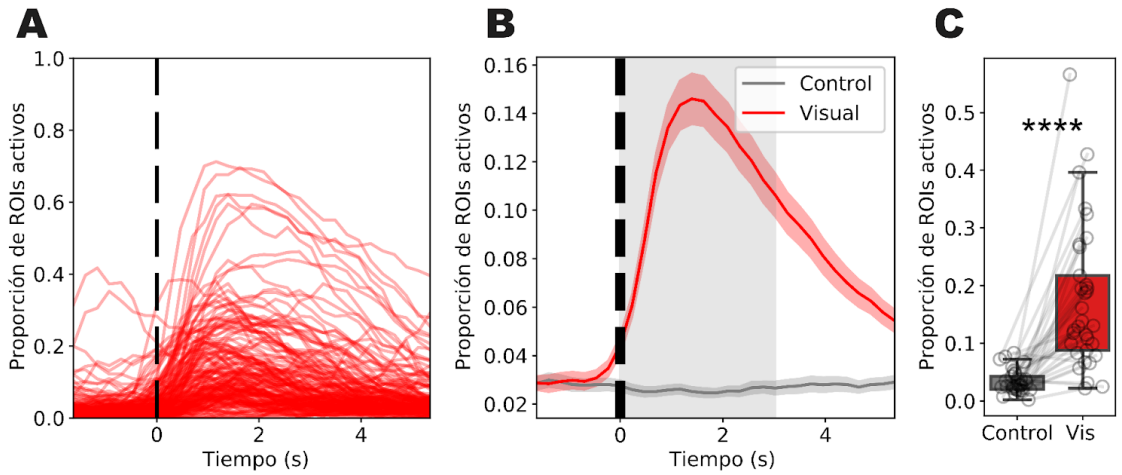


Figura 41. Respuesta poblacional de la PVL a estímulos visuales. (A) Proporción de ROIs activos en cada uno de los ensayos visuales registrados (n = 165, N = 33). La línea punteada vertical representa el final de la estimulación visual. (B) Proporción media de ROIs activos en la PVL en función del tiempo, para ensayos control (gris) y visuales (rojo). El área gris representa la ventana de análisis. (C) Diferencia entre la proporción de ROIs activos en ensayos control y ensayos visuales, para cada experimento. Cada punto representa la proporción media de ROIs activos para los cinco ensayos de la condición correspondiente en un experimento. Puntos unidos con líneas provienen del mismo experimento. ****$p < 0.001$.

Al igual que en las secciones anteriores, registramos la respuesta del Tectum frente a 5 ensayos en los que se presentó el estímulo visual y evaluamos la fluorescencia evocada en cada uno de los ROIs segmentados en la PVL. Los estímulos visuales evocaron respuestas en la PVL con una frecuencia mucho más alta que la observada durante la actividad espontánea (Figura 41A, comparar con 36A), y estas respuestas ocurrieron de manera sincronizada con la finalización de la expansión del estímulo visual. Al calcular el promedio de todos los ensayos y experimentos, el pico de la respuesta poblacional visual alcanzó un 15% de ROIs activos (Figura 41B). Este valor es mayor que el 3% observado en promedio durante la actividad espontánea (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$, Figura 41C).

Los ROIs activados durante la respuesta visual no se distribuyeron al azar, sino que tienden a formar agrupaciones compactas (Figura 42A), como observamos también para las respuestas auditivas. Cuantificamos este agrupamiento utilizando la misma métrica que en la Figura

37B: calculamos la distancia promedio entre cada ROI activo y su vecino activo más cercano, y comparamos la distribución de estas distancias contra una distribución nula, formada por valores calculados de la misma manera sobre un subset de ROIs elegidos al azar, preservando el número de ROIs visualmente activos en cada experimento. Efectivamente, corroboramos que el estímulo visual evoca respuestas más compactas que lo esperado por azar (Figura 42B, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$). Este hallazgo es esperado, dado que sabemos que el campo visual se proyecta de manera retinotópica sobre el Tectum (Baier & Scott, 2024). Por lo tanto, un estímulo visual presentado en una posición fija del campo visual (como nuestro *looming*) debería activar preferentemente un grupo de neuronas tectales que reflejen esa posición. Este efecto puede apreciarse en el ejemplo representativo mostrado en la Figura 42A, donde la respuesta fue más intensa en el hemisferio tectal izquierdo (contralateral al ojo estimulado).

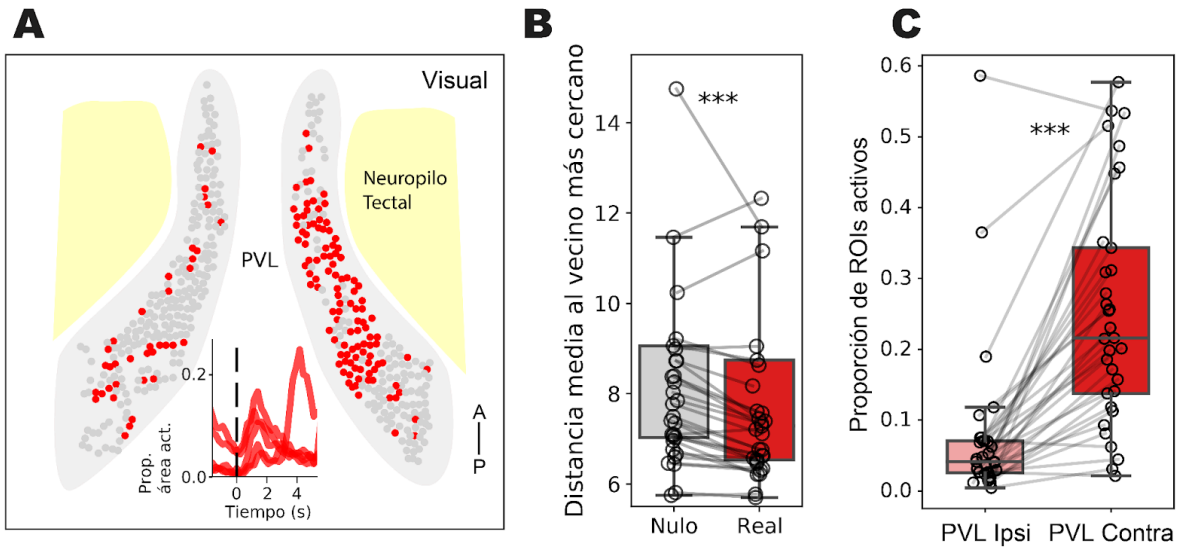


Figura 42. Organización anatómica de la respuesta visual en la PVL. (A) Ejemplo representativo de ROIs responsivos en la PVL para ensayos visuales. El *inset* muestra la proporción de ROIs activos a través del tiempo para los cinco ensayos visuales correspondientes a este experimento. La línea vertical punteada marca el final de la expansión del *looming*. (B) Distancia media entre vecinos más cercanos, para el patrón de ROIs responsivos al estímulo visual (rojo), comparada contra el mismo valor calculado para un subset aleatorio de ROIs (gris). Cada par de puntos representa un experimento. (C) Diferencia entre la proporción de ROIs activos en ensayos visuales en la PVL ipsilateral y contralateral al estímulo visual, para cada experimento. ***$p < 0.001$.

Las aferencias visuales provenientes de cada ojo decusan completamente y son procesadas por el hemitectum contralateral (Baier & Scott, 2024). En nuestros experimentos, el estímulo visual se presentó a la derecha del animal, por lo que esperábamos observar respuestas principalmente en el hemitectum izquierdo. Efectivamente, encontramos que la proporción de ROIs activados por el estímulo visual durante la ventana post-estímulo fue significativamente mayor para el hemitectum contralateral que para el ipsilateral al estímulo (Figura 42C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$).

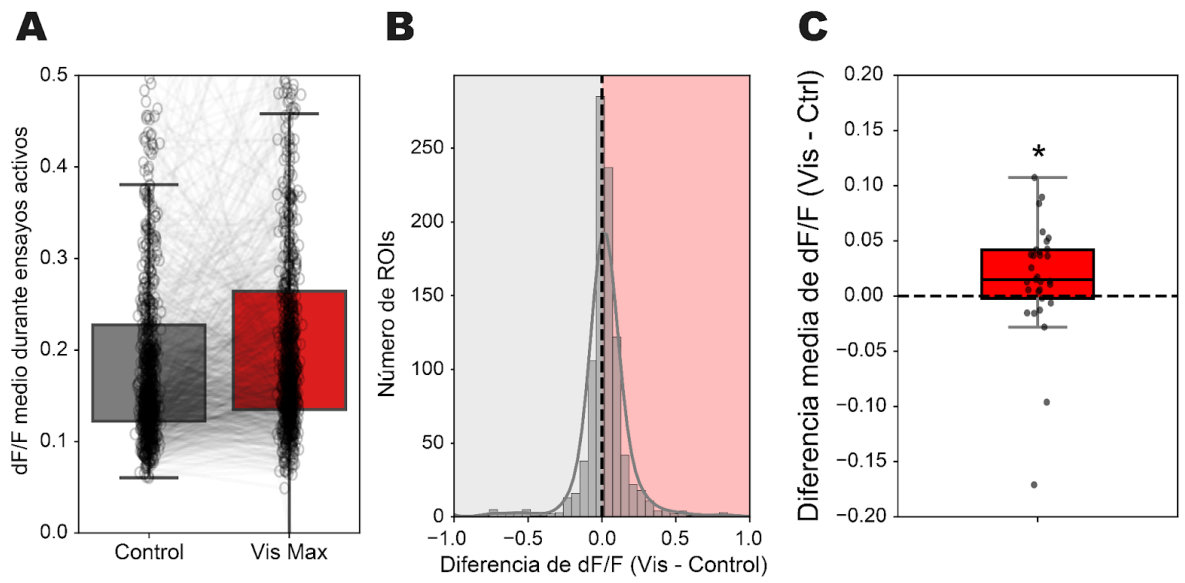


Figura 43. ΔF/F promedio en la PVL durante respuestas espontáneas y visuales, para ROIs individuales (n = 977). (A) ΔF/F medio para ROIs activos durante la ventana de análisis en la PVL en función del tiempo, para ensayos control (gris) y visuales (rojo). Puntos unidos con líneas representan ROIs individuales que se activaron al menos una vez en ensayos control y en ensayos visuales. Se incluyen ROIs de todos los experimentos analizados. (B) Diferencia entre el ΔF/F medio de ROIs activos durante la ventana de análisis en ensayos control y ensayos visuales. La diferencia se calcula por ROI, y se muestra la distribución de estas diferencias para ROIs provenientes de todos los experimentos analizados. El área sombreada roja representa ROIs cuyas respuestas visuales fueron más intensas que sus respuestas espontáneas (control). (C) Promedio de las diferencias de ΔF/F entre la condición visual y la condición control, para ROIs activos, para cada experimento. Cada punto representa el promedio de los coeficientes graficados en B para un experimento. Valores positivos representan experimentos en los que los ROIs activos alcanzaron, en promedio, ΔF/F mayores durante ensayos visuales que durante ensayos control. *p = 0.017.

Finalmente, analizamos la intensidad de las respuestas individuales, medida como el ΔF/F promedio de los ROIs activos para cada condición (control y visual). Para este análisis, replicamos lo realizado en la Figura 38, pero sobre las respuestas visuales. Calculamos el ΔF/F medio para los ensayos activos de cada ROI en la condición control y en la condición visual (Figura 43A) y calculamos la diferencia entre estos dos valores para cada ROI (Figura 43B). Cuando promediamos estos valores para cada experimento, observamos un aumento significativo en la intensidad de las respuestas evocadas por el estímulo visual respecto a la intensidad de las respuestas que ocurrieron espontáneamente durante los ensayos control (Figura 43C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.017). Este resultado sugiere que, a diferencia de lo observado para el estímulo auditivo, los estímulos visuales aumentan la intensidad de las respuestas de neuronas individuales, además de aumentar el número de neuronas reclutadas.

6.5 La respuesta del Neuropilo Tectal a estímulos visuales

A continuación, analizamos las respuestas visuales en el neuropilo tectal subdividiendo cada neuropilo en una grilla regular de celdas cuadradas y utilizamos los datos de actividad de

cada celda para estimar la proporción de área activa en cada punto temporal registrado, como se describió en la sección 6.3 para las respuestas auditivas.

Las respuestas visuales fueron más intensas en el neuropilo que en la PVL (Figura 44A, comparar con 41A). En promedio, las respuestas visuales activaron simultáneamente el 30% del área del neuropilo (Figura 44B). Este valor es casi el triple del 12% observado para las respuestas auditivas en la misma región (comparar con Figura 39C), y significativamente mayor que la actividad en la condición control (Figura 44C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$).

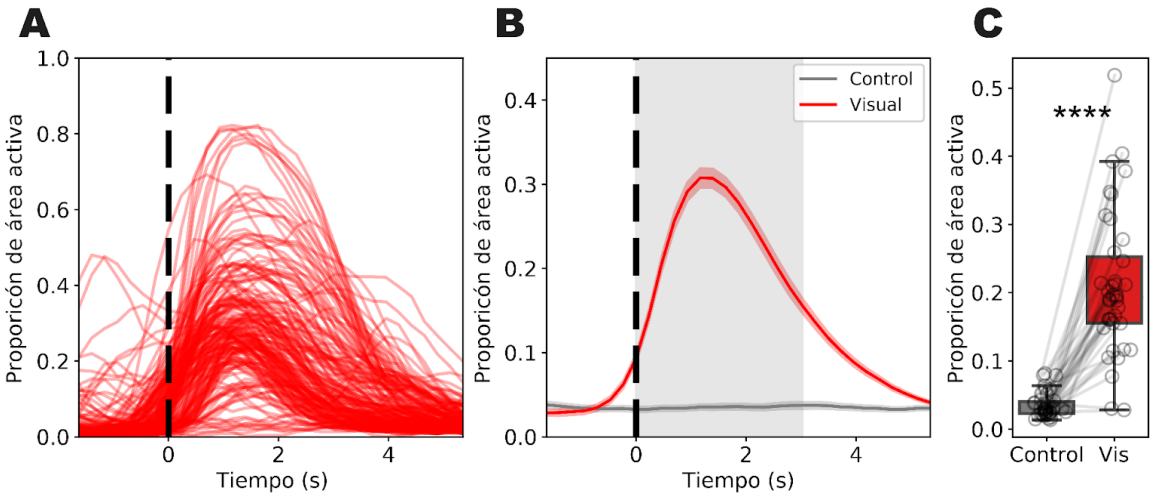


Figura 44. Respuesta poblacional del neuropilo tectal a estímulos visuales (N = 33, n = 165). (A) Proporción de área activa en cada uno de los ensayos visuales registrados. La línea punteada vertical representa el final de la estimulación visual. (B) Proporción media de área activa en función del tiempo, para ensayos control (gris) y visuales (rojo). (C) Diferencia entre la proporción de área activa en ensayos control y ensayos visuales, para cada experimento. ****$p < 0.001$.

La respuesta visual en el neuropilo también fue marcadamente asimétrica, al igual que observamos en la PVL (Figura 45A, comparar con 42A, proveniente del mismo experimento). Cuando comparamos la proporción de área activa entre los hemitectums contralateral e ipsilateral al estímulo visual, encontramos que la respuesta del contralateral fue significativamente mayor en casi todos los casos (Figura 45B, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$). Esto concuerda con los hallazgos descritos para la PVL en la sección 6.4.

Es importante destacar que el área adquirida no fue la misma en ambos hemitectums. Dado que el tamaño de la imagen capturada no fue suficiente para adquirir información del Tectum completo, priorizamos capturar planos del hemitectum contralateral al estímulo visual en su totalidad, ya que este mostró consistentemente respuestas más robustas. Esto tuvo la consecuencia de perder una porción considerable del neuropilo ipsilateral al estímulo visual en la mayoría de los experimentos (ver ejemplo en la Figura 45A). Si bien nuestras comparaciones entre hemitectums están siempre normalizadas por la cantidad de área

capturada, las conclusiones que podemos sacar acerca de la asimetría en la respuesta tectal están limitadas por este aspecto de nuestros registros.

Finalmente, nos preguntamos cómo se organizaría la respuesta visual en el neuropilo. Para responder esto, medimos la distancia de cada celda activada por el estímulo visual al punto más cercano del borde medial del neuropilo y calculamos el promedio de estas distancias para cada experimento. Cuando comparamos la distribución de las distancias medias con la obtenida para una permutación de las celdas activas al azar (como fue descrito en la Figura 40 para las respuestas auditivas), encontramos que la distancia de la actividad visual al borde medial del neuropilo es menor de lo esperado por azar (Figura 45C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p = 0.005$), demostrando nuevamente una organización anatómica de la respuesta tectal a nuestros estímulos.

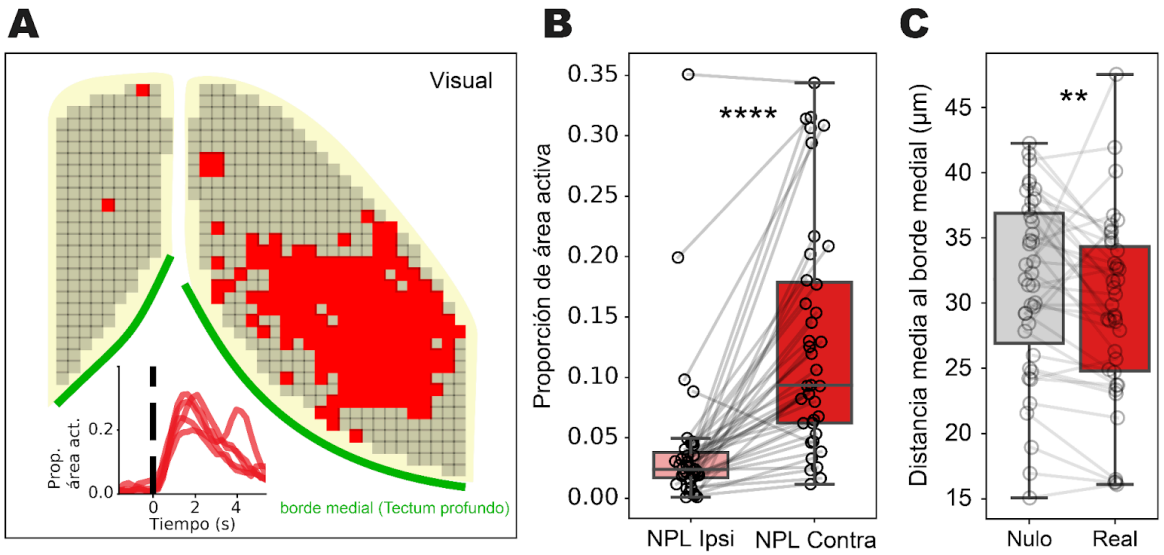


Figura 45. Organización anatómica de la respuesta visual en el neuropilo tectal. (A) Ejemplo representativo de celdas responsivas en el neuropilo, para ensayos visuales. El área amarilla representa esquemáticamente el neuropilo tectal. La curva verde representa el borde medial del neuropilo (correspondiente al neuropilo profundo, borde adyacente a la PVL). El *inset* muestra la proporción de área activa a través del tiempo para los cinco ensayos visuales correspondientes a este experimento. La línea vertical punteada marca el final de la expansión del *looming*. (B) Diferencia entre la proporción de área activa en ensayos visuales en el neuropilo ipsilateral y contralateral al estímulo visual, para cada experimento. (C) Distancia media al borde medial del neuropilo (curva verde en A), para las celdas activas en alguno de los 5 ensayos visuales (rojo) o en permutaciones al azar de las celdas activas para los mismos experimentos (gris). Cada par de puntos representa un experimento. $^{**}p < 0.005$, $^{****}p < 0.001$.

CAPÍTULO 7: CARACTERIZACIÓN DE LA CODIFICACIÓN MULTISENSORIAL EN EL TECTUM DE PECES CEBRA

7.1 Mejora multisensorial poblacional en el Tectum Periventricular

Luego de haber caracterizado las respuestas del Tectum a los estímulos unisensoriales, nos dispusimos a investigar cómo esta estructura responde a la presentación simultánea de ambas modalidades. Nuestra hipótesis principal era que observaríamos un aumento de la respuesta poblacional a estímulos multisensoriales en comparación con la máxima respuesta unisensorial.

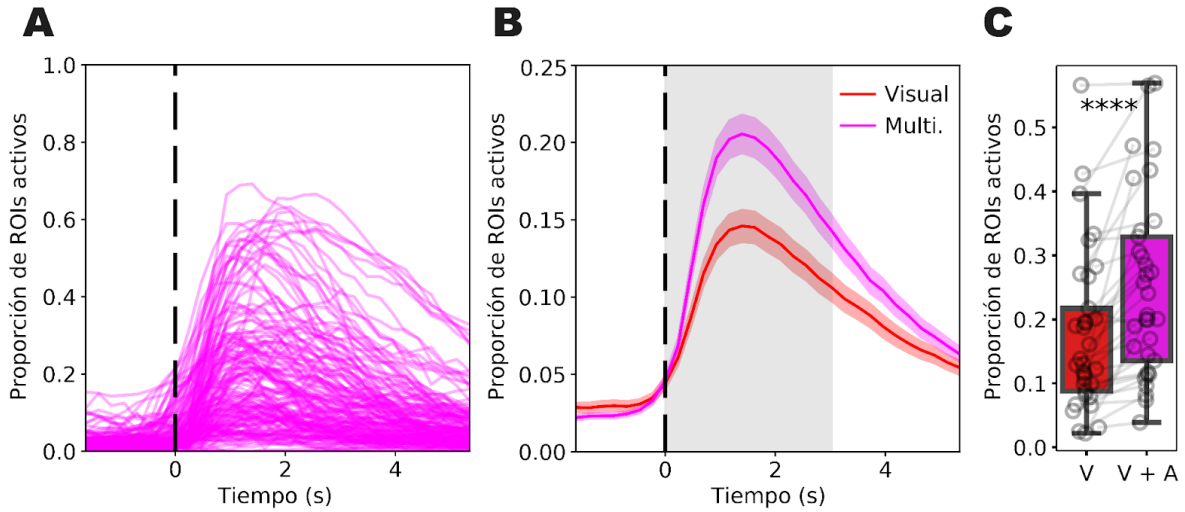


Figura 46. Respuesta poblacional de la PVL a estímulos multisensoriales. (A) Proporción de ROIs activos en cada uno de los ensayos multisensoriales registrados (N = 33, n = 165). La línea punteada vertical representa el final de la estimulación visual y la ocurrencia del estímulo auditivo. (B) Proporción media de ROIs activos en la PVL en función del tiempo, para ensayos visuales (rojo) y multisensoriales (magenta). El área gris representa la ventana temporal de análisis. (C) Diferencia entre la proporción de ROIs activos en ensayos visuales (rojo) y ensayos multisensoriales (magenta), para cada experimento. Cada punto representa la proporción media de ROIs activos para los cinco ensayos de la condición correspondiente en un experimento. Puntos unidos con líneas provienen del mismo experimento. **** $p < 0.001$

La Figura 46A muestra la evolución de la respuesta multisensorial durante la ventana post-estímulo para todos los ensayos analizados. Al cuantificar la proporción de ROIs activos durante la ventana post-estímulo (área gris, Figura 46B), observamos una clara respuesta poblacional al estímulo multisensorial en la PVL. Estas respuestas fueron sincrónicas con el final del estímulo visual y con la ocurrencia del estímulo auditivo, eventos que suceden de manera simultánea (Figura 9A). Al calcular el promedio de estas curvas a través de todos los ensayos y experimentos, encontramos que el pico máximo de activación simultánea en la condición multisensorial fue de un 20%, superior al 15% observado para la condición visual unisensorial (Figura 46B, también comparar ensayos multisensoriales en la Figura 46A con los ensayos visuales en la Figura 41A). Para evaluar la robustez de este efecto, comparamos directamente la proporción de ROIs activos durante la ventana de análisis entre la condición visual y la multisensorial para cada experimento. Este análisis confirmó que la respuesta poblacional multisensorial es significativamente mayor que la visual, y que este efecto es consistente para la gran mayoría de los experimentos analizados (Figura 46C, Prueba de

rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$). Esto demuestra que existe una mejora multisensorial a nivel de la respuesta poblacional en la PVL.

Al observar ejemplos representativos de la organización anatómica de los ROIs activos en respuesta a estímulos multisensoriales, como el mostrado en la Figura 47A, notamos que la asimetría contralateral que caracterizaba a la respuesta visual (Figura 42A y 42C de la sección anterior) parecía ser menos evidente en esta condición. La proporción de ROIs activados por la estimulación multisensorial en el hemitectum contralateral al estímulo visual versus el hemitectum ipsilateral es significativamente mayor (Figura 47B, 33% en promedio, comparado con un 15% en el ipsilateral, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$). Sin embargo, la magnitud de esta diferencia es considerablemente menor que la observada en la condición puramente visual (34% contralateral vs 5% ipsilateral, ver Capítulo 6, Figura 42C). Esta reducción en la asimetría nos llevó a preguntarnos si la mejora multisensorial podría ser distinta en ambos hemisferios, siendo potencialmente mayor en el hemisferio ipsilateral al estímulo visual. Esta pregunta será analizada en detalle en la sección 7.3.

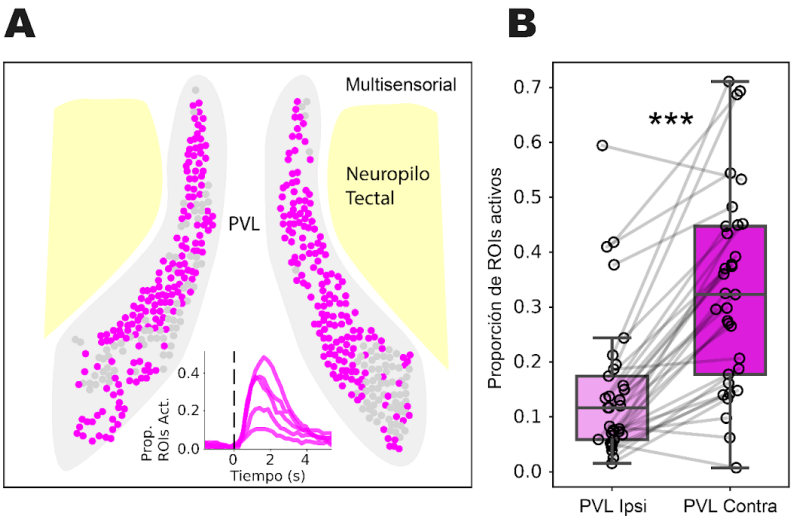


Figura 47. Organización anatómica de la respuesta multisensorial en la PVL. (A) Ejemplo representativo de ROIs responsivos en la PVL para ensayos multisensoriales. El área sombreada gris representa el área bilateral analizada en la PVL, mientras que el área sombreada amarilla representa de manera esquemática el neuropilo tectal (para referencia anatómica ver Figura 5B). El *inset* muestra la proporción de ROIs activos en la PVL de ambos hemitectums para los 5 ensayos multisensoriales luego del tiempo de estimulación (línea punteada vertical). (B) Diferencia entre la proporción de ROIs activos en ensayos multisensoriales en la PVL ipsilateral y contralateral al estímulo visual, para cada experimento.***$p < 0.001$

Finalmente, investigamos si la adición del estímulo auditivo al visual aumentaba la intensidad de las respuestas de los ROIs activados durante la presentación del estímulo multisensorial. Para ello, comparamos el $\Delta F/F$ medio durante la actividad de ROIs individuales en ensayos multisensoriales contra su $\Delta F/F$ medio durante respuestas visuales (Figura 48A), al igual que hicimos en las Figura 38 y 43 (Capítulo 6). Nuevamente, calculamos la diferencia entre la intensidad de las respuestas en estas dos condiciones para cada ROI (Figura 48B) y encontramos un aumento significativo en la intensidad de las respuestas producidas en la

condición multisensorial cuando promediamos estas diferencias por experimento (Figura 48C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.002). Este hallazgo indica que el estímulo auditivo, cuyo efecto sobre la intensidad de la respuesta no era significativo por sí solo (Sección 6.2), sí incrementa el ΔF/F promedio en combinación con un estímulo visual.

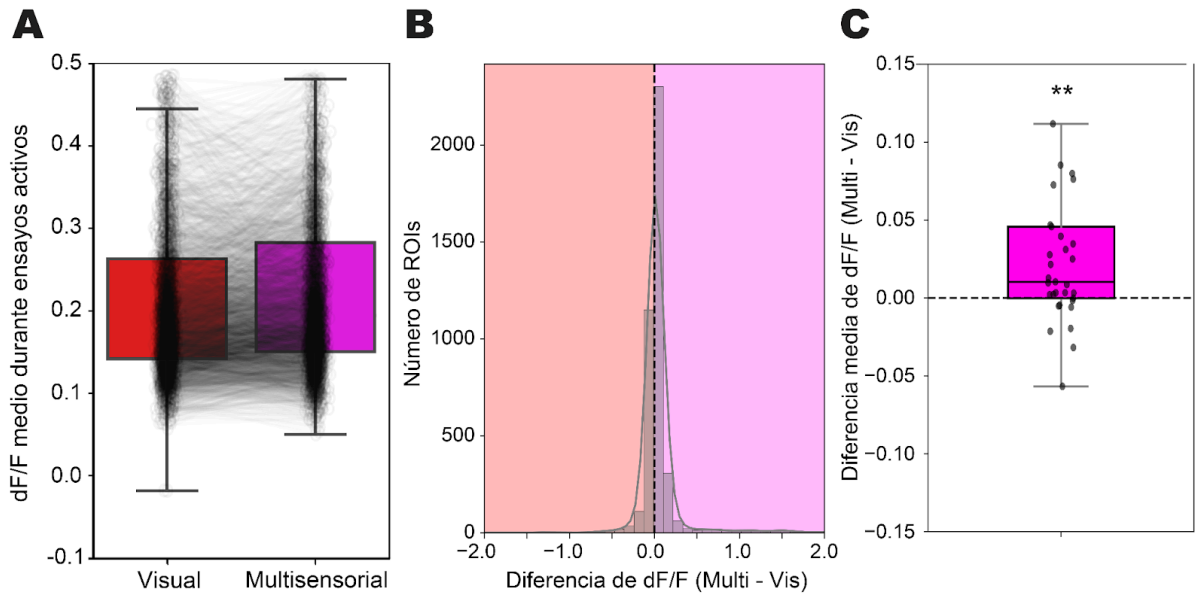


Figura 48. ΔF/F promedio en la PVL durante respuestas visuales y multisensoriales, para ROIs individuales (n = 4228). (A) ΔF/F medio para ROIs activos durante la ventana de análisis en la PVL en función del tiempo, para ensayos visuales (rojo) y multisensoriales (magenta). Puntos unidos con líneas representan ROIs individuales que se activaron al menos una vez en ensayos visuales y en ensayos multisensoriales. Se incluyen ROIs de todos los experimentos analizados. (B) Diferencia entre el ΔF/F medio de ROIs activos durante la ventana de análisis en ensayos visuales y ensayos multisensoriales. La diferencia se calcula por ROI, y se muestra la distribución de estas diferencias para ROIs provenientes de todos los experimentos analizados. El área sombreada roja representa ROIs cuyas respuestas visuales fueron más intensas que sus respuestas multisensoriales, mientras que el área sombreada magenta representa ROIs cuyas respuestas multisensoriales fueron más intensas. (C) Promedio de las diferencias de ΔF/F entre la condición multisensorial y la condición visual, para ROIs activos, para cada experimento. Cada punto representa el promedio de los coeficientes graficados en B para un experimento. Valores positivos representan experimentos en los que los ROIs activos alcanzaron, en promedio, ΔF/F mayores durante ensayos multisensoriales que durante ensayos visuales.**p = 0.002

7.2 Mejora multisensorial poblacional en el Neuropilo Tectal

A continuación, evaluamos la respuesta del neuropilo a la estimulación multisensorial (Figura 49A). Al promediar a través de todos los ensayos y experimentos, observamos que el área activa alcanzó el 40% en la condición multisensorial (Figura 49B, curva magenta), un valor considerablemente mayor que el 30% observado en respuesta al estímulo visual por sí solo (curva roja, comparar ensayos multisensoriales de la Figura 48A con ensayos visuales de la Figura 44A). Esta mejora es significativa y se manifiesta de manera consistente en la mayoría de los experimentos (Figura 49C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p < 0.001).

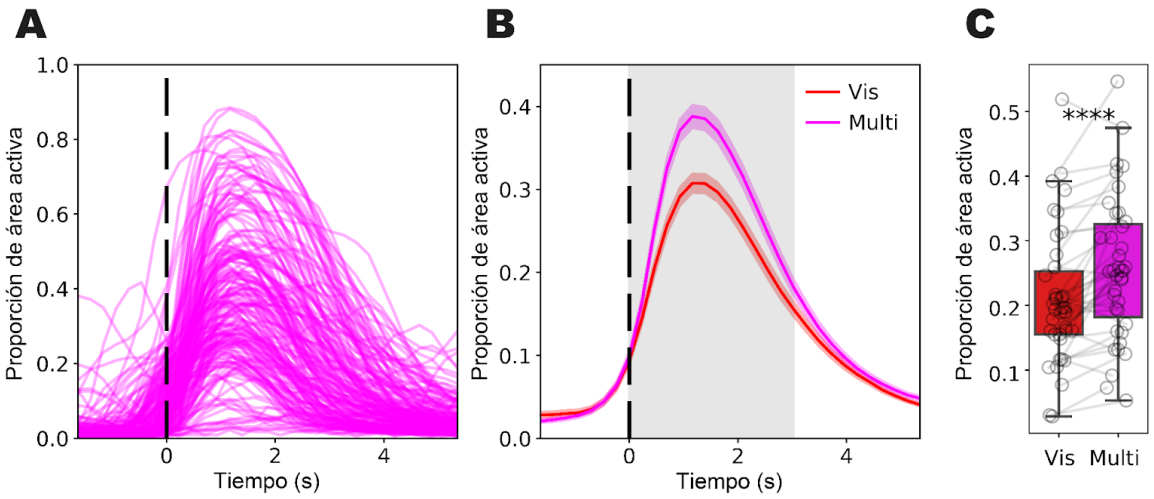


Figura 49. Respuesta poblacional del neuropilo tectal a estímulos multisensoriales. (A) Proporción de área activa en cada uno de los ensayos multisensoriales registrados. La línea punteada vertical representa el final de la estimulación visual y la ocurrencia del estímulo auditivo. (B) Proporción media de área activa en función del tiempo, para ensayos visuales (rojo) y multisensoriales (magenta). (C) Diferencia entre la proporción de área activa en ensayos visuales y multisensoriales, para cada experimento.****$p < 0.001$

Al igual que en la PVL, observamos una disminución de la asimetría bilateral que caracterizaba a la respuesta unisensorial visual en el neuropilo (comparar Figura 50A con Figura 45A). Al comparar las proporciones de área activa en el hemitectum contralateral e ipsilateral al estímulo visual durante la estimulación multisensorial, encontramos que el lado contralateral presentaba respuestas más extendidas (34% en promedio, versus 12% en el ipsilateral; Figura 50B; Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$). Nuevamente, es importante remarcar que nuestras conclusiones se ven limitadas por la asimetría del plano capturado, que cubre al hemisferio ipsilateral al estímulo visual solo parcialmente, si bien normalizamos los valores al área capturada en todos los casos. La magnitud de esta diferencia fue levemente menor que la observada para los estímulos visuales unisensoriales (30% contralateral vs 6% ipsilateral; ver Sección 6.5).

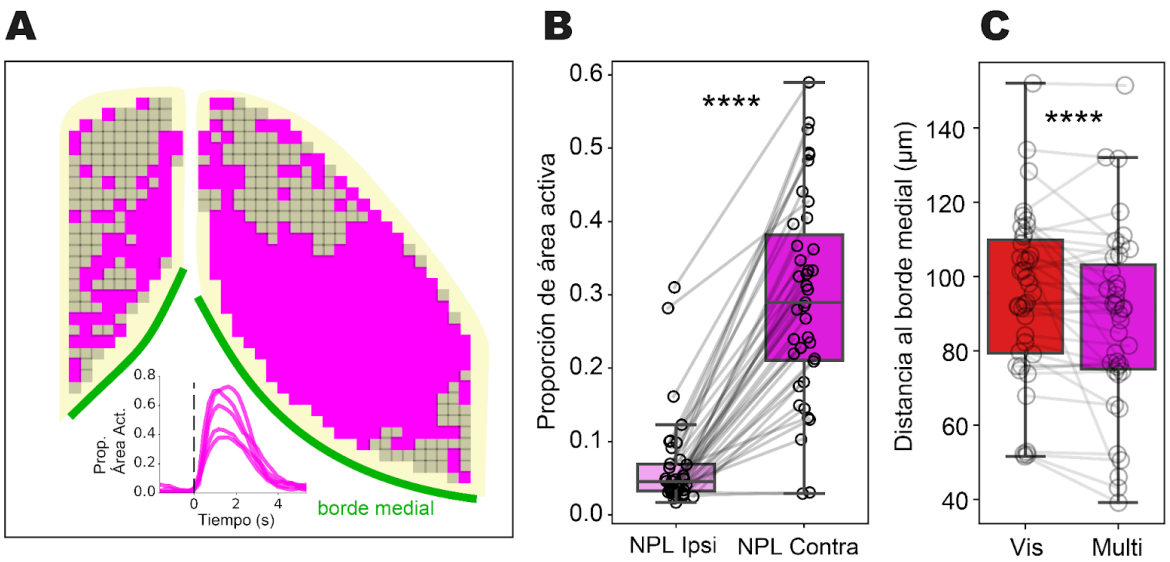


Figura 50. Organización anatómica de la respuesta multisensorial en el neuropilo tectal. (A) Ejemplo representativo de celdas responsivas en el neuropilo, para ensayos multisensoriales. El área amarilla representa esquemáticamente el neuropilo tectal. La curva verde representa el borde medial del neuropilo (correspondiente al neuropilo profundo, borde adyacente a la PVL). El *inset* muestra la proporción de área activa a través del tiempo para los cinco ensayos multisensoriales correspondientes a este experimento. La línea vertical punteada marca el final de la expansión del *looming* y la ocurrencia del estímulo auditivo. (B) Diferencia entre la proporción de área activa en ensayos multisensoriales en el neuropilo ipsilateral y contralateral al estímulo visual, para cada experimento (N = 33). (C) Distancia media al borde medial del neuropilo (curva verde en A), para las celdas activas en alguno de los 5 ensayos visuales (rojo) y multisensoriales (magenta) de cada experimento.****p = 0.001

En el mismo sentido, encontramos que la distancia media de las celdas activas al borde medial del neuropilo (Secciones 6.3 y 6.5) era significativamente menor en la condición multisensorial en comparación con la condición visual (Figura 50C, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.001). Esto sugiere que existe un cambio topográfico del área del neuropilo activada cuando ambos estímulos son presentados a la vez. Específicamente, la respuesta multisensorial tiende a ser más bilateral y a involucrar en mayor medida a las capas profundas del neuropilo, en comparación con la respuesta evocada por el estímulo visual unisensorial.

7.3 Efectividad inversa en el Tectum Periventricular

Como fue introducido en el Capítulo 1, el principio de efectividad inversa constituye uno de los marcadores fundamentales para caracterizar la integración multisensorial (Meredith & Stein, 1983, 1986; Stein et al., 1993; Stein & Stanford, 2008). La efectividad inversa se refiere a que el grado de mejora multisensorial es inversamente proporcional a la saliencia de los estímulos. Para investigar si dicho principio opera en las neuronas tectales, resultó necesario comparar los niveles de integración multisensorial cuando se variaba la saliencia de los componentes unisensoriales.

Con este objetivo, comenzamos aprovechando una característica inherente a nuestro paradigma experimental: el estímulo visual, al ser presentado directamente sobre el ojo derecho del animal, tiene un efecto asimétrico sobre el Tectum. Dado que las proyecciones visuales decusan, y asumiendo que la información es procesada de manera relativamente independiente por ambos hemitectums, podemos considerar a este estímulo visual, a nivel tectal, como dos estímulos distintos: uno de alta saliencia efectiva en el hemisferio contralateral y otro de baja saliencia efectiva en el hemisferio ipsilateral. A su vez, sabemos por nuestros resultados anteriores (Capítulo 6) que el estímulo auditivo impacta de manera simétrica sobre ambos hemitectums. Por lo tanto, esta configuración nos permite estudiar las respuestas multisensoriales en los dos hemitectums por separado, y así explorar si la magnitud de la mejora multisensorial difiere entre ellos en función de la saliencia visual subyacente.

La Figura 51 muestra la proporción media de ROIs activos en la PVL para cada una de los cuatro tipos de ensayo (control, auditivo, visual y multisensorial), analizadas por separado

para el hemitectum ipsilateral (Figura 51A) y contralateral (Figura 51B) al estímulo visual. En primer lugar, es importante notar la marcada diferencia en la respuesta visual entre ambos hemisferios, como ya fue mostrado en el Capítulo 6. En promedio, el estímulo visual (trazo rojo) alcanza a activar simultáneamente un 24% de los ROIs en el hemitectum contralateral, mientras que solo logra activar un 6% en el hemitectum ipsilateral. Esta diferencia no se observa para la respuesta auditiva (8% de los ROIs en ambos casos).

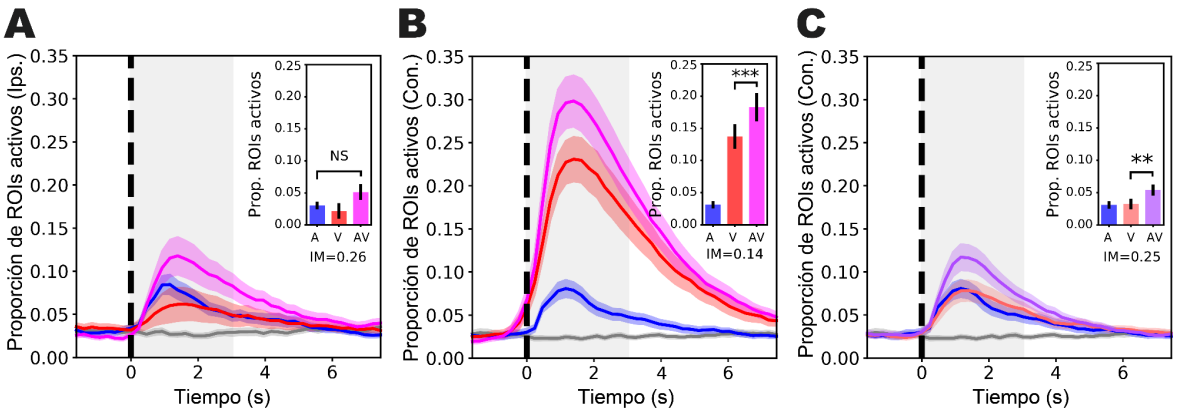


Figura 51. Respuesta de la PVL a estímulos visuales y multisensoriales en el hemitectum ipsilateral y contralateral. (A) Proporción de ROIs activos en función del tiempo para la condición control (gris), auditiva (azul), visual (rojo) y multisensorial (magenta), para ROIs de la PVL ipsilateral. Gráfico de barras (inset) muestra la proporción media alcanzada para cada condición, promediada a través de experimentos. El valor IM indica el coeficiente multisensorial. Se sustrajo de cada barra la proporción media de ROIs activos durante la condición control para no subestimar el IM. (B) Proporción de ROIs activos en función del tiempo para ROIs de la PVL contralateral al estímulo visual, utilizando el componente visual de mayor contraste. (C) Proporción de ROIs activos en función del tiempo para ROIs de la PVL contralateral al estímulo visual, utilizando el componente visual de menor contraste (n = 30).***p < 0.001

Crucialmente, para ambos hemisferios, la respuesta multisensorial es mayor que la máxima respuesta unisensorial correspondiente (la respuesta auditiva en el hemisferio ipsilateral, y la respuesta visual en el contralateral). En el hemitectum contralateral, la respuesta multisensorial alcanza un pico promedio del 30% de ROIs activos, mientras que en el ipsilateral este valor es del 12%. La mejora multisensorial respecto de la respuesta unisensorial más efectiva (comparando proporciones medias durante la ventana de análisis) es significativa para el caso contralateral (Figura 51B, inset, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.001$) pero no para el ipsilateral (Figura 51A, inset, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p = 0.39$). La falta de efecto del lado ipsilateral es posiblemente producto de que, para observar una diferencia estadística entre probabilidades tan pequeñas, se requiere de un tamaño muestral mayor. Sin embargo, para evaluar la efectividad inversa, no debemos analizar el valor absoluto de la respuesta, sino la mejora relativa respecto a la respuesta unisensorial más intensa. Para cuantificar esto, utilizamos el coeficiente de integración (IM, Capítulo 2) que compara la respuesta multisensorial con la respuesta máxima unisensorial (en este caso midiendo respuestas como proporción media de ROIs activos durante la ventana de análisis). Este valor fue de 0.26 en el hemisferio ipsilateral (inset Figura 51A) y de 0.14 en el hemisferio contralateral (inset Figura 51B). Es decir, ambos hemitectums mostraron mejoras multisensoriales ($IM > 0$), pero el hemitectum que respondió a un estímulo de menor

saliencia (o menos efectivo para evocar una respuesta) mostró una mejora multisensorial mayor, tal como se esperaría de cumplirse el principio de efectividad inversa.

Para confirmar este efecto, en un subset de los experimentos analizados (N = 30) presentamos un segundo estímulo visual de menor saliencia (CM = 0.29), sólo o en combinación con el mismo estímulo auditivo utilizado previamente. Como en los experimentos principales, presentamos 5 repeticiones de cada una de estas condiciones, además de las cuatro condiciones analizadas previamente.

La Figura 51C presenta las curvas de la proporción de ROIs activos para las condiciones control, auditiva, visual de bajo contraste y multisensorial de bajo contraste. En este caso, solo consideramos el hemisferio contralateral, ya que este estímulo de bajo contraste no produjo una respuesta por encima de la actividad basal en el hemitectum ipsilateral. La respuesta visual unisensorial en la PVL contralateral alcanzó, en promedio, un 8% de ROIs activos simultáneamente, mientras que la respuesta multisensorial correspondiente (bajo contraste visual + auditivo) alcanzó un 12%. Esto representa una mejora multisensorial respecto al estímulo unisensorial más efectivo (IM = 0.25, inset Figura 51C), significativa (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p = 0.004$) y superior a la calculada para el hemitectum contralateral utilizando el estímulo visual de mayor saliencia (IM = 0.14).

Es importante señalar que la percepción de la peligrosidad de un mismo estímulo no necesariamente es constante entre distintos animales. Al contrario, la saliencia efectiva de un mismo estímulo varía de animal en animal, y esta variabilidad intrínseca puede afectar la magnitud de la mejora multisensorial observada. Esta variabilidad nos ofrece otra manera de poner a prueba la hipótesis de la efectividad inversa: si el principio se cumple, esperaríamos que aquellos animales que mostraron respuestas unisensoriales más débiles en el Tectum (independientemente del valor de contraste del estímulo) exhiban, a su vez, una mayor mejora multisensorial relativa.

Para evaluar esta hipótesis, en la Figura 52 graficamos la magnitud de la respuesta unisensorial máxima en cada experimento (medida como la proporción de ROIs activos en la PVL contralateral) contra el coeficiente de integración (IM) calculado para la condición multisensorial correspondiente. Hicimos este análisis para las dos combinaciones multisensoriales estudiadas: la de alta saliencia visual (magenta) y la de baja saliencia visual (lila). Puede observarse que, en un cierto rango, el estímulo de bajo contraste y de alto contraste evocaron respuestas unisensoriales de la misma magnitud, ilustrando que efectivamente estímulos que “por diseño” tienen diferentes contrastes, son percibidos como de igual saliencia.

Existe una relación inversa entre la respuesta unisensorial evocada y el IM: cuanto menor es el efecto unisensorial máximo registrado en un experimento, mayor tiende a ser la mejora multisensorial relativa que exhibe. Esta anti-correlación resultó significativa para ambas condiciones de estimulación multisensorial analizadas (Modelos Lineales; AV Max.: coef. = -1.06, $p = 0.006$; AV Min.: coef. = -5.92, $p = 0.003$). Estos resultados confirman que la

integración multisensorial en la PVL del Tectum de peces cebra sigue el principio de efectividad inversa. Es interesante notar además que, en algunos pocos casos donde la respuesta unisensorial fue muy baja, se observaron IM negativos, es decir que, en esos experimentos, el estímulo multisensorial evocó, en promedio, una respuesta menor que la unisensorial y una integración inhibitoria.

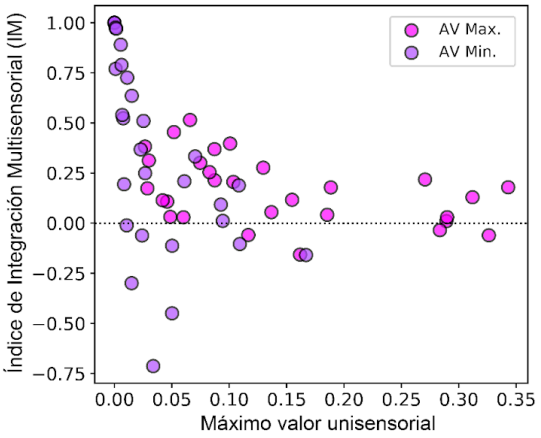


Figura 52. Efectividad inversa en la PVL. IM en función de la máxima proporción media de ROIs activos en la PVL contralateral, para los estímulos unisensoriales correspondientes al estímulo multisensorial. Cada punto representa el valor de IM calculado para un experimento en particular, para una condición multisensorial en particular (multisensorial de mayor contraste en magenta, el de menor contraste en lila).

7.4 Efectividad inversa en el Neuropilo Tectal

Para corroborar que este efecto fuera también detectable en el neuropilo repetimos el conjunto de análisis discutidos en la sección anterior, pero esta vez cuantificando la proporción de área activa en el neuropilo tectal. Nuevamente, comenzamos comparando las respuestas entre los hemitectums contralateral e ipsilateral al estímulo visual, examinando la proporción de área activa para cada una de las cuatro condiciones de estimulación principales (Figura 53A, B). Tal como observamos previamente, la respuesta unisensorial visual tuvo un efecto mucho más pronunciado en el neuropilo contralateral, con un 49% del área activada en promedio de manera simultánea, mientras que este valor alcanzó el 10% en el hemitectum ipsilateral. La respuesta multisensorial también reflejó esta asimetría: en promedio, un 56% del área se activó simultáneamente en el hemitectum contralateral en comparación con el 21% del hemitectum ipsilateral. Esta mejora multisensorial observada por sobre el máximo unisensorial resultó significativa en ambos casos (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon; Contralateral: $p < 0.001$; Ipsilateral: $p < 0.001$). Sin embargo, al calcular el IM en cada caso, encontramos que la mejora fue mucho más grande en el hemitectum ipsilateral (IM = 0.41, inset Figura 53A) que en el contralateral (IM = 0.08, inset Figura 53B). Es decir, al igual que en la PVL, la mejora multisensorial relativa en el neuropilo fue considerablemente mayor en el hemitectum en el que la saliencia del componente visual era menor.

Para confirmar este hallazgo mediante una manipulación directa de la saliencia, comparamos la respuesta multisensorial en el hemisferio contralateral utilizando el estímulo visual de bajo

contraste con la obtenida usando el de alto contraste. El estímulo visual de bajo contraste activó un 19% del área del neuropilo contralateral de manera simultánea (Figura 53C, curva rojo claro). Al combinarlo con el estímulo auditivo, la respuesta multisensorial resultante alcanzó el 29% del área activa (curva lila). En este caso, la mejora multisensorial también fue significativa (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.001) y el IM fue de 0., un valor considerablemente superior al IM obtenido en el mismo hemitectum con el estímulo multisensorial de mayor contraste (IM = 0.22). Nuevamente, una menor saliencia visual conduce a una mayor mejora multisensorial relativa.

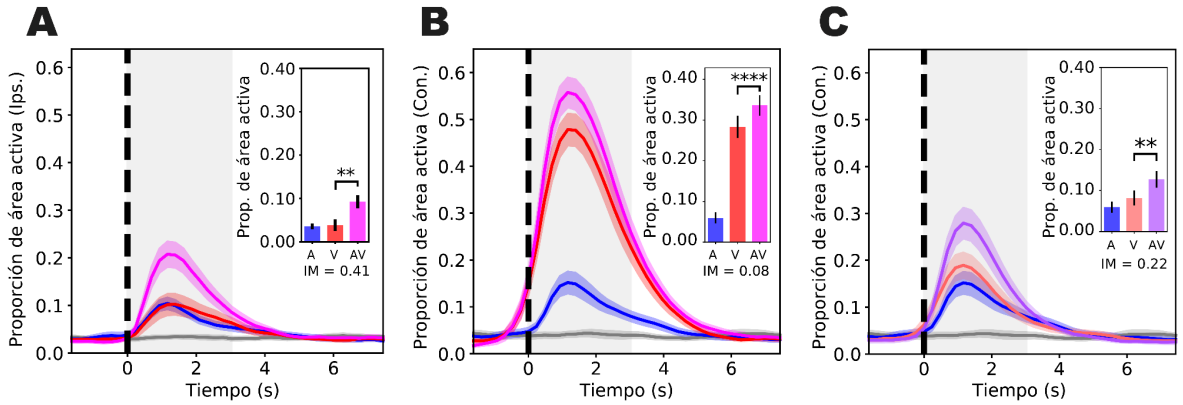


Figura 53. Respuesta del neuropilo tectal a estímulos visuales y multisensoriales de distinta saliencia. (A) Proporción de área activa en función del tiempo para cada una de las cuatro condiciones de estimulación (control, gris; auditivo, azul; visual, rojo; multisensorial, magenta), para el neuropilo ipsilateral al estímulo visual, utilizando el componente visual de mayor contraste. Gráfico de barras (inset) muestra la proporción máxima alcanzada para cada condición, promediada a través de experimentos. El valor IM indica el coeficiente multisensorial. (B) Proporción de área activa en función del tiempo para el neuropilo contralateral al estímulo visual, utilizando el componente visual de mayor contraste. (C) Proporción de área activa en función del tiempo para el neuropilo contralateral al estímulo visual, utilizando el componente visual de menor contraste (n = 30).****p < 0.001

Finalmente, volvimos a analizar la relación entre la variabilidad individual en la respuesta unisensorial y la magnitud de la mejora multisensorial en el neuropilo. Graficamos, para cada animal, la efectividad máxima unisensorial observada en el neuropilo contralateral (proporción de área activa) contra el IM calculado para la condición multisensorial correspondiente (Figura 54), tanto para la combinación de alta saliencia visual como para la de baja saliencia. Al igual que en la PVL, encontramos una relación inversa entre la efectividad unisensorial y la mejora multisensorial para ambas condiciones: animales con respuestas unisensoriales más débiles tendieron a mostrar mayores IMs. Esta relación inversa resultó significativa para ambas condiciones de estimulación analizadas (Modelos Lineales; AV Max.: coef. = -0.79, p < 0.001; AV Min.: coef. = -2.38, p = 0.008). Asimismo, la estimulación multisensorial que incluye el componente visual de menor contraste mostró respuestas unisensoriales menos extensas e IMs más altos (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.019). Estos resultados demuestran que el neuropilo tectal, al igual que la PVL, exhibe claramente las propiedades asociadas con el principio de efectividad inversa.

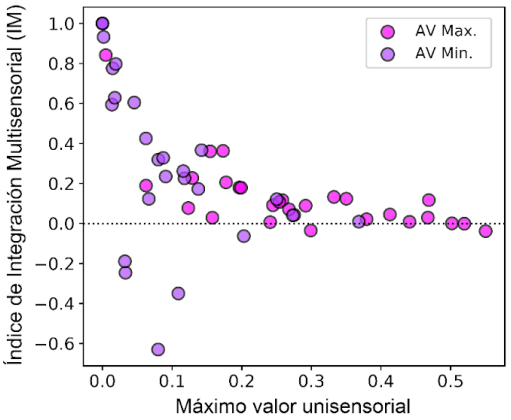


Figura 54. Efectividad inversa en el neuropilo tectal. IM en función de la máxima proporción media de área activa en el neuropilo contralateral, para los estímulos unisensoriales correspondientes al estímulo multisensorial. Cada punto representa el valor de IM calculado para un experimento en particular, para una condición multisensorial en particular (multisensorial de mayor contraste en magenta, el de menor contraste en violeta).

7.5 Mejora multisensorial en neuronas con inputs audiovisuales

Hasta ahora, hemos demostrado que el Tectum de peces cebra, tanto en su capa periventricular (PVL) como en el neuropilo, procesa información visual y auditiva. Además, encontramos que la estimulación multisensorial produce respuestas poblacionales que son más extensas, reclutan un mayor número de unidades, y que esta mejora en la respuesta poblacional es proporcionalmente más importante cuanto menor la saliencia de los estímulos. Sin embargo, todos estos hallazgos a nivel poblacional son, en principio, compatibles con un escenario en el que no exista integración multisensorial a nivel de neuronas individuales dentro del Tectum. Podría postularse, por ejemplo, la existencia de dos poblaciones tectales funcionalmente segregadas: una que recibe exclusivamente información visual y otra que recibe exclusivamente información auditiva. Si esta fuera la estructura del Tectum, la presentación simultánea de ambos estímulos reclutaría un mayor número total de neuronas que el máximo observado en condiciones unisensoriales (simplemente por la suma de la activación de ambas poblaciones), pero ninguna neurona estaría recibiendo e integrando ambas señales. Este tipo de integración podría ser relevante desde el punto de vista funcional, por ejemplo, si el Tectum enviara señales a áreas cerebrales cuya respuesta dependiera del número total de neuronas activadas río arriba. No obstante, resulta de interés determinar si existen neuronas individuales dentro del Tectum que están efectuando una verdadera integración multisensorial, recibiendo y combinando información de ambas modalidades.

Un indicio de que esto es así fue encontrado en la Figura 48, donde observamos un aumento en la intensidad de la respuesta de neuronas individuales frente a estimulación multisensorial, en comparación a su actividad frente a estimulación visual. Para explorar esto más en detalle, nos centramos en los datos obtenidos de la PVL, donde podemos identificar la actividad de neuronas individuales. Analizamos únicamente la actividad de ROIs ubicados en el hemisferio contralateral al estímulo visual, ya que en este hemisferio ambos estímulos (visual

y auditivo) evocan respuestas robustas, lo cual es importante para la identificación de neuronas sensibles a ambas modalidades. En particular, categorizamos cada ROI analizado basándonos en su patrón de respuesta a las distintas condiciones de estimulación:

- **ROIs exclusivamente auditivos:** Aquellos que respondieron al menos una vez durante los ensayos unisensoriales auditivos, pero nunca respondieron durante los ensayos unisensoriales visuales.
- **ROIs exclusivamente visuales:** Aquellos que respondieron al menos una vez durante los ensayos unisensoriales visuales, pero nunca respondieron durante los ensayos unisensoriales auditivos.
- **ROIs audiovisuales:** Aquellos que respondieron al menos una vez en ensayos unisensoriales visuales y al menos una vez en unisensoriales auditivos.
- **ROIs exclusivamente multisensoriales:** Aquellos que no respondieron en ningún ensayo unisensorial (ni visual ni auditivo), pero sí respondieron al menos una vez durante los ensayos multisensoriales.
- **ROIs inactivos:** Aquellos que nunca superaron el umbral de actividad en respuesta a ninguno de los estímulos presentados (visual, auditivo o multisensorial).

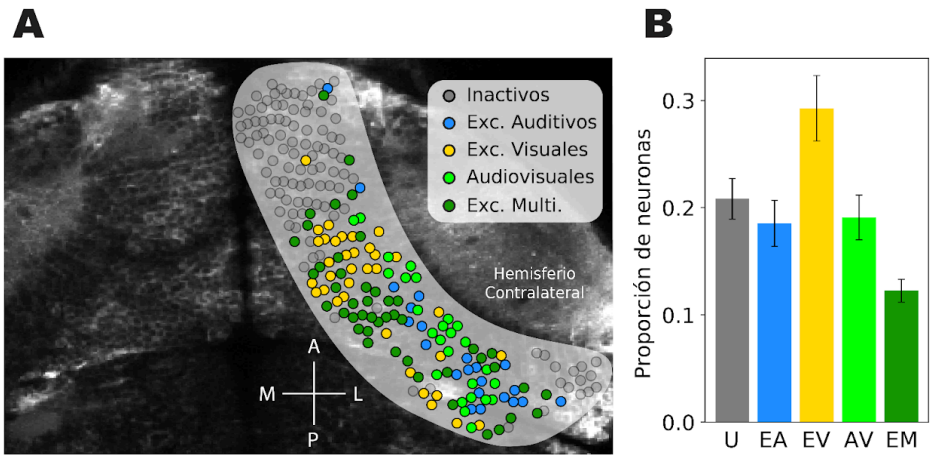


Figura 55. Clasificación de neuronas según su patrón individual de respuesta. (A) Ejemplo de la distribución anatómica de ROIs activos clasificados según su patrón de respuesta. (B) Proporción de ROIs clasificados en cada patrón de respuesta a través de todos los experimentos (I: Inactivos; EA: Exclusivamente Auditivos; EV: Exclusivamente Visuales; AV: Audiovisuales; EM: Exclusivamente Multisensoriales) (n = 33).

La Figura 55A ilustra la distribución espacial de estas diferentes clases de ROIs en un ejemplo representativo. La existencia de ROIs que responden consistentemente a ambas modalidades unisensoriales (verde claro, AV) sugiere fuertemente que estas neuronas están, de hecho, recibiendo aferencias tanto visuales como auditivas. Por lo tanto, los ROIs audiovisuales son candidatos a realizar integración multisensorial a nivel celular. Encontramos que, en promedio, un 19% de los ROIs analizados en el hemisferio contralateral fueron clasificados como audiovisuales (Figura 55B, AV). Para determinar si las neuronas AV exhiben integración multisensorial, examinamos la consistencia de su respuesta para las cuatro condiciones de estimulación. Como se describió en la Sección 5.5, la consistencia de una neurona fue computada como el número de ensayos en el que un ROI específico superó

el umbral de activación, es decir que puede variar entre 0 y 5. La Figura 56A muestra la consistencia de todos los ROIs individuales clasificados como AV (es decir, que su consistencia es al menos 1 tanto para el estímulo auditivo como para el visual), para todos los experimentos, en los cuatro tipos de ensayo (control, auditivo, visual y multisensorial). En general, la consistencia de los ROIs AV en la condición auditiva parece ser mayor que en el control, la consistencia visual mayor que la auditiva, y la multisensorial mayor que la visual. Este mismo patrón es evidente al analizar la proporción media de ROIs audiovisuales activados en respuesta a cada estímulo (Figura 56B). Crucialmente, la proporción de estos ROIs activos durante la estimulación multisensorial (máximo de 34% en simultáneo, en promedio) fue significativamente mayor que la proporción activa durante la estimulación visual unisensorial (29%, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p < 0.012$). Este hallazgo es importante, ya que evidencia una mejora multisensorial dentro de una población de neuronas que recibe información de ambas modalidades sensoriales.

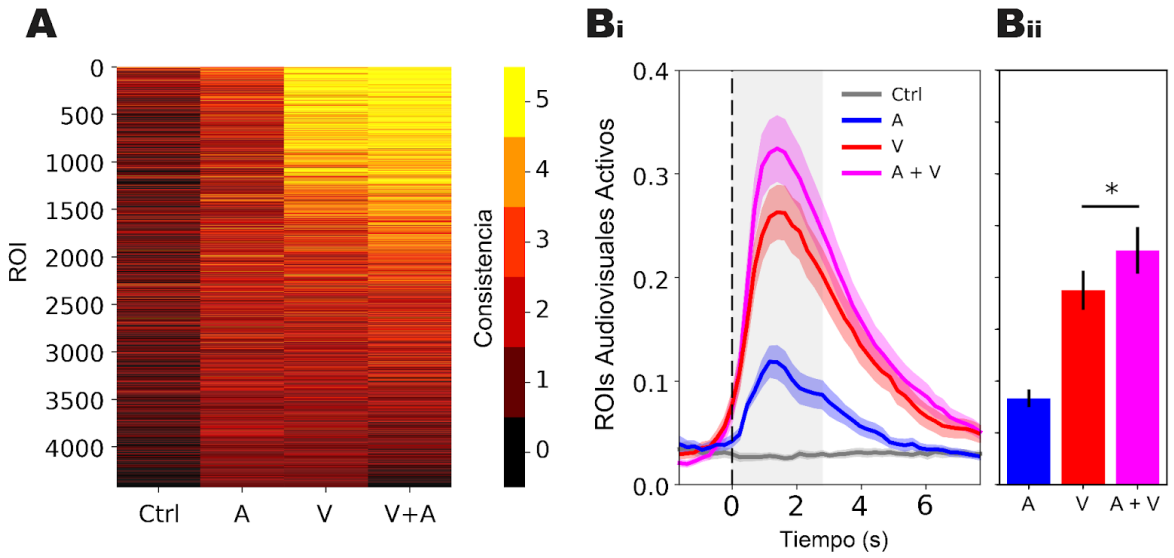


Figura 56. Respuesta de las neuronas audiovisuales en la PVL contralateral. (A) Consistencia de los ROIs clasificados como audiovisuales, para todos los experimentos analizados, para cada condición de estimulación (n = 4427). (B_i) Proporción de ROIs audiovisuales activos para cada una de las cuatro condiciones de estimulación, en promedio para todos los experimentos analizados activos en función del tiempo. Área sombreada indica ventana de análisis. (B_{ii}) Proporción media de ROIs audiovisuales activos, en promedio para todos los experimentos analizados.*p<0.012

Nuestro análisis también reveló la existencia de una proporción de ROIs exclusivamente multisensoriales, que no respondieron durante ensayos unisensoriales, pero sí en la condición multisensorial. Estos constituyeron, en promedio, un 12% de los ROIs analizados en el hemisferio contralateral de todos los animales (Figura 55B, EM). Debido a que los ROIs EM no respondieron nunca a la estimulación visual o auditiva unisensorial, comparamos la proporción de ROIs activos durante la estimulación multisensorial con la proporción de ROIs activos en forma espontánea. La consistencia de estos ROIs al estímulo multisensorial tiende a ser mayor que su consistencia espontánea (Figura 57A) y la proporción de los ROIs que respondieron durante la ventana de análisis es significativamente mayor a la respuesta en la condición control (Figura 57B, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, p = 0.001),

corroborando que las respuestas observadas en esta población no son simplemente producto del azar o fluctuaciones espontáneas. En cambio, deben ser verdaderas respuestas neuronales evocadas específicamente por la combinación de estímulos visuales y auditivos.

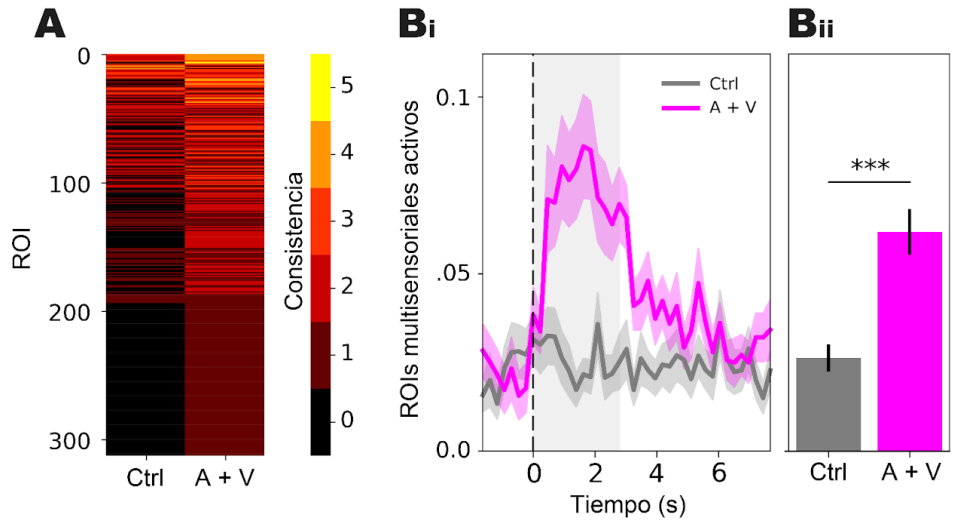


Figura 57. Respuesta de las neuronas exclusivamente multisensoriales (EM) en la PVL contralateral. (A) Consistencia de cada uno de los ROIs clasificados como EM, para todos los experimentos analizados, para cada una de las cuatro condiciones de estimulación (n = 313). (B) Proporción de ROIs EM activos para la condición control y la condición multisensorial, en promedio para todos los experimentos analizados. (B_i) Proporción de ROIs EM activos en función del tiempo. Área sombreada indica ventana de análisis. (B_{ii}) Proporción media de ROIs EM activos, en promedio para todos los experimentos analizados.***p<0.001

7.6 Variabilidad en la representación multisensorial

Finalmente, nos propusimos investigar si la dinámica de la activación en el Tectum dependía de la modalidad del estímulo utilizado. Para abordar esta pregunta, tomamos los datos de ΔF/F de todos los ROIs de la PVL (hemitectum contralateral) durante una ventana temporal de 1.8 segundos inmediatamente posterior a la presentación del estímulo (o al final del *looming* en el caso visual). Estos datos estaban compuestos por el ΔF/F calculado para cada ROI en el plano registrado, en cada fotograma de la ventana temporal analizada, para todos los ensayos de todas las condiciones de estimulación. De esta manera, cada estado de actividad tectal puede pensarse como un punto en un espacio de N dimensiones, en donde N es la cantidad de ROIs analizados para un dado experimento. Este vector de alta dimensión se mueve en este espacio a medida que pasa el tiempo y la representación tectal cambia. Para poder estudiar este proceso, realizamos un análisis de componentes principales (PCA) que nos permitió reducir, para cada fotograma adquirido dentro de esta ventana de registro, estos puntos de alta dimensión a un espacio de dos dimensiones (los dos primeros componentes principales arrojados por este método). De esta manera, el patrón global de activación de la PVL en cada momento del tiempo puede ser representado como un punto en 2D, y la evolución de la respuesta tectal durante un ensayo puede visualizarse como una trayectoria a través de este espacio.

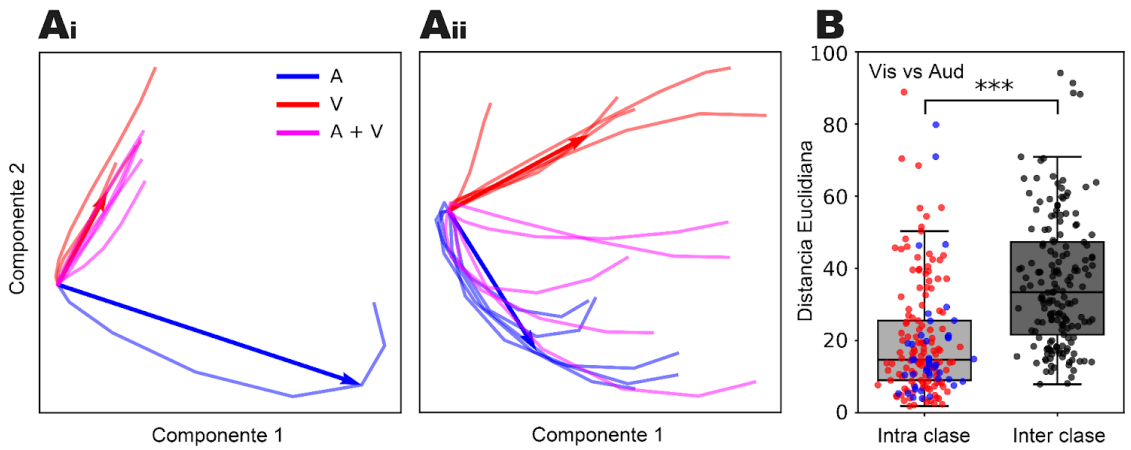


Figura 58. Cambios en la representación tectal de estímulos visuales, auditivos y multisensoriales, representados como trayectorias en un espacio de 2 dimensiones. (A_{i-ii}) Ejemplos de trayectorias correspondientes a la ventana de análisis de cada uno de los ensayos de dos experimentos representativos. Los vectores rojo y azul representan la dirección mediana del sexto punto de las trayectorias visuales y auditivas graficadas, respectivamente. Las trayectorias representan los 8 fotogramas posteriores al tiempo de estimulación. (B) Distribuciones de distancias euclidianas entre trayectorias de una misma clase unisensorial (intra clase, visuales en rojo, auditivas en azul) y entre trayectorias de distintas clases (distancias entre pares de trayectorias visual y auditiva, inter clase, en negro), para todos los experimentos analizados. ***p<0.001.

La Figura 58A muestra dos ejemplos de trayectorias obtenidas mediante este análisis. Cada trazo muestra cómo cambia la representación neuronal global en la PVL a lo largo del tiempo. Las trayectorias rojas corresponden a ensayos visuales, las azules a ensayos auditivos y las magenta a ensayos multisensoriales. Sólo se analizaron ensayos en los que la proporción de ROIs activos durante la ventana de análisis superó el percentil 95 de la proporción de ROIs activos durante ensayos control (n = 285, un 58% de los ensayos). Por lo tanto, en la Figura $58A_i$ se observa que, de los 5 ensayos auditivos, sólo en uno se registró una respuesta significativa (de la cual se muestra la trayectoria asociada) mientras que en los ensayos visuales hubo respuestas en 3 casos y para la condición multisensorial hubo respuesta en 4 de los 5 ensayos. En el ejemplo de la Figura $58A_{ii}$ se registraron respuestas en todos los ensayos auditivos, visuales y multisensoriales. Los vectores rojo y azul indican las direcciones medias de las trayectorias visuales y auditivas unisensoriales en este espacio reducido. Observando estos ejemplos, encontramos que las trayectorias correspondientes a las respuestas unisensoriales visuales y auditivas ocupan regiones distintas, lo que sugiere que los patrones de activación neuronal evocados por ambas modalidades son distintos. Por otro lado, las trayectorias multisensoriales (magenta) suelen alinearse con uno de los dos vectores unisensoriales (indicando respuestas poblacionales similares a las visuales o a las auditivas), aunque en algunos casos se ubican en posiciones intermedias entre ambas direcciones.

Tomar direcciones representativas de las trayectorias puede ser cualitativamente informativo, pero implica perder información acerca de la dinámica completa de la actividad tectal en este espacio de 2 dimensiones. Para cuantificar estas observaciones teniendo en cuenta esta dinámica consideramos a cada trayectoria completa como un único punto en un espacio de mayor dimensionalidad. Específicamente, 2 x T dimensiones, donde T es el número de

fotogramas analizados post-estímulo (T = 8 fotogramas) y las dimensiones corresponden a las coordenadas *(x, y)* de cada punto de la trayectoria en el espacio reducido. Esto nos permitió cuantificar la similitud o diferencia entre trayectorias distintas computando la distancia euclidiana entre ellas en este nuevo espacio de 16 dimensiones (2 x T). En particular, para cada experimento, calculamos la distancia euclidiana promedio entre todos los pares de trayectorias visuales (distancia intra visual), la distancia promedio entre todos los pares de trayectorias auditivas (distancia intra auditiva), clasificando ambas como distancias intra clase, y la distancia promedio entre todas los pares posibles conformados por una trayectoria visual y una auditiva (distancia inter clase, negro, Figura 58B). Esto nos permitió preguntarnos si la diferencia entre representaciones de distintas modalidades era mayor que la diferencia promedio dentro de una misma modalidad. Efectivamente, la distancia euclidiana media entre trayectorias de distinta modalidad (Figura 58B, negro) fue significativamente mayor que la distancia media entre trayectorias de la misma modalidad unisensorial (Figura 58B, rojo y azul) (Prueba U de Mann-Whitney: $p < 0.001$). Esto corrobora que nuestros estímulos visuales y auditivos evocan patrones de actividad poblacional distintos en la PVL.

Para explorar la relación entre estas dos representaciones unisensoriales y las respuestas multisensoriales, medimos el ángulo de cada trayectoria multisensorial individual (aproximada como la dirección del sexto punto temporal de cada trayectoria) con los dos vectores representativos de las direcciones unisensoriales en cada experimento (vectores rojo y azul en la Figura 58A_i y 58A_{ii}). Si ambos ángulos son similares para una trayectoria esta se encuentra aproximadamente en una dirección equidistante a ambas representaciones unisensoriales, mientras que una gran diferencia en estos valores muestra una alineación preferencial con una de las dos modalidades.

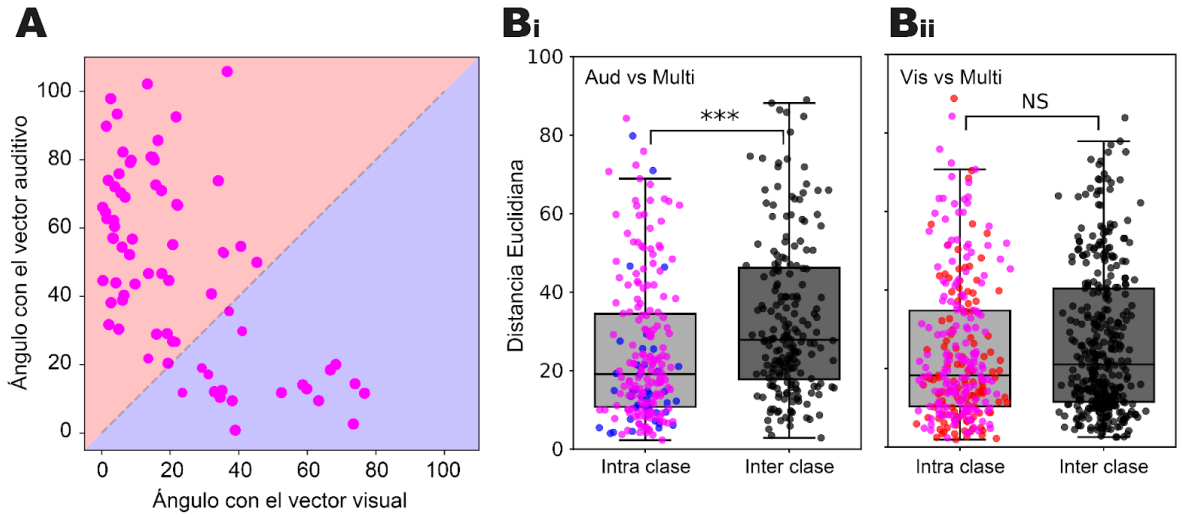


Figura 59. Alineación de trayectorias multisensoriales con direcciones unisensoriales. (A) Ángulo de cada trayectoria multisensorial con los vectores medianos visual (eje x) y auditivo (eje y) de su mismo experimento. Cada punto representa un ensayo multisensorial, para todos los experimentos analizados (n = 76, N = 17). (B) Distribuciones de distancias euclidianas entre trayectorias de una misma clase y entre clases, donde cada clase es una condición de estimulación de interés. (B_i) Comparación entre distancias euclidianas intra-auditivas (azules) e intra-multisensoriales (magentas), intra clase en general, contra distancias euclidianas entre trayectorias auditivas y multisensoriales (inter clase, negro), para todos los experimentos analizados. (B_{ii})

Comparación entre distancias euclidianas intra-visuales (rojas) e intra-multisensoriales (magentas), intra clase en general, contra distancias euclidianas entre trayectorias visuales y multisensoriales (inter clase, negro), para todos los experimentos analizados.***p<0.001

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 59A. Efectivamente, las respuestas multisensoriales suelen alinearse con una de las dos representaciones unisensoriales (es decir, tienen un ángulo pequeño respecto a uno de los vectores y grande respecto al otro). La distribución de estas respuestas entre ambas representaciones no es homogénea, sino que existe un sesgo evidente hacia una similitud con las respuestas visuales (73% de los casos, comparada con 27% para auditivos).

Nuevamente, decidimos cuantificar estas observaciones calculando distancias euclidianas entre trayectorias para considerar la dinámica temporal de la actividad tectal, y no solo una dirección representativa de cada respuesta. En particular, calculamos la distancia euclidiana promedio entre pares de trayectorias multisensoriales (intra multisensorial, Figura $59B_i$ y $59B_{ii}$, magenta), así como también las intra auditivas e intra visuales, mencionadas previamente. A su vez, calculamos las distancias entre trayectorias multisensoriales y auditivas (Figura $59B_i$, inter clase, negro) y entre trayectorias multisensoriales y visuales (Figura $59B_{ii}$, inter clase, negro). Esto nos permitió preguntarnos si las respuestas multisensoriales son distintas a cada una de las representaciones unisensoriales. Encontramos que la representación multisensorial en el Tectum es significativamente distinta a la auditiva (Figura $59B_i$, Prueba U de Mann-Whitney: $p < 0.001$) pero no es significativamente distinta a la visual (Figura $59B_{ii}$, Prueba U de Mann-Whitney: $p = 0.12$). Esto apoya la observación que surge de la Figura 59A, sugiriendo que la representación de nuestros estímulos audiovisuales en el Tectum se parece más al estímulo visual que al auditivo.

Estos resultados demuestran que el Tectum representa estímulos auditivos y visuales mediante patrones de actividad poblacional distintos. Además, sugieren que, en la mayoría de los casos, la respuesta a una combinación multisensorial no genera una representación neuronal completamente nueva, sino que tiende a tomar la forma de una de las representaciones unisensoriales preexistentes, con una fuerte preferencia hacia la modalidad visual.

CAPÍTULO 8: NEURONAS ASOCIADAS AL MOVIMIENTO EN EL ROMBENCÉFALO

8.1 Asociación entre integración tectal y actividad en el Rombencéfalo

El Tectum integra información visual y auditiva (Capítulo 6), y exhibe mejoras multisensoriales significativas ante la combinación de ambas señales (Capítulos 6 y 7). Además, el Tectum presenta proyecciones hacia regiones premotoras localizadas en el Rombencéfalo, tanto en peces cebra como en otras especies (Baier & Scott, 2024; Del Bene et al., 2010; Helmbrecht et al., 2018; Kardamakis et al., 2016; Luksch, 2009; Marquez-Legorreta et al., 2020; Scott, 2009). Por lo tanto, resulta de interés investigar si las mejoras multisensoriales observadas a nivel tectal están asociadas a algún cambio en la actividad de poblaciones neuronales pre-motoras.

Para estudiar esto, recurrimos a la identificación de Neuronas Asociadas al Movimiento (NAM) en el Rombencéfalo, definidas como fue descrito en el Capítulo 5. Estos son ROIs cuya actividad muestra una alta correlación con los eventos motores detectados a través del algoritmo de corrección de movimiento aplicado a las imágenes adquiridas con el microscopio confocal. Dado que los registros analizados en los capítulos 6 y 7 no solo capturaron la actividad del Tectum, sino que también incluyeron al Rombómero 1, disponemos de actividad capturada en ambas regiones de manera simultánea. Esto nos permitió preguntarnos si existe una asociación entre la actividad de las NAM identificadas en el Rombencéfalo y la magnitud de la integración multisensorial tectal.

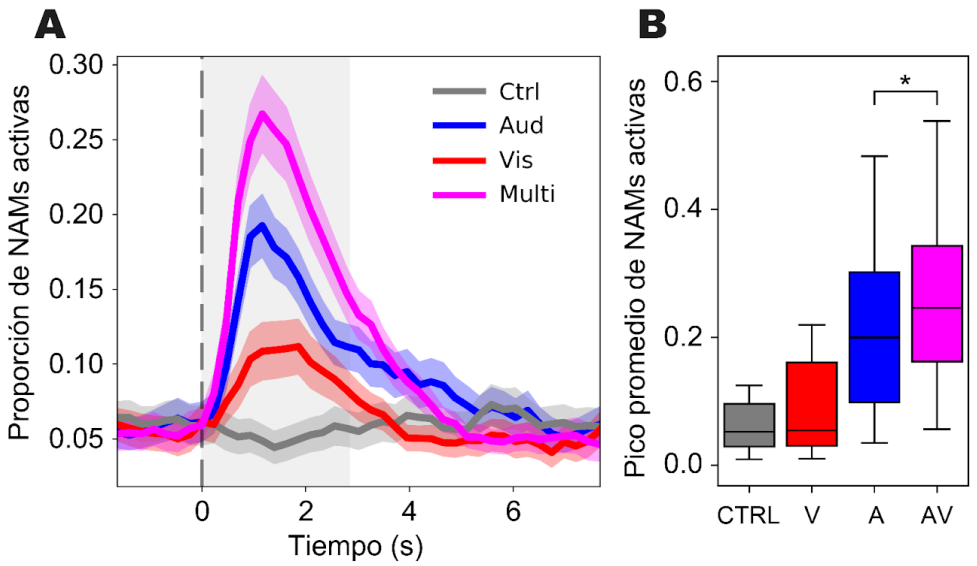


Figura 60. Activación de Neuronas Asociadas al Movimiento (NAM) en el Rombencéfalo. (A) Proporción de NAMs activas en función del tiempo para los 4 tipos de ensayo. La línea vertical punteada representa el tiempo de estimulación. El área gris representa la ventana de análisis. (B) Distribuciones de la proporción máxima de NAMs activas en simultáneo, en promedio para cada experimento, por tipo de ensayo. Cada punto representa un experimento (promedio de 5 ensayos, n = 580, N = 29).*p = 0.042

La Figura 60A muestra la proporción de NAM activas a lo largo del tiempo en respuesta a estímulos auditivos (curva azul), visuales (curva roja), multisensoriales (curva magenta), y durante los ensayos control (curva gris). Es evidente que todas las condiciones de

estimulación son capaces de provocar una respuesta coordinada en esta población de ROIs. En promedio, la respuesta al estímulo visual alcanza un pico de 12% de actividad simultánea de las NAM registradas, mientras que la respuesta al estímulo auditivo alcanza el 20%, y la respuesta al estímulo multisensorial llega al 27%, mostrando una mejora multisensorial (Figura 60B, Prueba U de Mann–Whitney, multisensorial vs máximo unisensorial, p = 0.042). Este patrón de efectividad relativa (Multisensorial > Auditivo, que es el máximo unisensorial) refleja las probabilidades de ocurrencia de los eventos motores medidos en animales inmersos en agarosa (ver Capítulo 5, Figura 33B). Aún más, este patrón también coincide con los resultados obtenidos en nuestros experimentos comportamentales realizados con animales en condiciones de nado libre (ver Capítulo 4, Figura 25A).

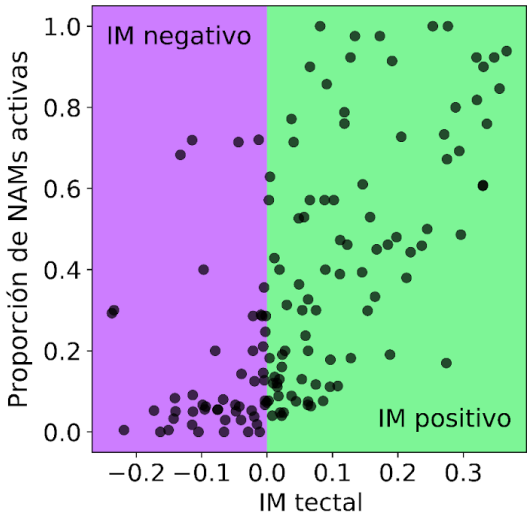


Figura 61. Proporción de NAMs activas en función del IM tectal calculado en el mismo ensayo. Cada punto representa un ensayo multisensorial, para todos los experimentos analizados (n = 140, N = 28). El área verde señala la zona del gráfico en el que los ensayos mostraron IM tectal positivo (mejora multisensorial), mientras que el área violeta señala ensayos que mostraron IM tectal negativo (supresión multisensorial).

Las neuronas del Rombencéfalo reciben múltiples *inputs* además del Tectum que podrían ser responsables del incremento en la proporción de NAM reclutadas por los estímulos multisensoriales. Sin embargo, nos propusimos investigar si este incremento de respuesta multisensorial se correlaciona con el proceso de integración que ocurre en el Tectum. Para esto, calculamos el coeficiente de integración (IM) tectal de cada ensayo multisensorial (ver Capítulo 2) como el contraste entre la proporción de ROIs activos en la PVL para el estímulo multisensorial y la proporción de ROIs activos durante la estimulación unisensorial más efectiva. Además, para cada uno de los ensayos multisensoriales, calculamos la proporción de NAMs que se activaron durante la misma ventana de análisis. De esta manera, fuimos capaces de comparar el IM tectal y la proporción de NAMs activas para cada ensayo multisensorial, estudiando la correlación entre el grado de integración multisensorial en el Tectum y la proporción de NAMs activas en ese ensayo (Figura 61).

Notablemente, la relación entre el IM tectal y la actividad de las NAMs pareciera estar rectificada. Para ensayos en los que el IM tectal fue negativo (indicando supresión

multisensorial o ausencia de mejora, área violeta en Figura 61), la actividad de las NAM tiende a ser muy baja y no presenta ninguna relación con la integración en el Tectum (Modelo Lineal, coef.: -0.003, p = 0.99). Sin embargo, cuando el IM tectal es positivo (indicando mejora multisensorial, área verde en Figura 61), la actividad de las NAM presenta una relación lineal positiva con este valor: cuanto mayor es la mejora multisensorial registrada en el Tectum, mayor es la proporción de NAMs que se activan (Modelo Lineal, coef.: 1.84, p < 0.001). Esta asociación es relativamente fuerte: por ejemplo, en ensayos donde el IM tectal alcanza los valores máximos observados en nuestro dataset (alrededor de 0.3), se activan alrededor de un 80% de las NAMs. Si bien esta relación es solo una correlación, estos resultados son compatibles con un posible efecto de la integración multisensorial tectal sobre la activación de neuronas pre-motoras en el Rombencéfalo, especialmente interpretados en conjunto con el conocimiento existente sobre las proyecciones entre el Tectum y las áreas pre-motoras del rombencéfalo (Baier & Scott, 2024; Del Bene et al., 2010; Kardamakis et al., 2016) (ver Capítulo 1, Figura 6).

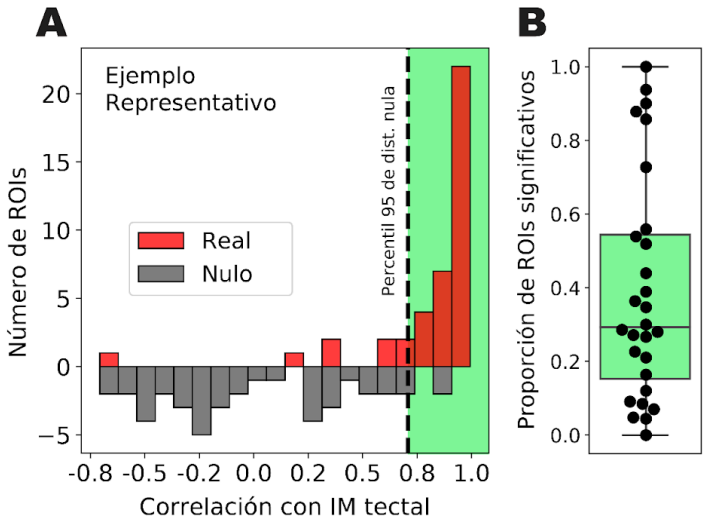


Figura 62. Correlación entre la actividad de NAMs individuales y el IM tectal. (A) Distribución de los coeficientes de correlación entre ΔF/F de cada NAM y el IM tectal (rojo) de un experimento representativo. Las barras grises muestran una distribución nula, calculada aleatorizando el orden de los ensayos entre los valores de ΔF/F y los valores de IM, para eliminar toda relación estadística. La línea punteada vertical marca el percentil 95 de la distribución nula. El área verde representa los coeficientes de correlación cuyo valor es mayor a este percentil. (B) Distribución de la proporción de ROIs que superan el percentil 95 de la distribución nula correspondiente, para todos los experimentos analizados. Cada punto representa un experimento (N = 28).

Para estudiar este fenómeno en detalle, nos preguntamos si todas las NAM presentarían esta correlación con la integración tectal de manera homogénea, o si, por el contrario, solo algunas unidades específicas dentro de esta población serían responsables de esta asociación observada a nivel poblacional. Con este objetivo, calculamos, para cada NAM, su valor medio de ΔF/F durante la ventana post-estímulo en cada uno de los 5 ensayos multisensoriales del experimento. Luego, computamos la correlación entre estos 5 valores y los 5 valores de IM tectal correspondientes a esos mismos ensayos. Esto resultó en una distribución de coeficientes de correlación, uno por cada NAM analizada, que cuantifica en qué medida la fluorescencia (ΔF/F) de cada uno de estos ROIs se correlaciona con la

integración tectal. Para establecer una línea de base y determinar la significancia de estas correlaciones, repetimos el mismo análisis aleatorizando el orden de los ensayos para una de las dos variables, para eliminar cualquier correlación real entre ellas (Figura 62A, ejemplo representativo).

Se observa que la distribución de correlaciones reales está desplazada hacia valores más altos en comparación con la distribución nula, indicando que la correlación individual promedio de las NAM con el IM tectal es más alta que la esperada por azar. Para cuantificar esta observación determinamos, en cada experimento, la proporción de NAMs cuya correlación real con el IM tectal superaba el umbral del percentil 95 de la distribución nula. En promedio, encontramos que un 30% de las NAMs mostraron una correlación estadísticamente significativa con el IM tectal (Figura 62B). Esto sugiere que no todas las NAM presentan esta relación con la integración observada en el Tectum, implicando que un subconjunto acotado de neuronas dentro de esta población podría estar recibiendo información sobre el procesamiento multisensorial tectal. Sin embargo, esto no deja de ser una correlación, y no podemos descartar que señales que provengan de otras regiones expliquen la asociación observada entre la actividad tectal y la actividad de estas neuronas romboencefálicas.

8.2 Patrones de actividad unisensorial en el Rombencéfalo

Dado que las NAM parecieran jugar un rol en la ejecución de comandos motores (Figura 34) y muestran indicios de integración multisensorial a nivel poblacional (Figura 60), nos preguntamos si su patrón de activación sería distinto para los estímulos visuales y auditivos, y cómo se compararían estos con el patrón de activación multisensorial. Para investigar esto, realizamos una nueva serie de experimentos, diseñados específicamente para registrar una extensión mayor del Rombencéfalo (IMG-ROM, ver Tabla 1). Por limitaciones del microscopio confocal, restringimos la adquisición al Rombencéfalo, sin poder registrar el Tectum de manera simultánea (ver Figura 31A_{ii}). Esto nos permitió capturar la actividad neuronal desde el Rombómero 1 hasta el Rombómero 7 en 17 animales (Figura 63A).

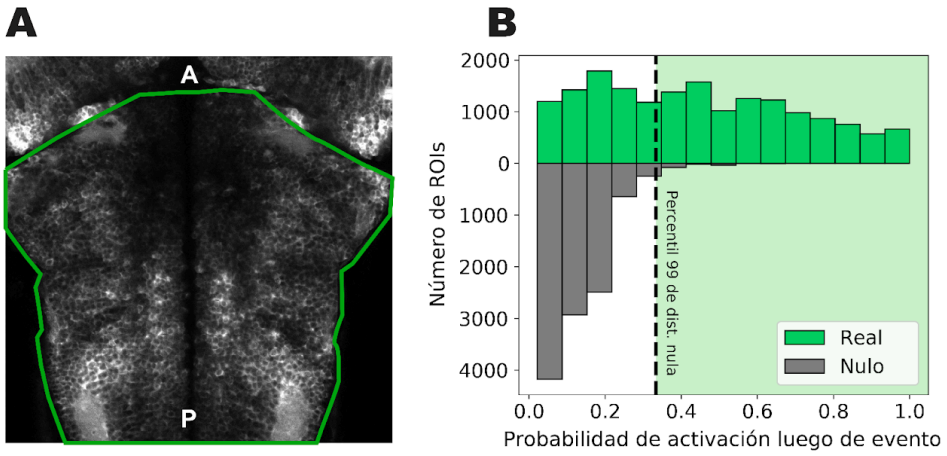


Figura 63. Definición de Neuronas Asociadas al Movimiento en un nuevo experimento. (A) Ejemplo representativo de plano capturado en este nuevo experimento. El borde verde encierra la región del

Rombencéfalo registrada en este experimento. (B) Distribución de ROIs según su probabilidad de activación luego de eventos motores espontáneos, a través de todos los experimentos analizados (N = 17) (histograma verde). El histograma gris representa una distribución nula, calculada de la misma manera sobre puntos temporales tomados al azar durante los registros.

Al igual que en los experimentos anteriores, utilizamos las mismas condiciones de estimulación (auditivo, visual, multisensorial), además de ensayos control, identificamos eventos de movimiento utilizando el algoritmo de corrección de movimiento y utilizamos estos datos para identificar Neuronas Asociadas al Movimiento (NAM) (Figura 63B). En este caso, las NAM están distribuidas a lo largo de los distintos rombómeros registrados.

Para estudiar la representación espacial de los estímulos visuales y auditivos en esta población, agrupamos las NAM en bins bidimensionales definidos sobre todo el plano capturado del Rombencéfalo. Decidimos visualizar los datos de esta manera ya que el Rombencéfalo es una región cerebral muy diversa, e interpretar algunos resultados es desafiante sin subdividirla anatómicamente. Aprovechamos que los ROIs identificados en todos los experimentos fueron alineados al espacio común definido por un cerebro de referencia (ver Capítulo 5), lo cual permitió calcular, para cada bin, la probabilidad de activación media de las NAM contenidas en él a través de todos los experimentos incluidos en este análisis. Esto permitió visualizar la distribución anatómica de las NAM activas para distintas condiciones de estimulación (Figura 64A). A simple vista, no se aprecian diferencias muy marcadas entre los patrones de activación generados por el estímulo visual (Figura 64A_i) y por el estímulo auditivo (Figura 64A_{ii}), aunque el auditivo parecería resultar en una mayor activación a través de toda la región analizada.

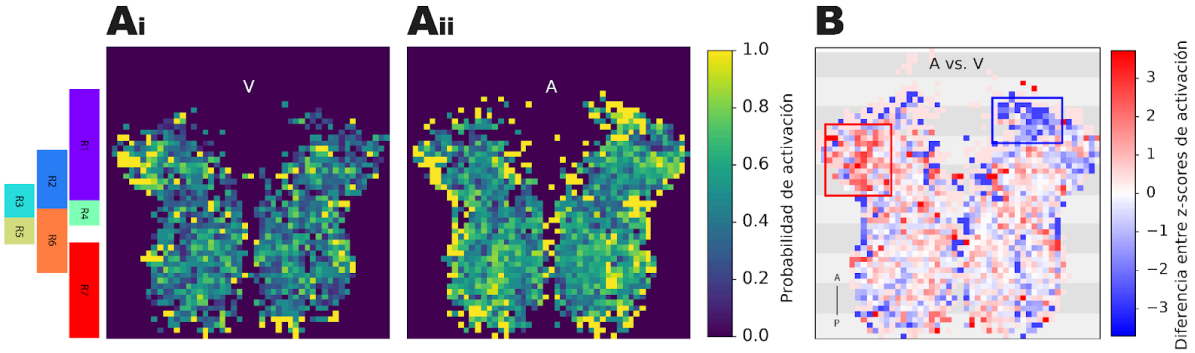


Figura 64. Patrón de activación unisensorial de NAMs en el Rombencéfalo. (A_{i-ii}) Probabilidad de activación promedio de NAMs, agrupadas espacialmente en bins 2D, en respuesta a estímulos visuales (V, izquierda) y auditivos (A, derecha). El diagrama de la izquierda señala de manera aproximada la posición anteroposterior de los rombómeros (R1 a R7). (B) Diferencia bin-a-bin entre los patrones de activación mostrados en A. Los patrones fueron *z-scoreados* previo al cómputo de la diferencia. Las cajas azul y roja representan regiones con una activación relativa mayor para las condiciones auditiva y visual, respectivamente.

Para analizar el grado de similitud entre estos dos patrones de activación promedio, calculamos su diferencia bin a bin. Dado que la magnitud global de las respuestas puede variar entre estímulos debido a diferencias en su saliencia relativa, y que esto podría enmascarar diferencias genuinas en la representación espacial, normalizamos estos datos

previo a su comparación. Específicamente, calculamos el *z-score* de las activaciones por bin para cada modalidad. La Figura 64B muestra la diferencia entre ambos patrones de activación normalizados. Bins de color rojo más intenso representan áreas donde la actividad relativa de las NAM fue mayor en los ensayos visuales que en los ensayos auditivos, mientras que bins de color azul más intenso indican una predominancia relativa de la actividad auditiva por sobre la visual. Si bien se observan algunas zonas en donde estas diferencias fueron particularmente notorias (señaladas con una caja azul y una caja roja en la Figura 64B) no resultaron evidentes diferencias sistemáticas en la organización anatómica de las respuestas unisensoriales, analizadas a esta escala.

A continuación, replicamos el análisis basado en componentes principales (PCA) descrito en el Capítulo 7, aplicándolo a los datos de actividad de las NAM obtenidos en esta nueva serie experimental, con el objetivo de cuantificar las diferencias entre las representaciones visuales, auditivas y multisensoriales en el Rombencéfalo. Esto nos permitió, una vez más, representar cada ensayo (visual, auditivo y multisensorial) como una trayectoria en un espacio de 2 dimensiones que resume cómo se organiza la activación de las NAM registradas en el tiempo post-estímulo. La Figura 65A muestra un ejemplo representativo de este análisis, con trayectorias correspondientes a ensayos auditivos (azul), visuales (rojo) y multisensoriales (magenta). Los vectores rojo y azul representan las direcciones medianas que describen a las dos representaciones unisensoriales en ese experimento. En este caso, como en otros observados, estas representaciones resultan ser aproximadamente ortogonales en el espacio reducido, sugiriendo que la respuesta de las NAM a los dos estímulos podría ser diferenciable.

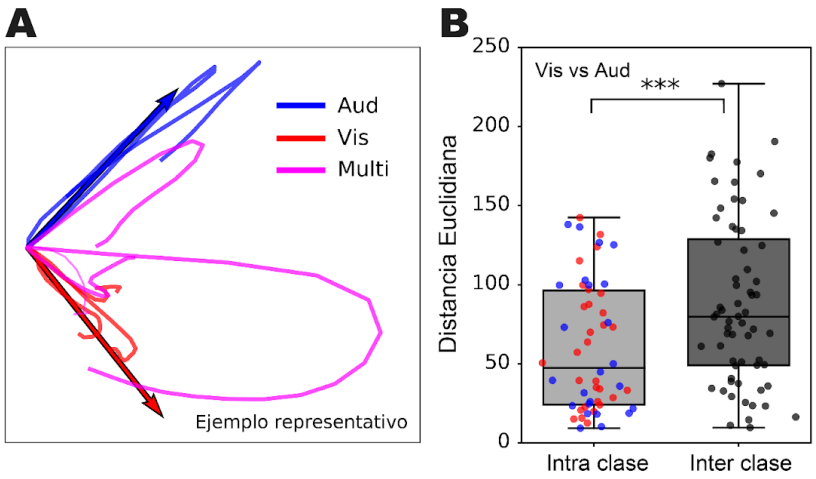


Figura 65. Diferencia entre patrones de activación unisensoriales en las NAMs. (A) Trayectorias que representan el estado de activación de las NAMs a través del tiempo en un espacio de 2 dimensiones, para cada ensayo de las condiciones auditiva (azul), visual (roja) y multisensorial (magenta) para un experimento representativo. Las trayectorias representan los 8 fotogramas posteriores al tiempo de estimulación. Los vectores rojo y azul representan la dirección mediana del sexto punto de las trayectorias visuales y auditivas graficadas, respectivamente. (B) Distribuciones de distancias euclidianas entre trayectorias de una misma clase unisensorial (intra clase, visuales en rojo, auditivas en azul) y entre trayectorias de distintas clases (distancias entre pares de trayectorias visual y auditiva, inter clase, en negro), para todos los experimentos analizados (N = 15).***p=0.002

Para corroborar esta conclusión, transformamos las trayectorias completas en puntos en un espacio de dimensión 2 x 8 (el número de fotogramas en la ventana incluída en este análisis), al igual que hicimos en el Capítulo 7. Calculamos la distancia euclidiana promedio entre todos los pares de trayectorias visuales dentro de cada experimento (intra visual, puntos rojos dentro de intra clase, Figura 65B), entre todos los pares de trayectorias auditivas (intra auditivo, puntos azules dentro de intra clase), y entre todos los pares formados por una trayectoria visual y una auditiva (inter clase, puntos negros). La distancia euclidiana media entre trayectorias de distinta modalidad (Figura 65B, inter clase) fue significativamente mayor que la distancia media entre trayectorias de la misma modalidad unisensorial (Figura 65B, intra clase) (Prueba U de Mann-Whitney: $p = 0.002$). Esto demuestra que las respuestas unisensoriales de las NAM en el Rombencéfalo son efectivamente distinguibles.

8.3 Patrón de respuesta multisensorial en el Rombencéfalo

Finalmente, nos preguntamos cómo se organizaría la respuesta multisensorial en relación a estas dos representaciones unisensoriales. Específicamente, queríamos saber si la activación conjunta de las NAM durante la estimulación multisensorial adoptaría un patrón similar a una de las respuestas unisensoriales, o si se configuraría como una respuesta distinta.

Para responder esto, comenzamos nuevamente examinando la distribución espacial de la actividad de las NAM a través de todo el Rombencéfalo registrado, pero esta vez analizando los ensayos multisensoriales (Figura 66A). El mapa de actividad resultante parece ser más homogéneo en comparación con los patrones observados en los casos unisensoriales (Figura 64A, Sección 8.2). No se observa una organización anatómica particular a esta escala.

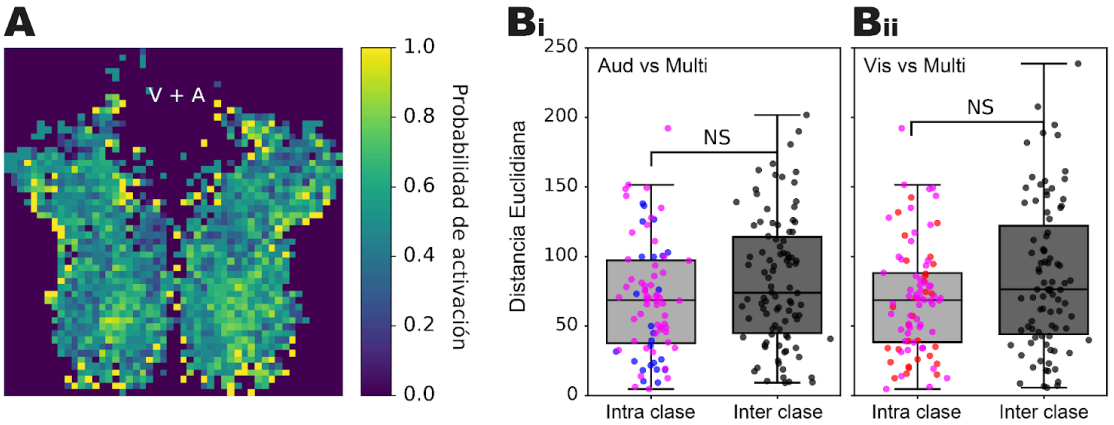


Figura 66. Patrón de activación multisensorial de las NAMs en el Rombencéfalo. (A) Probabilidad de activación promedio de NAMs, agrupadas espacialmente en bins 2D, en respuesta a estímulos multisensoriales. (B) Distribuciones de distancias euclidianas entre trayectorias de una misma clase y entre clases, donde cada clase es una condición de estimulación de interés. (B_i) Comparación entre distancias euclidianas intra-auditivas (azules) e intra-multisensoriales (magentas), intra clase en general, contra distancias euclidianas entre trayectorias auditivas y multisensoriales (inter clase, negro), para todos los experimentos analizados. (B_{ii}) Comparación entre distancias euclidianas intra-visuales (rojas) e intra-multisensoriales (magentas), intra clase

en general, contra distancias euclidianas entre trayectorias visuales y multisensoriales (inter clase, negro), para todos los experimentos analizados (N = 15).

A continuación, recurrimos nuevamente a los datos resultantes del PCA. Utilizando la misma representación de trayectorias en el espacio de 2 x 8 dimensiones, calculamos la distancia euclidiana promedio entre pares de trayectorias, pero esta vez comparando las trayectorias multisensoriales con cada una de las unisensoriales. Específicamente, para cada experimento, calculamos la distancia media entre todas las combinaciones posibles de pares formados por trayectorias multisensoriales (intra multisensorial, Figura $66B_i$ y $66B_{ii}$, magenta), entre pares formados por una trayectoria multisensorial y una trayectoria auditiva (Figura $66B_i$, inter clase, puntos negros), y entre pares formados por una trayectoria multisensorial y una trayectoria visual (Figura $66B_{ii}$, inter clase, puntos negros).

Estos resultados se presentan en la Figura 66B para todos los experimentos analizados. La activación de las NAMs frente a nuestro estímulo multisensorial no es significativamente distinta a la producida por el estímulo auditivo (Prueba U de Mann-Whitney: $p = 0.10$) ni por el estímulo visual (Prueba U de Mann-Whitney: $p = 0.07$). Esto podría sugerir que la representación multisensorial toma alguna forma intermedia entre ambas representaciones unisensoriales, o que a veces se asemeja a una de las representaciones y a veces a la otra (trayectorias que se comportan de estas maneras pueden ser observadas en el ejemplo de la Figura 65A). En cualquier caso, nuestro análisis no nos permite concluir de manera definitiva acerca de cuál es la relación entre la representación multisensorial y las respuestas unisensoriales de las NAMs en el Rombencéfalo.

CAPÍTULO 9: INTEGRACIÓN MULTISENSORIAL EN EL CEREBRO DE PECES CEBRA CON LA COLA LIBERADA

9.1 Experimentos en peces con la cola liberada

En esta tesis, realizamos principalmente experimentos utilizando animales completamente fijados en agarosa. Esta preparación permitió obtener registros neuronales estables y de alta resolución espacial en planos únicos del Tectum mediante microscopía confocal. Sin embargo, esto implicó una restricción importante del movimiento del animal limitando severamente el repertorio comportamental observable. Es muy probable que el comportamiento natural de las larvas se vea significativamente afectado por esta restricción física. Además, los eventos motores detectados en nuestros experimentos previos no permiten desambiguar entre distintos tipos de comportamientos, ya que todo evento motor se manifiesta como un desplazamiento transitorio del cerebro en la imagen capturada por el microscopio a baja resolución temporal. Por estas razones, resulta de gran interés investigar la relación entre la actividad neuronal y el comportamiento en animales que poseen una mayor libertad de movimiento.

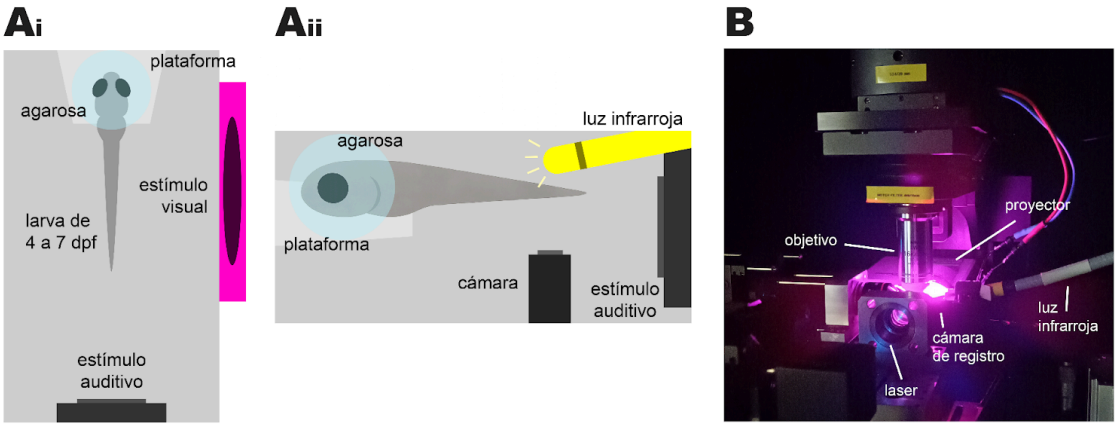


Figura 67. Setup experimental utilizado para registrar actividad neuronal y comportamental con el microscopio de tipo SPIM. (A) Esquema simplificado del setup, en vista superior (A_i) y vista lateral (A_{ii}). (B) Foto del setup experimental.

En el contexto de una colaboración con el laboratorio de Germán Sumbre en la École Normale Supérieure (ENS) de París, pudimos acceder a un microscopio de plano único (SPIM, por sus siglas en inglés, también conocido como *light sheet microscopy*). Este tipo de microscopio permite la captura de la actividad neuronal en volúmenes cerebrales completos con resolución celular (ver Capítulo 2, Figura 12). Aún más relevante para nuestros objetivos, el Dr. Sumbre y su grupo han perfeccionado técnicas que posibilitan registrar simultáneamente las imágenes de la actividad cerebral mediante el SPIM mientras se registra el movimiento de la cola del animal filmando por debajo con una cámara infrarroja. Además, el laboratorio del Dr. Sumbre dispone de líneas transgénicas de peces cebra de tipo HuC:H2B-GCaMP6f (ZFIN ID: ZDB-TGCONSTRCT-180201-2). Esta línea expresa el sensor de calcio fluorescente GCaMP6f en el núcleo de todas las neuronas del cerebro. Esto permite una identificación clara de somas neuronales individuales incluso en regiones con una alta densidad de neuritas, como el neuropilo tectal, a diferencia de lo que fue posible en nuestros experimentos anteriores, realizados con un marcador citoplasmático.

Este último capítulo de resultados de la tesis presenta experimentos que replican y extienden los hallazgos de los capítulos anteriores. Pero, a diferencia de los resultados presentados anteriormente, en los que solo podíamos capturar un único plano del Tectum a la vez, en estos experimentos capturamos todo el volumen tectal en simultáneo. A su vez, la capacidad de registrar la actividad de prácticamente todo el cerebro de forma simultánea nos permitió analizar el rol potencial de otras áreas cerebrales, más allá del Tectum, en los procesos de integración multisensorial audiovisual.

Es importante mencionar que estas condiciones experimentales, si bien representan una condición con más libertad de movimiento para el animal, requieren un mayor nivel de manipulación para fijar la cabeza de las larvas sin inmovilizar la cola y conllevan el riesgo de dañar a las larvas durante el proceso. Por estas razones, y debido a que el tiempo de entrenamiento para realizar este montaje fue muy acotado, alrededor del 50% de las larvas no sobrevivieron al procedimiento experimental (en contraposición con el ~95% de sobrevida en montaje en agarosa completa).

En estos experimentos (IMG-SPIM, ver Tabla 1) utilizamos 18 animales de 4-8 dpf que fueron cuidadosamente montados en agarosa (4%) y ubicados en una plataforma que asegura que las larvas queden inmovilizadas, minimizando desplazamientos en el eje z durante la adquisición (Figura 67). Los volúmenes cerebrales adquiridos fueron alineados a un cerebro estándar de referencia (ZBrain). Los ROIs correspondientes a somas neuronales individuales fueron identificados utilizando un algoritmo de segmentación semiautomático desarrollado y optimizado por el laboratorio del Dr. Sumbre (Romano et al., 2015). La señal de fluorescencia cruda fue extraída calculando la intensidad promedio dentro de cada ROI para cada fotograma de registro. Finalmente, esta señal de fluorescencia fue normalizada ($\Delta F/F$) y binarizada utilizando los umbrales y criterios descritos en detalle en el Capítulo 5.

9.2 Calibración y selección de estímulos visuales y auditivos

En primer lugar, fue necesario volver a seleccionar y calibrar los estímulos visuales y auditivos a utilizar, ya que el entorno experimental era completamente distinto al empleado previamente y no contábamos con los mismos dispositivos de estimulación. Además, en lugar de utilizar una pantalla OLED, empleamos un picoproyector (PK320, Optoma) equipado con un filtro magenta. Luego de algunos experimentos preliminares (no mostrados) decidimos utilizar una dinámica de expansión del *looming* más rápida a la utilizada en nuestros experimentos anteriores (l/v = 0.5), dado que encontramos que era más efectiva, alcanzando velocidades de expansión que la pantalla utilizada en experimentos realizados en el confocal (IMG-TEC, IMG-ROM) no es capaz de producir. En consecuencia, los estímulos visuales consistieron en discos negros en expansión presentados sobre un fondo magenta uniforme. La elección de esta configuración se debió principalmente a la necesidad de minimizar la interferencia de la luz del estímulo visual con la captura de la señal de fluorescencia neuronal por el SPIM, dado que la luminancia generada por el pico-proyector era mucho mayor a la

producida por la pantalla OLED utilizada en los experimentos descritos anteriormente. Además, dado que las condiciones generales de iluminación en este nuevo microscopio eran muy diferentes (tanto la irradiancia del proyector como la iluminación ambiental del cuarto de *imaging* difieren de nuestro *set-up* anterior), resultó relevante volver a probar distintos valores de contraste. Tras evaluar diversas opciones, decidimos trabajar con dos niveles de contraste distintos (Figura 68, V_{min} = 0.26, V_{max} = 0.99, medido como Contraste de Michelson, CM).

De manera similar, procedimos con la selección y calibración del estímulo auditivo. Al no disponer del mismo parlante empleado en los experimentos anteriores, optamos por un parlante Visaton K28 WP, idéntico al que usamos en los experimentos preliminares de comportamiento analizados en el Capítulo 3. Este modelo de parlante presentó problemas técnicos recurrentes durante la fase inicial de implementación de los experimentos en París, lo que nos obligó a reemplazarlo por otra unidad del mismo modelo y a repetir una parte de los experimentos realizados. Una vez superados estos inconvenientes, elegimos dos estímulos auditivos de amplitudes distintas (Figura 68, A_{min} = 2, A_{max} = 10, medido en dB de diferencia respecto al fondo) en base a su efectividad para evocar respuestas motoras. Es importante destacar que, debido a la restricción de tiempo de la pasantía, la calibración de los estímulos no pudo ser tan rigurosa.

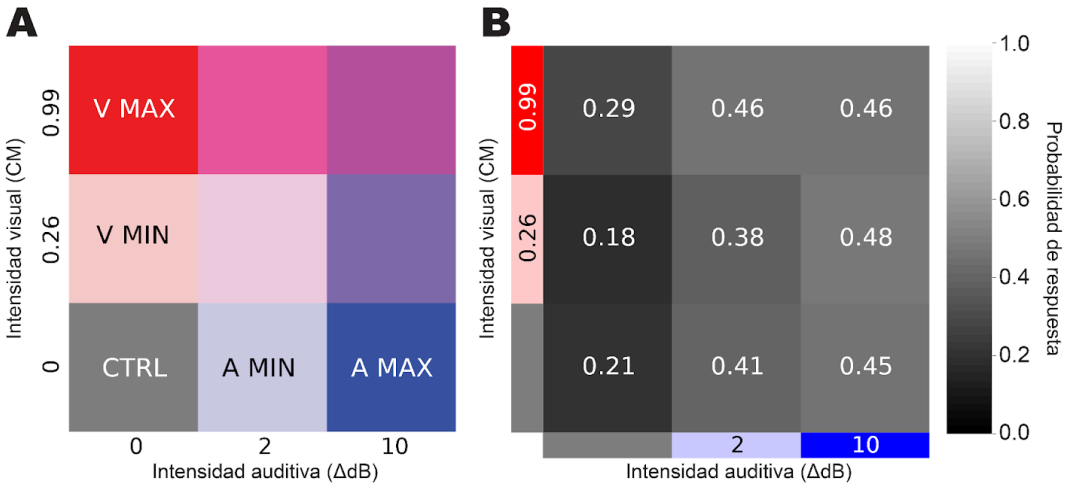


Figura 68. Cuantificación preliminar de respuestas comportamentales de larvas parcialmente inmovilizadas, N= 18. (A) Esquema de la matriz de estimulación utilizada, con dos intensidades visuales expresadas como Contraste de Michelson (CM), dos intensidades auditivas expresadas como la diferencia en decibeles con el fondo, una condición control y las cuatro combinaciones multisensoriales. (B) Probabilidad de movimiento de la cola para cada una de las condiciones de estimulación.

Cada experimento constó de la presentación de estos 4 estímulos unisensoriales, sus cuatro combinaciones posibles (estímulos multisensoriales) y una condición control sin estimulación (Figura 68A). Esto resultó en un total de 9 condiciones distintas, presentadas 4 veces cada una en un orden aleatorio totalizando 36 ensayos, adquiridos en alrededor de una hora de registro.

Para confirmar que nuestros estímulos fueran efectivos en estas condiciones, cuantificamos el movimiento de la cola de las larvas (montadas con la cabeza fija y cola libre) durante los 9 tipos de ensayo. Las respuestas fueron identificadas por observadores expertos dentro de una ventana temporal de 7 segundos relativa al inicio (o final, en el caso del *looming*) de la estimulación. En este análisis preliminar no se buscó establecer un paralelismo con respuestas de escape rápidas (como los C-starts, analizados en los capítulos 3 y 4) dado que, en condiciones de fijación parcial, hacer esta determinación de manera robusta no es posible. Teniendo en cuenta esto y el tiempo limitado con el que disponíamos decidimos considerar como respuesta cualquier evento motor rápido observado en el registro de la cola. A partir de estas observaciones, calculamos la probabilidad de respuesta comportamental para cada una de las condiciones de estimulación y en los ensayos control.

Los resultados de este análisis se observan en la Figura 68B. Encontramos una alta tasa de actividad espontánea en la condición control. Este nivel de actividad basal podría explicarse por lo permisivo del criterio de inclusión de las respuestas comportamentales. Respecto a los estímulos visuales, el de máximo contraste resultó más saliente que el de mínimo contraste, aunque en ambos casos las probabilidades de respuesta fueron similares a la observada en ensayos control. En cambio, ambos estímulos auditivos mostraron una saliencia relativamente alta y similar. Por otro lado, las probabilidades de respuesta evocadas por las condiciones multisensoriales no resultaron ser consistentemente mayores que las máximas probabilidades unisensoriales correspondientes. Es decir, no observamos, en este análisis preliminar, mejora multisensorial comportamental. Esto sugiere que los rangos de intensidad elegidos para nuestros estímulos no eran los óptimos para observar un efecto conspicuo de integración multisensorial a nivel del comportamiento, aunque este método preliminar no es el más sensible a estos cambios, ya que incluye una proporción de respuestas lentas y/o no relacionadas con los estímulos.

9.3 Registro del comportamiento de peces cebra con la cola libre

Uno de los objetivos principales de estos experimentos fue cuantificar el comportamiento de los animales de manera simultánea al registro de su actividad neuronal. Para lograr esto de manera robusta y precisa no era suficiente determinar visualmente los movimientos de la cola, por lo que decidimos utilizar un algoritmo de aprendizaje automático para *trackear* los movimientos de la larva, de manera similar a como se describió en la Sección 3.4.

Una vez montados con la cabeza fija, ubicamos a los animales dentro de una cámara de observación especialmente diseñada, llena de medio E3 estándar. Dentro de esta cámara, la pantalla se ubicó sobre una de las paredes laterales (correspondiente al lado izquierdo del animal, manteniendo la consistencia con nuestros experimentos anteriores), mientras que el estímulo auditivo provino del parlante ubicado en una posición posterior al animal (Figura 67). Para poder visualizar y registrar los movimientos de la cola de las larvas, ubicamos una fuente de iluminación infrarroja dentro de la cámara de registro y adquirimos imágenes del comportamiento utilizando una cámara sensible al infrarrojo (Hxg20nir, Baumer). Algunos

fotogramas representativos del registro comportamental se aprecian en la Figura 69. A pesar de la transparencia de la cola y el poco contraste con el fondo del recipiente, la calidad de las imágenes resultó ser suficiente para cuantificar el comportamiento de los animales.

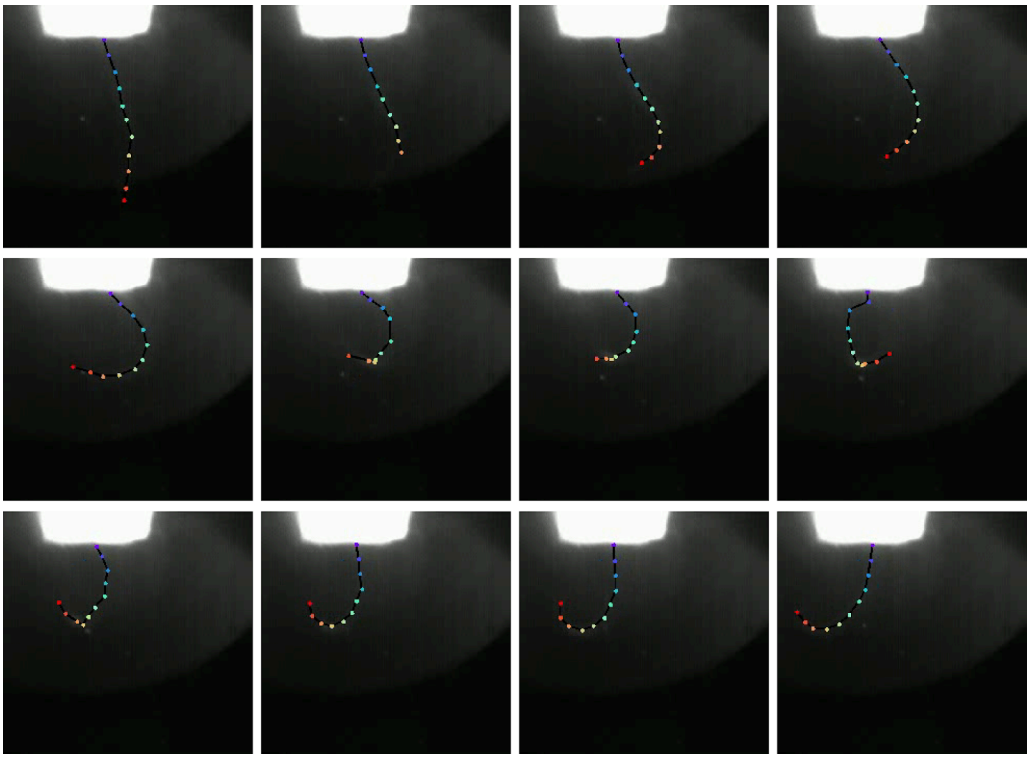


Figura 69. Ejemplo representativo de respuesta comportamental, registrada con la cámara infrarroja en un pez con la cabeza sujetada por agarosa y la cola libre. Se muestra un fotograma cada 4 ms. Los puntos de colores conectados por líneas muestran la estimación de la posición de la cola producida por el modelo entrenado con DeepLabCut.

A continuación, entrenamos un nuevo algoritmo de aprendizaje automático utilizando DeepLabCut, siguiendo la misma metodología general descrita previamente (Capítulo 4). En este caso, para capturar la postura y el movimiento de la cola, elegimos definir 11 puntos de referencia equiespaciados a lo largo de su eje principal. Aquellos experimentos en los cuales la calidad del registro comportamental no fue lo suficientemente buena como para permitir un *tracking* confiable de la cola fueron excluidos del análisis que se describirá en este capítulo (8 de 18 animales).

9.4 Respuestas a estímulos aversivos en peces con la cola libre

Para identificar momentos discretos de actividad motora explosiva, calculamos la velocidad lineal instantánea de cada uno de los puntos de la cola y definimos como eventos motores rápidos aquellos períodos de tiempo en los que la velocidad lineal de al menos 10 de los 11 puntos fue al menos 4 desvíos estándar por sobre la media (Figura 70A). Estos umbrales son relativamente altos porque el algoritmo de *tracking* entrenado no es consistentemente preciso a través de todos los fotogramas (debido a la baja calidad de la imagen capturada). En

consecuencia, la velocidad de los puntos *trackeados* es ruidosa, y resulta necesario tomar umbrales altos que no clasifiquen como comportamiento ciertos patrones espurios en los datos. Esta estrategia excluye ciertos eventos motores del conjunto de eventos a analizar (Figura 70B, notar los dos eventos que no son detectados) pero conserva los eventos más rápidos y explosivos.

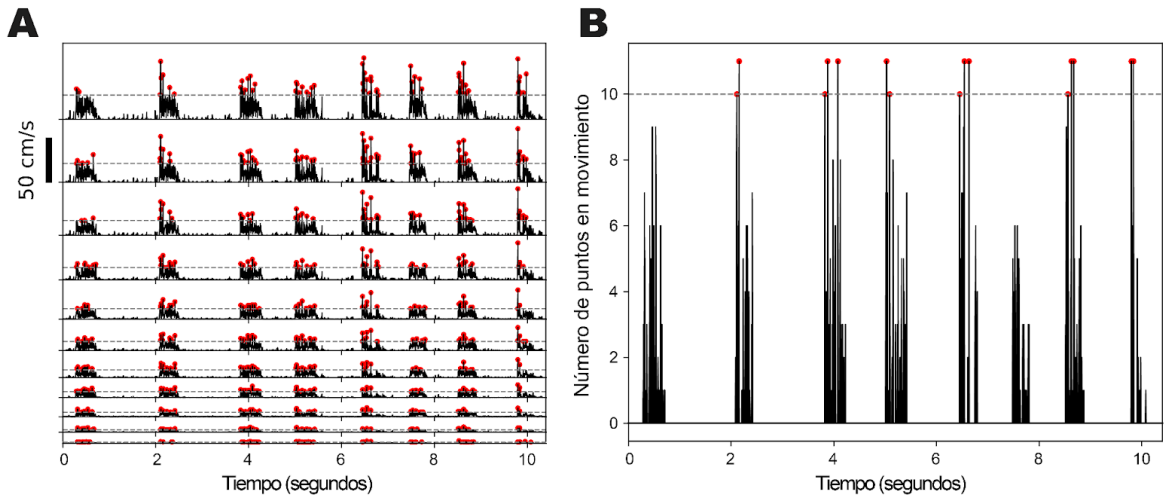


Figura 70. Definición de eventos motores en experimentos en larvas con la cola liberada. (A) Velocidad lineal instantánea de los puntos identificados por el algoritmo de *tracking*, en función del tiempo, para un intervalo temporal elegido al azar de un experimento representativo. Se observan 8 eventos en total. Cada fila representa la curva de velocidad lineal de un punto, desde el punto más anterior (fila inferior) hasta el punto más posterior (final de la cola, fila superior). Las líneas punteadas grises representan un umbral de 4 desvíos estándar, por sobre el cual se considera que un punto se está moviendo significativamente. Puntos rojos representan estos momentos de movimiento significativo. (B) Número de puntos cuyo movimiento es considerado significativo en función del tiempo, para la misma ventana temporal mostrada en A. La línea punteada gris muestra el umbral por sobre el cual se considera que el animal está realizando un evento de movimiento. Los puntos rojos marcan los momentos en los que el animal se encuentra realizando uno de estos eventos.

Una vez identificados estos eventos motores discretos, calculamos un conjunto de parámetros cinéticos para cada evento individual. Estos parámetros incluyen la curvatura máxima alcanzada por la cola durante el evento, la velocidad angular de diferentes segmentos de la cola, y la velocidad lineal máxima de la punta de la cola, entre otros (Tabla 3). De esta manera, cada evento motor fue representado como un punto en un espacio multidimensional, donde cada dimensión corresponde a una de estas características. Este enfoque es muy similar al utilizado en el Capítulo 3 para identificar distintos tipos de respuestas de escape. Al igual que en ese caso, utilizamos una técnica de reducción de dimensionalidad (en este caso, t-SNE, dado que resultó más efectivo que Kernel-PCA para separar los datos en grupos identificables) para reducir la dimensionalidad de cada punto (cada evento motor) a un espacio bidimensional, lo cual nos permitió visualizar la estructura subyacente de los datos y discernir si existían agrupaciones correspondientes a distintos comportamientos.

Variable	Media	Máximo	Parámetros
Velocidad lineal de la cola	x	x	2
Suma de los ángulos de la cola	x	x	2
Velocidad del punto t6	x	x	2
Aceleración de la cola	x	x	2
Jerk de la cola	x	x	2
Suma de curvatura de la cola	x	x	2
Cambio de curvatura de la cola	x	x	2
Total de parámetros			**14**

Tabla 3. Parámetros cinéticos de interés extraídos de eventos motores rápidos para generar un espacio de alta dimensión que los describa.

El resultado de este análisis se puede observar en la Figura 71A. En este gráfico, cada punto representa un único evento motor, posicionado en el espacio bidimensional reducido según sus parámetros cinéticos. Se puede apreciar que los puntos no se distribuyen de manera uniforme, sino que exhiben una estructura definida, formando grupos o *clusters* de eventos que comparten características similares. En particular, luego de una inspección visual del resultado (Figura 71A) decidimos separar los datos en 8 grupos utilizando el algoritmo de Clustering Aglomerativo (Ward Jr., 1963). Este método funciona especialmente bien para separar grupos de datos compactos. Es importante señalar que esta clasificación no implica necesariamente que cada uno de estos 8 grupos corresponda a un comportamiento funcionalmente diferente en todos los casos.

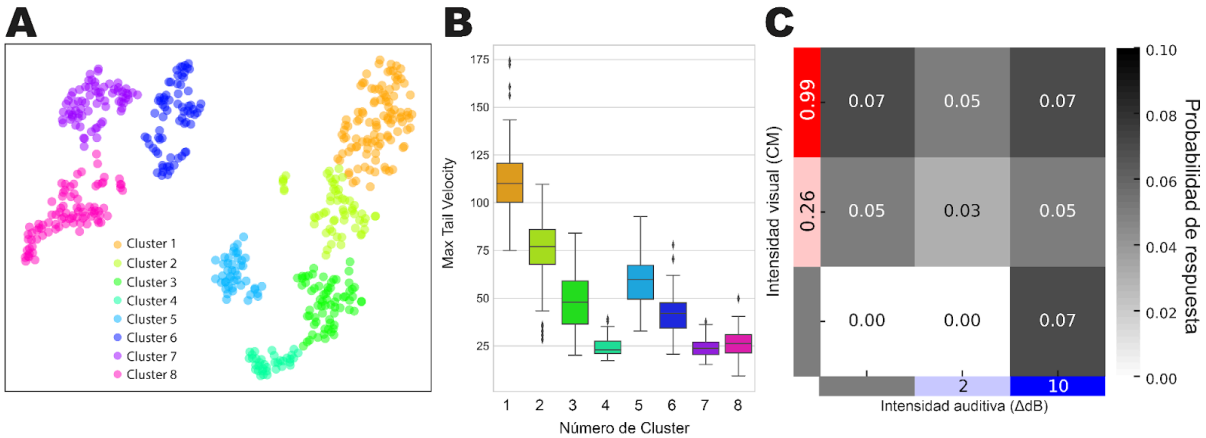


Figura 71. Identificación de comportamientos rápidos. (A) Organización de eventos de movimiento de la cola en un espacio de 2 dimensiones que representa sus características cinéticas, para todos los eventos encontrados en todos los experimentos analizados. Cada color representa un *cluster* distinto recuperado mediante la técnica

de Clustering Aglomerativo. (B) Distribución de velocidades lineales máximas alcanzadas por la cola del animal, para cada *cluster* identificado. (C) Probabilidad de observar un evento comportamental de tipo 1 (eventos rápidos) para cada condición de estimulación, a través de todos los ensayos realizados (n = 40).

A continuación, decidimos caracterizar cada uno de estos 8 grupos de eventos con más detalle, con el objetivo de identificar si alguno de ellos correspondía a un comportamiento evasivo rápido, compatible con las respuestas de escape analizadas previamente. Para esto, calculamos la velocidad máxima alcanzada por la cola para cada uno de los eventos pertenecientes a cada uno de los 8 *clusters* identificados (Figura 71B). Como puede observarse, el *cluster* 1 exhibe velocidades máximas significativamente más altas que las de todos los otros grupos identificados (Prueba U de Mann–Whitney, comparación del *cluster* 1 contra los eventos de todos los otros grupos combinados: $p < 0.001$). Es importante señalar que esta diferencia en la velocidad máxima no resultó suficiente para reconocer estos eventos sin realizar la reducción de dimensionalidad, sino que la información de las otras variables involucradas fue necesaria para identificar este grupo de eventos rápidos.

Para investigar si estos eventos (*cluster* 1) estaban relacionados con nuestra estimulación sensorial, analizamos su probabilidad de ocurrencia para cada una de las 9 condiciones de estimulación (Figura 71C). Notablemente, encontramos que estos eventos nunca ocurrían de manera espontánea (es decir, en la condición control) ni en respuesta al estímulo auditivo de menor intensidad. Sin embargo, sí se observaban en respuesta a todas las otras condiciones de estimulación. Este patrón de respuesta no se observó cuando hicimos el mismo análisis para los otros *clusters* de comportamientos rápidos (datos no mostrados). Por esta razón, y teniendo en cuenta que estos eventos eran significativamente más rápidos que los demás, decidimos enfocar nuestro análisis comportamental posterior en ellos, representando un 35% de los eventos motores identificados (38 / 110).

9.5 Respuestas unisensoriales y multisensoriales en el Tectum

A continuación, centramos nuestro análisis en los registros de actividad neuronal correspondientes a las dos regiones principales del Tectum que son el foco de esta tesis: la capa periventricular (PVL) y el neuropilo tectal. Como fue detallado previamente, en esta línea de peces el sensor de calcio se expresa únicamente en el núcleo. Por esto pudimos identificar somas neuronales individuales no solo en la PVL sino también dentro del neuropilo, y cuantificar la actividad poblacional en ambas regiones a lo largo del tiempo.

La respuesta poblacional de la PVL para distintas condiciones de estimulación se muestra en la Figura 72. En todos los gráficos presentados (Figuras 72A-F) se muestra la proporción de ROIs activos en la PVL en función del tiempo (comparar con Figuras 36, 41 y 46), en una ventana de 5 s posterior al tiempo de estimulación, marcado con una línea punteada vertical (estímulo auditivo o final de la expansión del *looming*).

La Figura 72A compara las respuestas auditivas unisensoriales con la actividad espontánea medida en ensayos control. La actividad espontánea, medida en la condición control (Figura

72A y 72B, trazo gris), mostró una media del 3.9% de ROIs activos durante una ventana de 5 s post-estímulo. Es importante remarcar que los gráficos de la Figura 72 muestran los ROIs activos de manera simultánea, mientras que estos porcentajes expresan el número de ROIs totales activos durante la ventana de análisis. Notablemente, el estímulo auditivo de menor intensidad evocó una respuesta de magnitud similar (3.8%, Figura 72A, curva celeste), no distinguible de la actividad basal (proporción de ROIs activos promedio por ensayo durante la ventana de análisis para cada condición, Prueba U de Mann–Whitney: $p = 0.42$). En contraste, el estímulo auditivo de mayor intensidad produjo una respuesta significativa contra la actividad basal (9.09% de ROIs activos, Figura 72A, curva azul, Prueba U de Mann–Whitney: $p = 0.044$). Este hallazgo corrobora una vez más que el Tectum recibe y procesa información auditiva, como ya mostramos en nuestros experimentos anteriores.

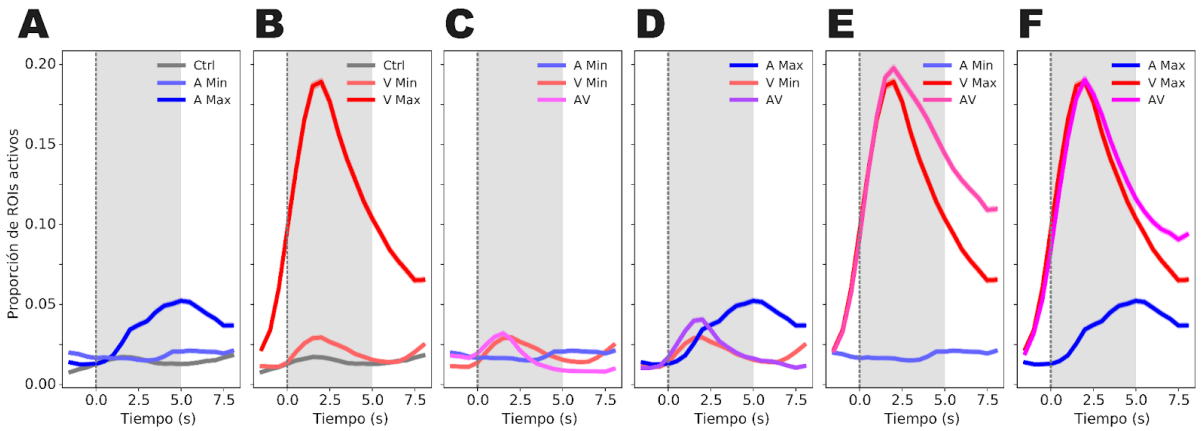


Figura 72. Respuesta poblacional de la PVL durante experimentos en animales con la cola liberada. Cada curva representa la proporción de ROIs activos en promedio, en función del tiempo, para todos los experimentos analizados, para cada tipo de ensayo. Se agrupan condiciones de estimulación en unisensoriales auditivas (A), unisensoriales visuales (B) y las cuatro combinaciones multisensoriales, con sus respectivos componentes unisensoriales graficados nuevamente como referencia (C-F). En todos los casos, la línea punteada vertical representa el tiempo de estimulación, siendo este el final de la expansión del *looming*, la ocurrencia del estímulo auditivo, o ambos, cuando corresponda, y el área gris representa la ventana de análisis (N = 10).

Algo similar se observa para los estímulos unisensoriales visuales (Figura 72B). El estímulo visual de menor contraste indujo una respuesta por encima de la actividad espontánea, aunque la proporción de ROIs activos fue relativamente baja (6.6%, Prueba U de Mann–Whitney: $p < 0.001$). Por el contrario, el estímulo visual de mayor contraste evocó una respuesta mucho más robusta (26.3%, Prueba U de Mann–Whitney: $p < 0.001$). Es importante recordar que, a diferencia de los análisis presentados en el Capítulo 6 (basados en registros de un solo plano), estos porcentajes representan la proporción de neuronas activas estimadas en todo el volumen de la PVL. Si bien el número de ROIs identificados por volumen es mucho mayor, si el número de ROIs activados por los estímulos es similar al de los experimentos realizados en el confocal, los porcentajes de ROIs activos serán mucho menores.

La mayor parte de las respuestas multisensoriales en la PVL no mostraron mejoras significativas respecto de la condición unisensorial más efectiva (Figura 72C-F). En particular, las combinaciones $V_{Min} + A_{Min}$ (Figura 72C, 6.6%, $p = 0.372$), $V_{Max} + A_{Min}$ (Figura

72E, 30.2%, p = 0.425) y V_{Max} + A_{Max} (Figura 72F, 29.0%, p = 0.425) no difirieron significativamente de sus respectivas condiciones unisensoriales. Solo la combinación V_{Min} + A_{Max} mostró una diferencia significativa frente al estímulo auditivo solo, aunque su proporción de ROIs activos fue levemente menor que la del mismo (Figura 72D, 8.4%, p = 0.026). En resumen, no logramos detectar una mejora multisensorial sustancial en estas condiciones.

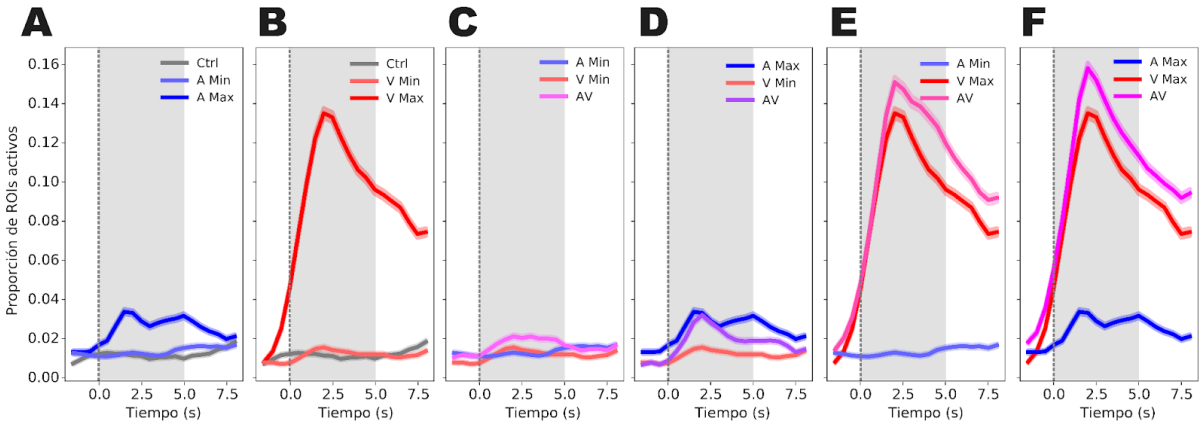


Figura 73. Respuesta poblacional del neuropilo tectal durante experimentos en 10 animales con la cola liberada. Cada curva representa la proporción de ROIs activos en promedio, en función del tiempo, para todos los experimentos analizados, para cada tipo de ensayo. Se agrupan condiciones de estimulación en unisensoriales auditivas (A), unisensoriales visuales (B) y las cuatro combinaciones multisensoriales, con sus respectivos componentes unisensoriales graficados nuevamente como referencia (C-F). En todos los casos, la línea punteada vertical representa el tiempo de estimulación, y el área gris representa la ventana de análisis.

A continuación, repetimos este mismo análisis para el neuropilo tectal (Figura 73). En estos experimentos se identificaron en promedio 625 ROIs por neuropilo (en contraposición a un promedio de 3150 ROIs por PVL). Detectamos una actividad basal espontánea baja en la condición control (3.5%, Figura 73A y 73B, curva gris), la cual no fue superada por el estímulo auditivo de menor intensidad (Figura 73A, curva celeste, 4.2%, Prueba U de Mann-Whitney: p = 0.36), pero sí lo fue por el de mayor intensidad (Figura 73A, curva azul, 8.4%, Prueba U de Mann–Whitney: p = 0.013). El estímulo visual de menor contraste produjo una respuesta por encima de la espontánea en el neuropilo (Figura 73B, curva rojo claro, 4.5%, Prueba U de Mann-Whitney: p = 0.012), mientras que el estímulo visual de mayor contraste evocó una respuesta mucho mayor (Figura 73B, 21.3%, curva rojo oscuro, Prueba U de Mann–Whitney: p < 0.001). El patrón multisensorial, sin embargo, mostró mejoras multisensoriales algo más evidentes. La combinación de estímulos de menor saliencia fue la única que produjo una mejora significativa respecto al máximo unisensorial (Figura 73C, curva rosa, 6.9%, V_{Min} + A_{Min}, Prueba U de Mann–Whitney: p = 0.039), aunque no sucedió lo mismo con las otras combinaciones multisensoriales (Figura 73D, V_{Min} + A_{Max}: media del 7.4%, Prueba U de Mann–Whitney: p = 0.362; Figura 73E, V_{Max} + A_{Min}: media del 25.5%, Prueba U de Mann–Whitney: p = 0.362; Figura 73F, V_{Max} + A_{Max}: media del 25.2%, Prueba U de Mann–Whitney: p = 0.362). Sin embargo, es interesante notar que las combinaciones que incluyen un estímulo visual de alto contraste tendieron a activar más ROIs que el estímulo visual por sí solo (Figura 73E y 73F, curvas magentas).

Estos resultados corroboran que los estímulos auditivos y visuales son procesados por el Tectum, tanto en la PVL como en el neuropilo, y que existe evidencia de algún grado de mejora multisensorial, particularmente en el neuropilo, aunque menor que la observada en la serie experimental IMG-TEC. Es importante destacar la similitud entre el patrón de respuesta neuronal tectal y el patrón de ocurrencia de los comportamientos rápidos identificados en la sección anterior (9.4): solo el estímulo auditivo de menor intensidad falló en evocar actividad, tanto neuronal como comportamental, mientras que todas las otras condiciones de estimulación evocaron respuestas en ambos casos.

9.6 Identificación de ensambles neuronales en el Tectum

Existe evidencia de que el cerebro no solo codifica información en términos de neuronas individuales, sino que la actividad de conjuntos coordinados de neuronas, conocidos como ensambles neuronales, parece ser una unidad de análisis biológicamente relevante (Buzsáki & Draguhn, 2004; Hebb, 1949; Nicolelis et al., 1995; Yuste, 2015). Aprovechando una metodología de análisis utilizada por el laboratorio del Dr. Sumbre (Romano et al., 2015) reanalizamos los datos mostrados en las secciones anteriores, preguntándonos si la actividad de ensambles tectales presentaría integración multisensorial.

El primer paso consistió en tomar los datos de ΔF/F de todos los ROIs tectales registrados (ya sea en la PVL o en el neuropilo, analizados por separado) y calcular, para cada ROI, su valor promedio durante una ventana de análisis de 15 segundos (30 fotogramas) centrados en el tiempo de estimulación (fin del *looming* u ocurrencia del estímulo auditivo). Tomamos una ventana temporal amplia dado que las señales neuronales individuales capturadas resultaron muy ruidosas, y promediar en este intervalo enriquecido en respuestas a la estimulación fue necesario para obtener resultados suficientemente robustos. Dado que cada experimento constaba de 36 ensayos (9 condiciones x 4 repeticiones), este procedimiento nos permitió describir el perfil de respuesta de cada ROI mediante un vector de 36 dimensiones. En esta representación, ROIs que tienden a activarse en los mismos ensayos tendrán patrones de respuesta más similares y, por lo tanto, se ubicarán como puntos cercanos en este espacio de alta dimensionalidad.

A continuación, aplicamos un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre esta matriz de datos. Los componentes principales (CPs) son direcciones ortogonales en este espacio de alta dimensión a lo largo de las cuales los datos exhiben la mayor varianza. Dado que cada CP es una combinación lineal de las dimensiones originales (los 36 ensayos, ver Figura 74A), cada CP representa un patrón de activación específico (ciertos ensayos con mayor actividad y otros con menor actividad) que captura una proporción de la varianza total observada en los datos. Por lo tanto, podemos evaluar si un ROI participa en un ensamble potencial examinando la proyección (el valor o "*score*") de ese ROI sobre dicho componente principal.

La Figura 74B ilustra este análisis con un experimento representativo, mostrando la proyección de todos los ROIs sobre los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). Cada punto en el gráfico representa un único ROI, y sus coordenadas indican su valor para estos dos CPs, que representan dos patrones de activación independientes (dos potenciales ensambles). Se observa que muchos ROIs tienen valores cercanos a 0 para ambos CPs, sugiriendo que no participan en ninguno de estos dos patrones de activación. Sin embargo, existen grupos de ROIs que presentan valores especialmente positivos para el CP1 o para el CP2 (puntos verdes, Figura 74B), lo que indica que su perfil de activación a lo largo de los 36 ensayos coincide con el patrón representado por uno de esos dos componentes, lo cual implica que estos ROIs comparten un patrón de activación en común. Operativamente, clasificamos un ROI como perteneciente a un ensamble si su valor de proyección sobre el CP correspondiente era mayor a 2 (Romano et al., 2015). Es importante notar que esta metodología permite que un mismo ROI forme parte de más de un ensamble a la vez (si su valor supera el umbral para múltiples CPs). Lejos de ser un problema, esto es una ventaja de la técnica, ya que se alinea con la noción teórica de que las neuronas pueden participar en la representación de múltiples piezas de información formando parte de distintos ensambles funcionales.

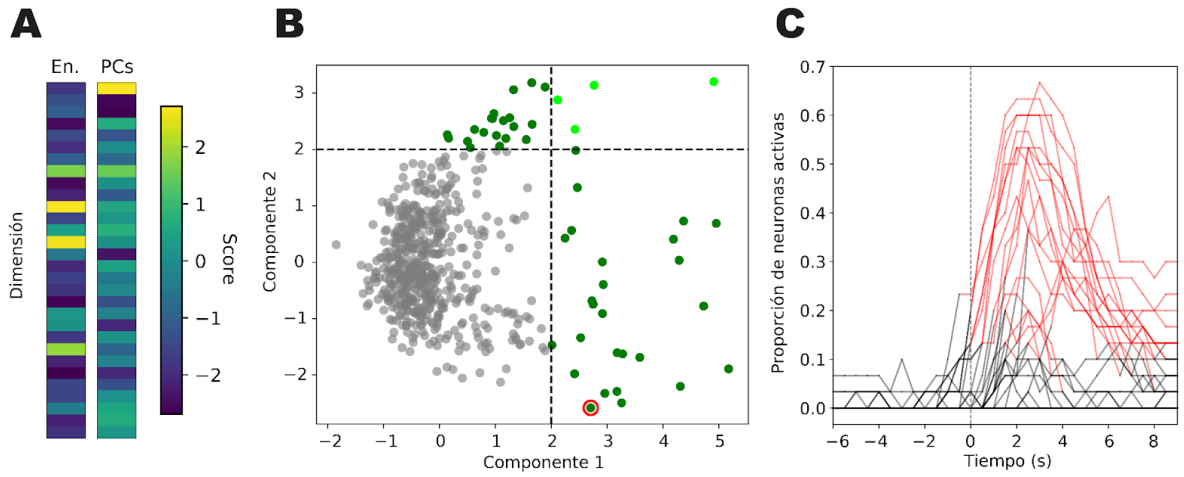


Figura 74. Proceso de identificación de ensambles neuronales en el Tectum. (A) Activación de un ROI elegido al azar de un experimento representativo a través de las distintas dimensiones que describen su patrón de activación. La columna izquierda representa el patrón de activación de este ROI en el espacio original, en donde cada dimensión es un ensayo realizado (En.). La columna de la derecha representa el mismo patrón de activación, pero en el espacio transformado, donde cada dimensión es un componente producido con PCA (PCs). (B) Activación de todos los ROIs de la PVL del mismo experimento para los dos componentes principales arrojados por PCA. Las líneas punteadas marcan el umbral por sobre el cual se considera que un ROI es parte del ensamble correspondiente a ese componente principal. En gris se muestran todos los ROIs que no superan ese umbral. En verde oscuro se muestran los ROIs que superan el umbral para uno de los componentes, y en verde claro los que superan el umbral para ambos componentes, y por lo tanto son parte de ambos ensambles. Se señala en rojo el ROI ejemplificado en A. (C) Proporción de ROIs activos dentro del ensamble correspondiente al primer componente principal del experimento ilustrado en A y B, para todos los ensayos, independientemente del tipo de estimulación utilizado. Se marcan en rojo los puntos temporales en los que la proporción de ROIs activos supera el umbral definido para considerar a ese ensamble activo. La línea vertical punteada marca el tiempo de estimulación.

Una vez definidos estos ensambles potenciales (conjuntos de ROIs asociados a cada CP), procedimos a filtrarlos basándonos en su actividad durante la estimulación. Para cada grupo identificado, calculamos la proporción de sus ROIs constituyentes que estaban activos en cada punto temporal. Esto nos dio curvas de respuesta poblacional para cada ensamble, por cada ensayo. Un ejemplo representativo de la actividad de un ensamble se muestra en la Figura 74C, donde graficamos su curva de respuesta para todos los ensayos realizados durante ese experimento. Como puede verse, este ensamble responde de manera consistente a muchos de los estímulos presentados. Para cuantificar esto de manera sistemática, establecimos un umbral de activación para cada ensamble (2 desvíos estándar por encima del percentil 10 de actividad a través de todo el registro) y clasificamos la respuesta del ensamble en cada ensayo como positiva (curvas rojas) o negativa (curvas negras). Con esta información, excluimos del análisis posterior a todos los ensambles que no respondieron a más de la mitad de los ensayos (al menos 3 de 4 ensayos) de al menos una condición de estimulación. Este paso de filtrado nos permitió asegurar que los ensambles estudiados estuvieran relacionados con nuestra estimulación.

Con el fin de evitar la duplicación de ensambles que pudieran estar representando información similar, implementamos un filtrado adicional para combinar grupos de ROIs cuyos patrones de actividad fueran extremadamente parecidos. Para esto, considerando los momentos en que el ensamble está activo, calculamos un coeficiente de similitud entre cada par de ensambles dentro de un experimento. Este coeficiente compara las secuencias de actividad binarizadas de ambos ensambles en todos los ensayos para cuantificar cuán similares son. En particular, computamos el número de puntos temporales en los que ambos ensambles estuvieron activos a la vez (resultado de una operación lógica de tipo AND entre las secuencias) y el número de puntos temporales en los que al menos uno de los dos grupos estuvo activo (resultado de una operación lógica de tipo OR). El coeficiente de similitud se define como el cociente entre estos dos valores (AND/OR). Un coeficiente de 1 indica que las secuencias de actividad son idénticas (siempre que un grupo está activo, el otro también lo está), mientras que un coeficiente de 0 indica una anti-correlación (los grupos nunca se activan a la vez).

La Figura 75A muestra los coeficientes de similitud para todos los pares de ensambles encontrados en un experimento representativo (la diagonal representa una similitud perfecta entre cada ensamble y sí mismo) mientras que la Figura 75B muestra la distribución de estos coeficientes para todos los pares de ensambles a través de todos los experimentos analizados. Basándonos en esta distribución, establecimos un punto de corte empírico: todos los pares de ensambles cuya similitud supera un valor de 0.4 fueron combinados, uniendo sus ROIs constituyentes.

Para asegurarnos de que los ensambles analizados realmente representaran conjuntos de neuronas funcionalmente distintos, calculamos el porcentaje de superposición entre cada par de ensambles resultantes. Este se definió como el número de ROIs compartidos entre los dos ensambles, dividido por el número total de ROIs incluidos en ambos (la intersección de los conjuntos dividida la unión de los conjuntos). Un valor de 1 indica que los ensambles

contienen exactamente los mismos ROIs, mientras que un valor de 0 significa que no comparten ningún ROI. Un ejemplo de este análisis se muestra en la Figura 75C, donde se grafica el porcentaje de superposición de todos los pares de ensambles de un experimento representativo. La Figura 75D muestra la distribución de estos coeficientes de superposición para todos los pares de ensambles finales, en todos los experimentos. Puede observarse que estos coeficientes son, en general, relativamente bajos, con el 95% de los valores siendo menores que 0.09%.

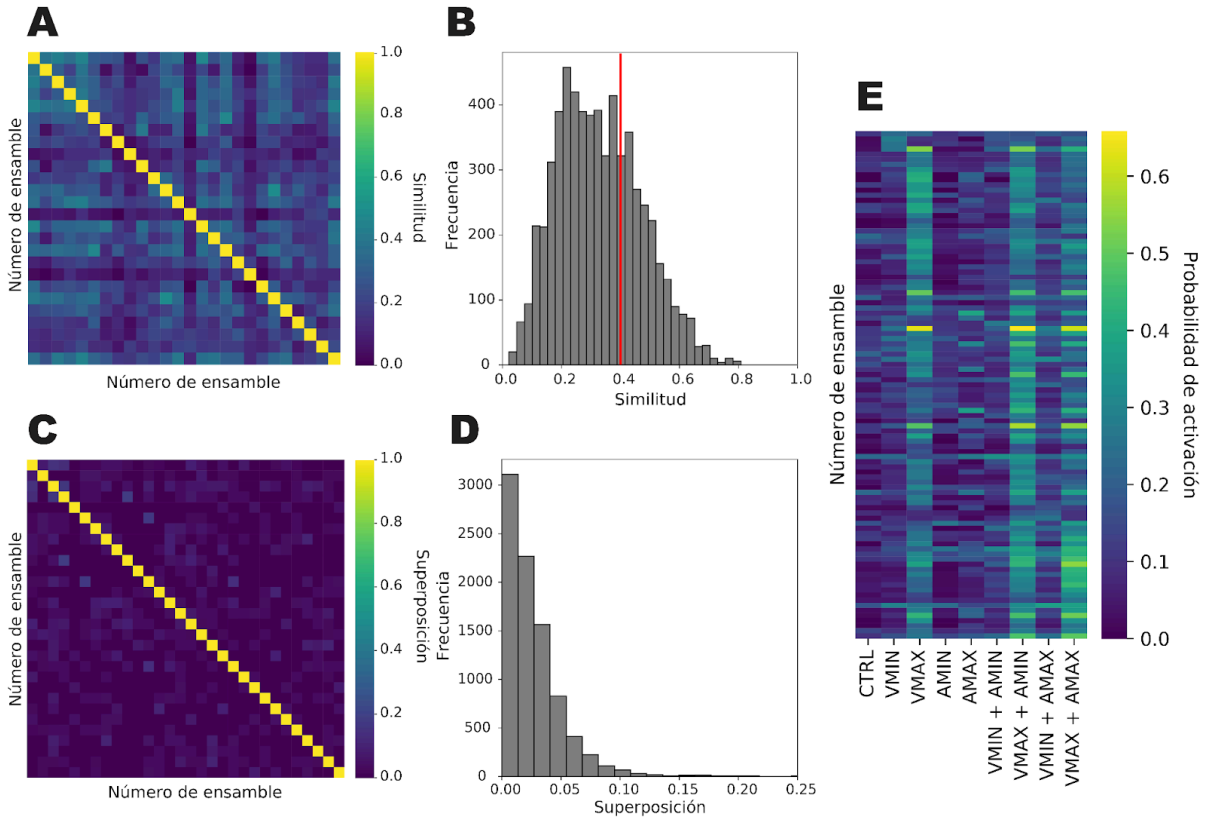


Figura 75. Filtrado de posibles ensambles neuronales. (A) Coeficientes de similitud para cada par de ensambles de un experimento representativo (n_ensambles_potenciales = 26). (B) Coeficientes de similitud para todos los pares de ensambles analizados, a través de todos los experimentos. La línea vertical roja marca el punto de corte por sobre el cual los ensambles con valores de similitud superiores fueron combinados. (C) Coeficientes de superposición para cada par de ensambles de un experimento representativo. (D) Coeficientes de superposición para todos los pares de ensambles analizados, a través de todos los experimentos. (E) Probabilidad de activación de todos los ensambles preservados en la PVL luego del filtrado realizado, para cada una de las condiciones de estimulación.

Aplicamos este proceso de manera independiente para los ROIs de la PVL y para los del neuropilo tectal. El resultado final fue un conjunto de 140 ensambles identificados en la PVL (14 ensambles por experimento en promedio, 172 ROIs por ensamble en promedio) y 210 ensambles en el neuropilo (21 ensambles por experimento en promedio, 29 ROIs por ensamble en promedio), a través de los 10 experimentos analizados.

9.7 Integración multisensorial a nivel de ensambles en el Tectum

Contando con ensambles identificados en la PVL y en el neuropilo, comenzamos cuantificando, para cada ensamble, su consistencia de respuesta a cada uno de los tipos de ensayo (8 condiciones de estimulación y el control). Definimos la consistencia como la cantidad de ensayos (sobre un total de 4 repeticiones por condición) en los que el ensamble respondió positivamente. Consideramos que un ensamble responde en un ensayo si la proporción de sus ROIs que se activan en simultáneo supera 2 desvíos estándar por encima del percentil 10 de actividad durante la ventana de análisis. Este procedimiento nos permitió construir distribuciones de consistencia (número de ensayos activos, de 0 a 4) para cada una de las 9 condiciones, combinando los datos de todos los ensambles identificados en todos los experimentos analizados (N = 10) (Figura 76, paneles superiores).

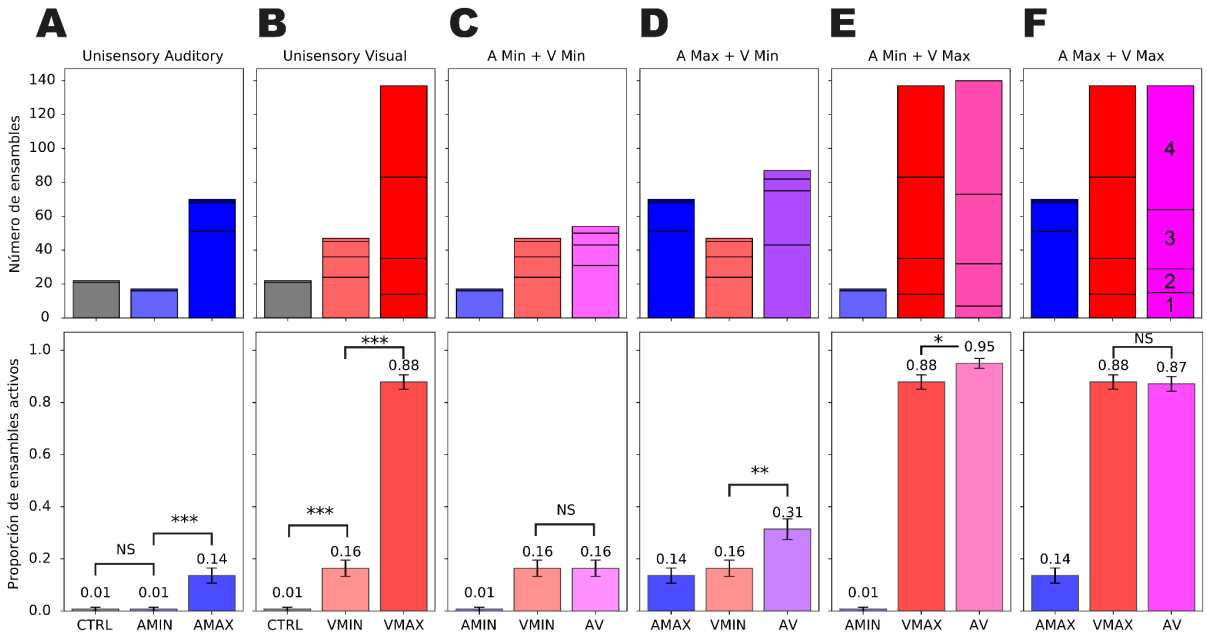


Figura 76. Consistencia de respuesta de ensambles de la PVL a distintas condiciones de estimulación. La fila superior muestra gráficos de barras apiladas, en donde cada pila contiene segmentos cuyas alturas corresponden a la cantidad de ensambles cuya consistencia a esa condición de estimulación es del mismo valor (de 1 a 4, ejemplificados en F, panel superior). Estos segmentos están ordenados en función del número de consistencia al que corresponden, es decir, el segmento base de todas las pilas corresponde a ensambles cuya consistencia a esa condición de estimulación fue 1. La altura total de cada pila indica el número de ensambles que respondieron al menos una vez a esa condición de estimulación. La fila inferior de la figura muestra la proporción de ensambles cuya consistencia es al menos la mitad de los ensayos presentados para cada condición de estimulación (3 o más). Las figuras A y B muestran condiciones unisensoriales auditivas y visuales, respectivamente, mientras que las figuras C-F muestran las cuatro condiciones multisensoriales, con sus unisensoriales correspondientes como referencia.

Para cuantificar estas observaciones, clasificamos un ensamble como positivo para una condición de estimulación si respondió en más de la mitad de los ensayos registrados para esa condición (al menos 3 de los 4 ensayos, Figura 76, paneles inferiores). Dado que esta es la misma definición utilizada para seleccionar los ensambles en la sección anterior, todos los ensambles analizados deben ser positivos para al menos una de las condiciones. Bajo esta

definición, calculamos, para cada uno de los 9 tipos de ensayo, la proporción de ensambles positivos para la PVL.

El estímulo auditivo de menor saliencia no tuvo un efecto significativo sobre la actividad de estos ensambles (Figura 76A, panel inferior, solo el 1% fueron clasificados como positivos al igual que en la condición control, Test Z para dos proporciones, $p = 1.0$). En contraste, el estímulo auditivo de mayor saliencia evocó actividad de alta consistencia en un 14% de los ensambles identificados, significativamente mayor que el auditivo de menor saliencia (Figura 76A, panel inferior, Test Z para dos proporciones, $p < 0.001$). El estímulo visual de menor saliencia tuvo un efecto similar, activando consistentemente un 16% de los ensambles, significativamente más que el control (Figura 76B, panel inferior, Test Z para dos proporciones, $p < 0.001$). Crucialmente, cuando este estímulo visual de baja saliencia se combinó con el máximo auditivo, la proporción de ensambles positivos ascendió al 31%. Esto representa una mejora multisensorial significativa contra el máximo unisensorial (Figura 76D, panel inferior, 31% > 16%, Test Z para dos proporciones, $p = 0.003$). También se observó una mejora multisensorial al combinar el estímulo visual de alta saliencia (Figura 76B, panel inferior, 88% de ensambles positivos) con el auditivo de baja saliencia (Figura 76B, panel inferior, 1%), resultando en un 95% de ensambles positivos en la condición multisensorial (Figura 76E, panel inferior, Test Z para dos proporciones, $p = 0.033$). En cambio, no encontramos mejoras multisensoriales para las otras combinaciones ($V_{Min} + A_{Min}$, Figura 76C, panel inferior, 16% vs 16%, Test Z para dos proporciones, $p = 1.0$; $V_{Max} + A_{Max}$, Figura 76F, panel inferior, 87% vs 88%, Test Z para dos proporciones, $p = 0.85$).

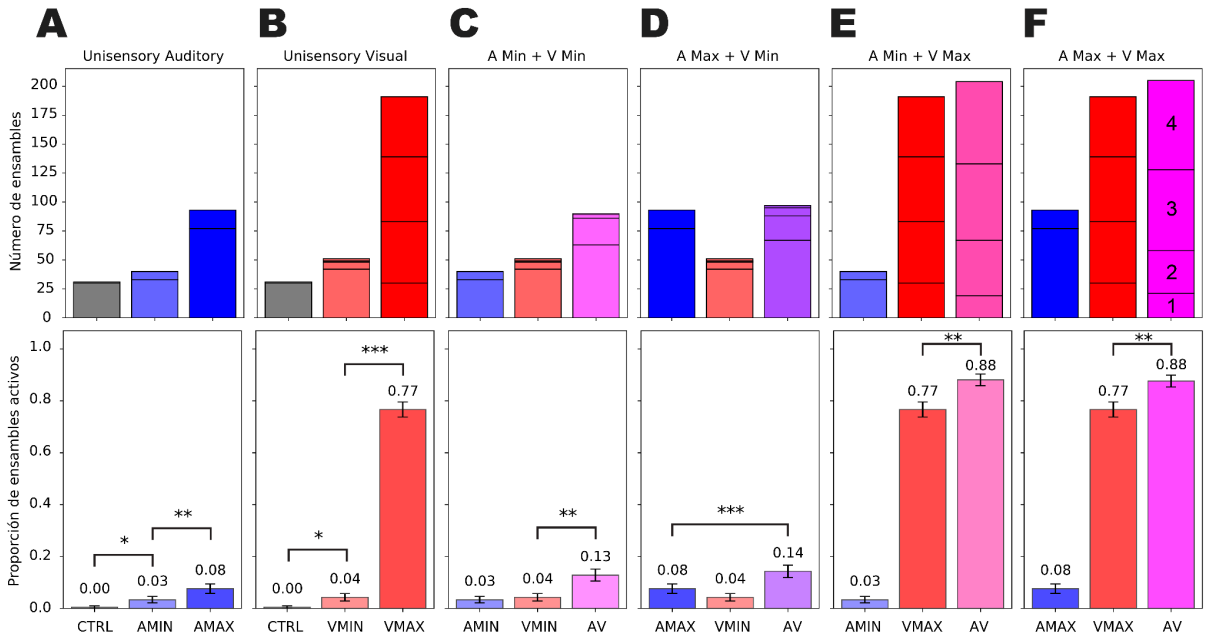


Figura 77. Consistencia de respuesta de ensambles del neuropilo tectal a distintas condiciones de estimulación y a la condición control. Representaciones gráficas análogas a lo explicado en la Figura 76.

A continuación, realizamos los mismos análisis para los ensambles encontrados en el neuropilo tectal (Figura 77). Mientras que en la condición control ningún ensamble fue

clasificado como positivo (Figura 77A y 77B, barras grises, 0%), el estímulo auditivo de menor saliencia sí evocó algo de actividad de alta consistencia en esta región (Figura 77A, 3% de ensambles positivos, Test Z para dos proporciones, p = 0.032). El estímulo visual de menor saliencia tuvo un efecto similar (Figura 77B, 4%, test z para dos proporciones, p = 0.010). Sin embargo, la combinación de estos dos estímulos de baja saliencia resultó en la activación del 13% de los ensambles (Figura 77C). Esto representa una mejora multisensorial (13% > 4%, Test Z para dos proporciones, p = 0.002). Algo similar, aunque en menor medida, sucedió al combinar el estímulo auditivo de mayor saliencia (Figura 77A, 8% de ensambles positivos) con el visual de menor saliencia (Figura 77B, 4%): la condición multisensorial activó al 14% de los ensambles, siendo también una mejora multisensorial (Figura 77D, 14% > 8%, Test Z para dos proporciones, p < 0.001). Finalmente, las dos combinaciones que incluyeron al estímulo visual más intenso (77%) también mostraron mejoras multisensoriales, alcanzando ambas el 88% de ensambles positivos (V_{Max} + A_{Min}, Figura 77E, Test Z para dos proporciones, p = 0.002; V_{Max} + A_{Max}, Figura 77F, Test Z para dos proporciones, p = 0.003). Estos resultados coinciden con una de las conclusiones principales de esta tesis: el Tectum de peces cebra recibe inputs tanto visuales como auditivos y exhibe integración multisensorial en su respuesta.

A continuación, nos preguntamos si las mejoras multisensoriales observadas exhibirían también efectividad inversa, es decir, si serían relativamente mayores para las combinaciones de estímulos de menor saliencia. Para responder esto, calculamos coeficientes de integración (IM) para cada una de las cuatro condiciones multisensoriales, utilizando la proporción de ensambles positivos observada en las condiciones multisensoriales y en las condiciones unisensoriales máximas correspondientes. La Figura 78 muestra estos coeficientes de integración calculados para las 4 condiciones multisensoriales, tanto para los ensambles de la PVL (Figura 78A) como para los del neuropilo tectal (Figura 78B). En la PVL, el patrón de efectividad inversa no resulta claro. Esto podría deberse a que el estímulo auditivo de menor intensidad no tuvo un efecto significativo sobre la activación de ensambles en esta área.

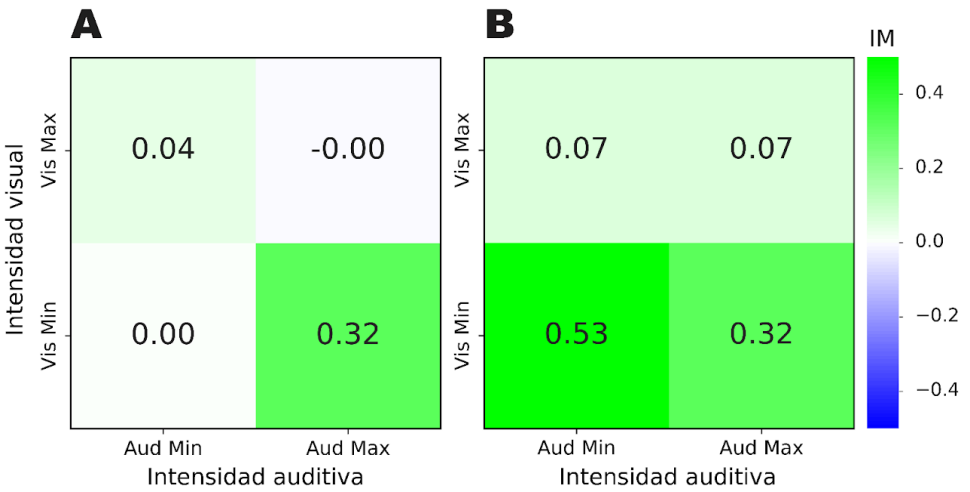


Figura 78. Coeficientes de integración (IM) calculados en base a proporciones de ensambles positivos, para las cuatro condiciones multisensoriales, para ensambles de la PVL (A) y del neuropilo tectal (B).

Los resultados en el neuropilo, en cambio, presentan una relación inversa más clara entre la saliencia máxima unisensorial y la magnitud de la mejora multisensorial. Todas las condiciones multisensoriales muestran una mejora (IM > 0), pero la que destaca es la combinación de los dos estímulos de menor saliencia, cuyo IM es de 0.53. La menor mejora relativa ocurre en las combinaciones que incluyen al estímulo visual de mayor saliencia, con un IM de 0.07. Este patrón de los ensambles neuronales presentes en esta capa del Tectum es consistente con lo esperado para estímulos que se integran siguiendo el principio de efectividad inversa.

9.8 Asociación entre integración tectal y comportamientos evasivos

Habiendo comprobado que existen mejoras multisensoriales en el Tectum en estos experimentos y con estos estímulos, y conociendo en qué ensayos ocurren respuestas comportamentales rápidas a partir del movimiento de la cola liberada, nos preguntamos si existiría una correlación directa entre la magnitud de la integración multisensorial observada en el Tectum y la probabilidad de evocar un intento de escape rápido. Esta pregunta es complementaria a la abordada en el Capítulo 8, donde encontramos una correlación entre la integración tectal y la activación de neuronas asociadas al movimiento en el Rombencéfalo de animales embebidos en agarosa.

Para realizar este análisis, volvimos a tomar a los ROIs como unidad experimental y calculamos la proporción de ROIs activos durante la ventana de estimulación para cada ensayo multisensorial, como hicimos en el Capítulo 8 para la serie experimental IMG-TEC. Luego, computamos la respuesta promedio a través de todos los ensayos de la condición visual y de la condición auditiva, y tomamos el mayor de estos dos valores como el máximo unisensorial. Calculamos el coeficiente de integración (IM) utilizando la respuesta multisensorial de cada ensayo y su máximo unisensorial correspondiente. Este procedimiento nos proporcionó un valor de IM para cada ensayo multisensorial, al igual que hicimos en el Capítulo 8 (Figura 61). Sin embargo, en este caso conocíamos, para cada uno de estos ensayos, si había ocurrido o no una respuesta comportamental rápida, a diferencia de los datos analizados en el capítulo anterior.

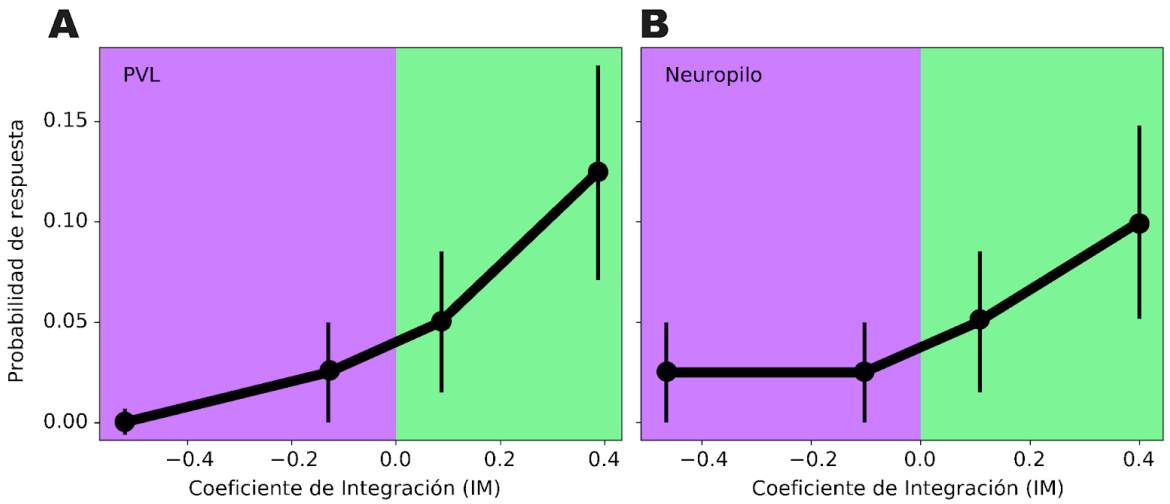


Figura 79. Probabilidad de respuesta comportamental rápida en función del IM calculado en la PVL (A) o en el neuropilo tectal (B), para todos los ensayos multisensoriales realizados a través de todos los experimentos analizados (N = 10). Fondo violeta representa IMs negativos, mientras que fondo verde representa IMs positivos.

Con esta información, evaluamos la relación entre la magnitud de la integración tectal y el comportamiento. Para esto, separamos los ensayos multisensoriales en cuartiles basándonos en su valor de IM. Para cada cuartil, calculamos la probabilidad de observar una respuesta comportamental rápida. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 79, presentando los datos para la PVL (Figura 79A) y para el neuropilo (Figura 79B) por separado. Notablemente, observamos una correlación positiva entre el IM tectal y la probabilidad de que ocurra una respuesta comportamental rápida. Esta relación es significativa tanto para el efecto multisensorial en la PVL (Modelo Lineal Mixto, Probabilidad de Respuesta Rápida ~ IM, Experimento como Efecto Fijo, $p < 0.001$) como para el del neuropilo tectal (Modelo Lineal Mixto, Probabilidad de Respuesta Rápida ~ IM, Experimento como Efecto Fijo, $p = 0.018$). Específicamente, ensayos que mostraron un IM bajo en la PVL (IM < -0.4) nunca mostraron respuestas rápidas. En contraste, ensayos que exhibieron una mejora multisensorial en la PVL (con IMs que llegaban hasta 0.4) presentaron una probabilidad de respuesta comportamental rápida del 12.5%. Un patrón similar se observó al analizar los datos del neuropilo: cuando el IM era particularmente bajo (IM < 0), la probabilidad de respuesta comportamental era también baja (2.5%), pero esta ascendía hasta el 10% para aquellos ensayos que mostraban las mayores mejoras multisensoriales (IM de hasta 0.4).

Si bien las probabilidades de respuesta comportamental encontradas pueden parecer bajas en comparación con los experimentos comportamentales de los Capítulos 3 y 4, es importante recordar que los estímulos presentados no pudieron ser calibrados de manera óptima para maximizar la tasa de respuesta comportamental. También es crucial tener en cuenta que, aunque la cola de las larvas estaba liberada, los animales aún se encontraban parcialmente fijados en agarosa, lo cual probablemente altera su comportamiento natural. Sin embargo, las probabilidades de respuesta rápida detectadas en esta serie experimental (0-7%, ver Figura 71C) son del mismo orden de magnitud que las inferidas en capítulos anteriores a partir de la

detección de eventos motores en animales completamente inmovilizados (1-12%, ver Figura 33B). Esta similitud sugiere que podríamos estar detectando el mismo tipo de respuestas evasivas a nuestros estímulos a través de estos dos métodos de medición aplicados en condiciones experimentales distintas.

Los resultados presentados en esta sección sugieren que la mejora multisensorial que ocurre en el Tectum no solo está asociada a la activación de circuitos pre-motores en el Rombencéfalo, sino que también correlaciona con la ejecución de eventos comportamentales rápidos cuando los peces tienen la capacidad física de moverse.

9.9 Integración multisensorial en otras áreas del cerebro

En estos experimentos fue posible registrar la actividad de extensas porciones del cerebro de las larvas de pez cebra. Decidimos aprovechar esta oportunidad para preguntarnos si la mejora multisensorial en respuesta a nuestros estímulos audiovisuales aversivos era un fenómeno exclusivo del Tectum o si también ocurría en otras áreas cerebrales. Para investigar esto, utilizamos la alineación previamente realizada de los volúmenes cerebrales con el atlas estándar de ZBrain. Este atlas contiene etiquetas anatómicas para numerosas regiones cerebrales, lo cual nos permitió asignar cada ROI registrado a una región específica identificada en el atlas.

A continuación, procedimos a cuantificar la integración multisensorial en cada región. Para cada experimento, y para cada una de las regiones cerebrales en las que se registraron ROIs, computamos el IM para cada una de las condiciones multisensoriales presentadas, de manera similar a la descrita con anterioridad para el análisis poblacional. Calculamos la proporción de ROIs activos dentro de esa región para cada estímulo, promediando la actividad a través de todos los ensayos correspondientes a esa condición. Luego, para cada estímulo multisensorial, calculamos su IM comparando su proporción de ROIs activos con la máxima proporción observada entre sus componentes unisensoriales correspondientes. Promediando resultados entre todos los animales, este procedimiento arrojó 4 valores de IM por cada región cerebral analizada.

Los resultados de este análisis se resumen en la Figura 80, donde se muestran las regiones cerebrales ordenadas en orden decreciente según su IM promedio. Solo se incluyen las 6 regiones que mostraron las mayores mejoras multisensoriales (de un total de 63 regiones identificadas y analizadas). Notablemente, las dos regiones que han sido el foco de esta tesis, el neuropilo tectal y la PVL del Tectum, se encuentran entre las regiones con mayor índice de integración multisensorial promedio en todo el cerebro, ocupando el puesto número 2 y número 4, respectivamente, en esta lista. Esto pone en evidencia la relevancia del Tectum como un centro clave para la integración multisensorial en respuesta a estos estímulos, validando el enfoque que hemos tomado sobre esta estructura.

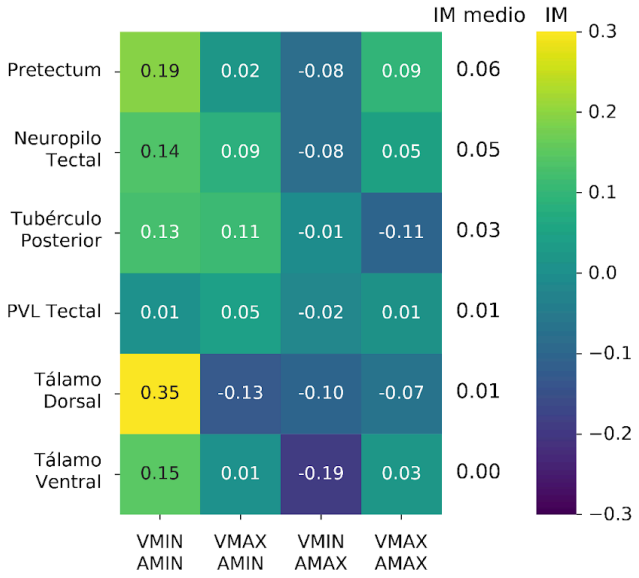


Figura 80. Coeficiente de integración (IM) promedio para cada condición multisensorial, para las 6 regiones del cerebro cuyo IM medio fue más positivo a través de todos los experimentos analizados. Las regiones están ordenadas en orden decreciente de IM medio. Los números dentro de cada celda indican el IM promedio para esa región y esa condición multisensorial.

Por otro lado, este análisis revela la existencia de otras regiones cerebrales que parecen jugar un rol relevante en la integración de estas señales sensoriales. En particular, el Pretectum, una región del diencéfalo conocida por recibir información sensorial y participar activamente en el procesamiento visual (Gamlin, 2006), emerge como la estructura con la mayor mejora multisensorial promedio en todo el cerebro bajo nuestras condiciones experimentales. Además, el Tubérculo Posterior, otra estructura diencefálica implicada en la modulación dopaminérgica y el control motor (Tay et al., 2011), también presenta mejoras multisensoriales importantes, superando incluso a las observadas en la PVL tectal. Finalmente, las dos regiones principales del Tálamo (Tálamo Dorsal y Tálamo Ventral) también muestran evidencia de mejora multisensorial, como se ha demostrado en estudios previos (Komura et al., 2005; Wijesinghe et al., 2015).

CAPÍTULO 10: DISCUSIÓN

10.1 Desarrollo de técnicas experimentales y herramientas de análisis

Una de las contribuciones principales de esta tesis fue el desarrollo y la puesta a punto de nuevos procesos y herramientas de análisis, así como la optimización de *set-ups* experimentales y protocolos de estimulación. Estas contribuciones poseen un valor intrínseco para futuras investigaciones enfocadas en el comportamiento y la actividad neuronal de larvas de pez cebra, tanto dentro de nuestro grupo de investigación como potencialmente en otros laboratorios con líneas de trabajo afines.

En primer lugar, se estableció un paradigma experimental para el estudio del comportamiento multisensorial en larvas de pez cebra en condiciones de nado libre. Esto incluyó la selección de dispositivos de estimulación (una pantalla OLED y un parlante externo al agua) y el diseño de los estímulos, lo cual implicó el desarrollo de código para generar *loomings* con contrastes y dinámicas temporales determinadas, así como pulsos de sonido con frecuencias y amplitudes definidas. Además, se implementaron procesos para asegurar la coordinación temporal precisa de estos estímulos, utilizando una placa Arduino para el control sincronizado de la pantalla y el parlante. Este desarrollo requirió una fase de calibración para seleccionar los parámetros de los estímulos que evocaran de manera consistente las respuestas evasivas deseadas. Además, la creación de este paradigma comportamental involucró el entrenamiento y la validación de un modelo de aprendizaje automático capaz de estimar la pose de los animales con alta precisión a partir de los videos registrados.

Paralelamente, se generaron herramientas de análisis computacional para la interpretación cuantitativa de los datos producidos mediante este paradigma experimental. Se profundizó en la representación matemática del efecto de integración multisensorial en diversos contextos de respuesta. Se diseñó e implementó un programa de procesamiento de datos que permitió identificar de forma automática comportamientos rápidos en los videos registrados y clasificarlos según sus características cinéticas. Asimismo, se desarrollaron modelos estadísticos para estudiar las probabilidades de respuesta de escape y los coeficientes de integración multisensorial. Es relevante destacar que todo el código desarrollado para este análisis es de código abierto, se encuentra disponible públicamente en un repositorio de Github (https://github.com/labo-spin) y, por lo tanto, puede ser reutilizado y adaptado por otros investigadores que lo necesiten.

A su vez, se estableció un paradigma para el registro de actividad neuronal *in vivo* durante la presentación de estimulación multisensorial. Esto incluyó la optimización del procedimiento de montado de las larvas en agarosa, la adaptación y puesta a punto de los estímulos para su presentación en el entorno del microscopio confocal, el estudio de las condiciones de adquisición ofrecidas por este microscopio, y la selección de los parámetros de adquisición necesarios para obtener un equilibrio óptimo entre resolución espacial, temporal y relación señal-ruido. También se desarrolló un sistema basado en pulsos TTL para sincronizar de manera precisa el inicio del registro de imágenes con el comienzo de la secuencia de estimulación. Este conocimiento técnico acumulado ha sido transferido a nuevos integrantes

del laboratorio, quienes actualmente utilizan paradigmas similares para abordar otras preguntas biológicas.

Finalmente, se desarrolló un amplio abanico de herramientas de análisis para el procesamiento e interpretación de los registros de actividad neuronal obtenidos. Se creó un *pipeline* de análisis que automatiza parcialmente el procesamiento de los registros, realiza la corrección de movimiento, segmenta las imágenes en áreas cerebrales relevantes y en regiones de interés individuales (ROIs), extrae la señal de fluorescencia cruda de cada ROI, la normaliza calculando el ΔF/F, y la binariza para determinar el estado de actividad de cada ROI en cada fotograma. Se logró implementar un procedimiento para alinear los volúmenes cerebrales capturados con un atlas cerebral de referencia (ZBrain). Se exploraron diversas estrategias para representar la actividad neuronal, estudiando la actividad poblacional de regiones neuronales, clasificando neuronas según su patrón de activación frente a la estimulación e identificando ensambles neuronales. Además, se implementaron y adaptaron técnicas de reducción de dimensionalidad para analizar la dinámica de las representaciones poblacionales en un espacio de baja dimensión a lo largo del tiempo.

La producción y documentación del hardware y el software asociados a los desarrollos metodológicos de esta tesis, por lo tanto, constituyen un resultado valioso en sí mismo, independientemente de las conclusiones biológicas alcanzadas, y sientan bases técnicas sólidas para futuras investigaciones en el área.

10.2 Efectos de la integración multisensorial sobre la respuesta de escape

Uno de los hallazgos centrales de este trabajo es que la integración de estímulos visuales de tipo *looming* y estímulos auditivos abruptos produce mejoras multisensoriales sobre la probabilidad de respuesta de escape en larvas de pez cebra. Si bien era conocido previamente que las larvas responden a estos dos tipos de estímulo por separado (Bhandiwad et al., 2013; Bhattacharyya et al., 2017; Dunn et al., 2016; Heap et al., 2018; Kimmel et al., 1974; Kohashi et al., 2012; Temizer et al., 2015), el efecto comportamental de su presentación combinada no había sido estudiado hasta ahora en esta especie. En nuestros experimentos, encontramos evidencia de mejora multisensorial en la probabilidad de escape, tanto en nuestros experimentos principales con larvas de 4 a 7 dpf (Figura 25) como en experimentos preliminares con larvas de 10 a 18 dpf (Figura 24).

También estudiamos si la integración multisensorial juega un rol en la selección del tipo de comportamiento evasivo ejecutado, específicamente en la selección del tipo de C-start, SLC o LLC. Si bien estos dos tipos de escape son conocidos y están bien caracterizados en la bibliografía (Burgess & Granato, 2007; Eaton et al., 2001; Troconis et al., 2017), su modulación frente a estímulos multisensoriales no había sido explorada previamente. Nuestros resultados muestran que las combinaciones de estímulos donde el componente auditivo es más saliente tienden a evocar preferentemente respuestas de tipo SLC, mientras que cuando el componente visual es más saliente, los animales tienden a ejecutar LLC con

mayor probabilidad (Figura 28). Curiosamente, esta relación entre la saliencia relativa y la selección comportamental no parece ser gradual, sino que se comporta de manera binaria o discontinua: una vez que la saliencia efectiva del estímulo auditivo supera a la del visual, la preferencia por ejecutar SLC alcanza un nivel máximo y constante. Más allá de estas observaciones, no encontramos una modulación particular asociada a los estímulos multisensoriales.

Es importante remarcar que nuestros estímulos no solo difieren en su modalidad sensorial y su saliencia, sino también en su dinámica temporal. El estímulo visual de tipo *looming* que utilizamos es lento y gradual (l/v = 1.0 s), mientras que el estímulo auditivo es abrupto e instantáneo. Estudios previos han demostrado que la dinámica temporal del *looming* puede influir en la selección del tipo de escape: *loomings* lentos tienden a evocar preferencialmente LLCs, mientras que *loomings* más rápidos evocan preferencialmente SLCs (Bhattacharyya et al., 2017). En este sentido, es posible que la diferencia observada en la preferencia comportamental asociada a nuestros estímulos no se deba a su modalidad, sino que esté influenciada por su dinámica temporal. Una interpretación posible, bajo esta perspectiva, es que un estímulo más rápido comunica una amenaza más inminente o urgente, evocando respuestas explosivas como el SLC, mientras que un estímulo más lento señala una amenaza menos inmediata, permitiendo la ejecución de respuestas de escape menos estereotipadas y que ofrecen mayor flexibilidad comportamental, como el LLC.

Nuestro estudio permite investigar qué sucede cuando el sistema nervioso integra dos señales de peligro que difieren en su nivel de urgencia percibida. En el proceso de toma de decisiones, el animal parece priorizar la respuesta asociada a la señal más urgente: siempre que la señal que representa la amenaza más inmediata es más saliente que la señal más lenta, el animal opta por ejecutar una respuesta comportamental cuya rapidez es coherente con esa urgencia.

10.3 Codificación auditiva en el Tectum

Uno de los aportes fundamentales de esta tesis es la demostración taxativa de que el Tectum de larvas de pez cebra recibe y procesa estímulos auditivos. Si bien estudios previos en otras especies de vertebrados han reportado la existencia de neuronas sensibles a estímulos auditivos dentro del Tectum (Hiramoto & Cline, 2009; Knudsen, 1982), y algunos trabajos han encontrado indicios de su presencia en peces cebra (Thompson et al., 2016; Vanwalleghem et al., 2017), la respuesta del Tectum frente a estímulos auditivos de peligro como los utilizados en esta tesis no ha sido caracterizada previamente.

Aquí demostramos que estas respuestas ocurren de manera robusta y detectable en la PVL (Figura 36) y en el neuropilo tectal (Figura 39). Si bien existen neuronas en ambas capas tectales que responden a estímulos auditivos en más de la mitad de los ensayos, la consistencia de las respuestas tectales frente a una misma señal auditiva tiende a ser baja (Figura 76A y 77A). Además, demostramos que la respuesta tectal auditiva exhibe

sensibilidad a la intensidad del estímulo: sonidos de mayor amplitud evocan respuestas más consistentes a nivel de ensambles (Figura 77A).

Estos hallazgos son de gran importancia para el campo, ya que desafían la visión tradicional del Tectum como una estructura únicamente visual en peces cebra, demostrando que el Tectum recibe, procesa y representa información proveniente de otras modalidades sensoriales, como la auditiva, sentando las bases para reconsiderar su rol funcional en el contexto de la percepción.

10.4 Integración multisensorial en el Tectum

El objetivo central de esta tesis fue investigar la existencia y las características de la integración multisensorial en el Tectum de larvas de pez cebra. Encontramos que la extensión de la respuesta neuronal del Tectum a nuestros estímulos era mayor cuando las modalidades visual y auditiva se presentaban en conjunto (Figura 46). También hallamos evidencia de integración a nivel de neuronas individuales: encontramos que la intensidad de la respuesta de las mismas neuronas crece frente a estímulos multisensoriales (Figura 48) e identificamos neuronas sensibles a estímulos auditivos y visuales que responden de manera más consistente a los estímulos multisensoriales que a sus componentes unisensoriales (Figura 56). Además, identificamos ensambles neuronales cuya consistencia de respuesta es mayor frente a la estimulación multisensorial (Figura 78). Estos resultados demuestran que las neuronas tectales están recibiendo e integrando señales convergentes de ambas modalidades sensoriales. Es importante destacar que estos fenómenos se observaron a través de distintos paradigmas experimentales (animales inmovilizados y con cola libre) y utilizando diferentes dispositivos de estimulación.

Una consideración relevante al interpretar las distintas clases de neuronas tectales identificadas (visuales, auditivas, audiovisuales y exclusivamente multisensoriales, ver Figura 55) es que estas categorías no necesariamente representan tipos neuronales distintos. Por ejemplo, cuando hablamos de neuronas exclusivamente multisensoriales, no estamos afirmando que estas sean cualitativamente diferentes de las neuronas audiovisuales. Dado que los estímulos visuales son codificados por el Tectum de manera retinotópica (Baier & Scott, 2024), y que existe evidencia en otras especies (como en la lechuza común, Knudsen, 1982) de una organización similar para los estímulos auditivos, no podemos descartar que muchas de las neuronas tectales sean equivalentes en su capacidad de integración, y que las diferencias observadas en sus respuestas se deban principalmente a la naturaleza y la localización de nuestros estímulos. Sin embargo, tampoco podemos descartar que exista algún grado de especialización funcional dentro de esta población neuronal. Para decidir entre estas opciones, sería necesario llevar a cabo estudios futuros en los que se varíen sistemáticamente las propiedades de los estímulos (por ejemplo, su posición espacial) mientras se registra la actividad de las mismas neuronas a través de estas condiciones cambiantes. También podrían realizarse estudios en los que se marquen neuronas que reciban información desde el oído y ver si proyectan a capas específicas del Tectum. Con los datos

presentados en esta tesis, no es posible definir cuál de estas dos interpretaciones (u otras alternativas) es la correcta.

Hasta donde sabemos, existe solo un estudio previo que exploró la integración de estímulos audiovisuales en el Tectum de larvas de pez cebra (Thompson et al., 2016). Curiosamente, los resultados de dicho estudio contrastan marcadamente con los nuestros. Thompson y colaboradores no encontraron evidencia de mejoras multisensoriales significativas en esta estructura. Al contrario, reportaron que solo un porcentaje muy bajo (aproximadamente el 1%) de las neuronas tectales identificadas respondían a ambas modalidades y que, en ellas, el efecto observado era de supresión multisensorial. Es decir, la respuesta a la combinación de estímulos era menor que la respuesta al componente unisensorial más efectivo.

Esta discrepancia con nuestros hallazgos, que muestran consistentemente mejoras multisensoriales, es notable y requiere una interpretación cuidadosa. Por un lado, es importante remarcar que nuestro análisis descartó alrededor de dos tercios de los experimentos en los que no encontramos una clara señal auditiva, por lo que nuestros datos están enriquecidos en animales cuyo Tectum respondió claramente al estímulo auditivo, y esto podría ayudarnos a detectar efectos multisensoriales más sutiles. Por otro lado, una diferencia fundamental entre ambos estudios tiene que ver con los estímulos utilizados. Mientras que nosotros empleamos estímulos con una clara valencia aversiva para el animal (un *looming* visual que simula un depredador acercándose y un sonido abrupto que puede indicar peligro), Thompson y colaboradores utilizaron estímulos que parecieran carecer de valencia biológica, ya sea positiva o negativa. En particular, usaron un tono puro de larga duración como estímulo auditivo, y estímulos visuales como barras o una mancha en movimiento y un flash de luz. Es decir, una particularidad de nuestro estudio es la presentación de estímulos que señalan peligro y son altamente significativos para la supervivencia del animal.

Se conoce por estudios previos que el Tectum juega un rol importante en la clasificación de estímulos visuales según su relevancia biológica, por ejemplo, diferenciando entre objetos de gran tamaño (potencialmente amenazantes) y objetos de pequeño tamaño (potencialmente presas) (Preuss et al., 2014), y que la salida neuronal resultante puede determinar si el animal realiza una respuesta de escape o de aproximación (Del Bene et al., 2010). Por lo tanto, es razonable hipotetizar que las funciones del Tectum, incluyendo los mecanismos de integración multisensorial, podrían variar dependiendo de la valencia de los estímulos procesados. En particular, podría suceder que esta estructura exhiba preferentemente mejoras multisensoriales solo cuando los estímulos integrados tienen una alta valencia, como en nuestro caso. Esta hipótesis podría explicar las diferencias observadas entre los resultados de Thompson et al. y los nuestros. Sin embargo, no podemos descartar que la discrepancia se deba a diferencias en la saliencia lograda por los estímulos utilizados. Si los estímulos unisensoriales empleados por Thompson fueran de muy baja saliencia, esto podría limitar la observación de respuestas y de efectos de integración, independientemente de su valencia.

Además de encontrar mejoras multisensoriales a varios niveles de organización, observamos que la magnitud de estas mejoras está inversamente relacionada con la saliencia de los componentes unisensoriales, siguiendo el principio de efectividad inversa. Tanto en la PVL (Figuras 51 y 52) como en el neuropilo (Figuras 53 y 54), las combinaciones multisensoriales que incluían el estímulo visual de menor saliencia mostraron, en promedio, coeficientes de integración mayores que aquellas combinaciones que utilizaban el estímulo visual de mayor saliencia. De manera similar, el hemitectum ipsilateral, que recibe una señal visual indirecta y, por lo tanto, de menor saliencia efectiva, también evidenció mejoras multisensoriales mayores que el hemitectum contralateral (Figuras 51 y 53).

En los experimentos con larvas con cola liberada, la efectividad inversa fue especialmente evidente en el neuropilo, donde la combinación de estímulos visuales y auditivos de baja saliencia produjo una mejora multisensorial (Figura 78). Este efecto, sin embargo, fue menos evidente en la PVL. Para interpretar este resultado, es importante notar que el fenómeno de efectividad inversa no puede ser una relación monotónica que se extienda indefinidamente a medida que la saliencia disminuye. Si uno de los componentes unisensoriales se vuelve tan débil que no causa ningún efecto sobre la estructura neuronal estudiada, no sería esperable observar una mejora al combinarlo con otro estímulo. Es posible que este haya sido el caso de nuestro estímulo auditivo de baja saliencia en la PVL en estos experimentos, y que por esta razón no hayamos observado una relación inversa entre la mejora multisensorial y la intensidad auditiva.

Finalmente, es interesante remarcar una observación recurrente en muchos de los resultados presentados en esta tesis: el neuropilo tectal pareciera mostrar, en general, efectos de integración multisensorial más pronunciados que la PVL. Esto se manifestó al medir la respuesta poblacional y al estudiar la consistencia de respuesta de los ensambles neuronales identificados (Figuras 76 y 77). Además, en la mayoría de los casos, el neuropilo mostró una relación de efectividad inversa más marcada y consistente que la observada en la PVL (Figura 54 vs Figura 52, y Figura 78). Estas observaciones llevan a pensar que el neuropilo tectal podría tener un rol predominante en la integración multisensorial audiovisual en comparación con la PVL, lo cual es apoyado por el hecho de que el neuropilo es la zona de recepción de aferencias sensoriales en el Tectum, tanto de la retina como de otras modalidades sensoriales (Baier & Scott, 2024), por lo que podría ser el primer lugar en el que estas señales son integradas. Por otro lado, debido a que en nuestros experimentos realizados en el microscopio confocal el sensor de calcio se expresa en el citoplasma, y la integración sensorial dendrítica de las neuronas cuyos somas se encuentran en la PVL podría tener lugar en el neuropilo, no podemos descartar que el efecto observado en el neuropilo en estos experimentos corresponda principalmente a estas mismas neuronas.

10.5 Una asociación entre la integración tectal y el comportamiento

Un aspecto crucial de esta tesis fue investigar la posible relación funcional entre la integración multisensorial tectal y la ejecución de comportamientos evasivos. Nuestros

experimentos demuestran que existe una asociación entre ambos procesos. En primer lugar, demostramos que una mayor mejora multisensorial poblacional en la PVL correlaciona positivamente con una mayor actividad en el Rombencéfalo (Figura 61), específicamente en un subconjunto de neuronas asociadas al movimiento (Figura 62), que posiblemente incluyan neuronas pre-motoras. En segundo lugar, demostramos que una mayor mejora multisensorial, tanto a nivel de la PVL como del neuropilo, se asocia con una mayor probabilidad de ejecución de eventos motores rápidos en experimentos donde las larvas tenían la cola liberada (Figura 79). Crucialmente, estos estímulos que ocasionan las mejoras multisensoriales observadas en el Tectum también generan mejoras multisensoriales en la probabilidad de respuesta de escape en animales evaluados en condiciones de nado libre (Figura 27).

Estos resultados, por sí solos, establecen asociaciones entre la actividad tectal y el comportamiento, pero no demuestran una relación causal. Sin embargo, si interpretamos estas asociaciones sabiendo que el Tectum proyecta directamente a regiones pre-motoras del tronco encefálico (Baier & Scott, 2024; Del Bene et al., 2010) y juega un rol crucial en la iniciación de respuestas de escape, como los C-starts (Bhattacharyya et al., 2017; Eaton et al., 2001), es razonable postular la existencia de una contribución relevante.

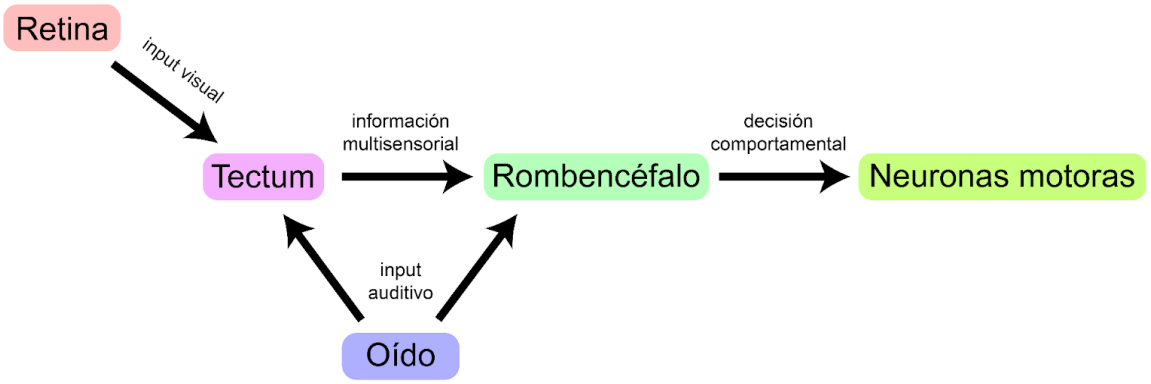


Figura 81. Esquema de un modelo funcional hipotético de procesamiento multisensorial para la generación de patrones motores.

Es posible proponer un modelo funcional hipotético en el que el Tectum se posiciona como un nodo clave en el circuito neuronal que subyace a la toma de decisiones evasivas en respuesta a estímulos multisensoriales de peligro (Figura 81). Según este modelo, el Tectum recibiría e integraría señales sensoriales visuales, auditivas y de otras modalidades (Kardamakis et al., 2016; Thompson et al., 2016; Vanwalleghem et al., 2017), computando una mejora o supresión multisensorial, cuya magnitud reflejaría las propiedades de los estímulos (su saliencia, su valencia, su coordinación). Esta señal sería transmitida desde el Tectum a neuronas premotoras ubicadas en el Rombencéfalo, que integrarían esta información con otras aferencias relevantes. Por ejemplo, se sabe que neuronas premotoras, como la célula Mauthner, reciben señales directas de la vía auditiva (Furshpan & Furukawa, 1962; Medan & Preuss, 2014; Szabo et al., 2006). Estas neuronas serían las encargadas de tomar la decisión final sobre si ejecutar o no un comportamiento de escape y, potencialmente,

qué tipo de escape realizar. Si bien estás neuronas de decisión suelen ser integradoras multisensoriales en sí mismas (Canfield, 2003; Kimmel et al., 1974; Kohashi et al., 2012; Otero-Coronel et al., 2024), recibir información ya integrada río arriba podría ser relevante en la modulación de su respuesta. En este escenario, si la mejora multisensorial computada en el Tectum es alta, la actividad resultante en las neuronas premotoras del Rombencéfalo sería mayor, lo cual podría incrementar la probabilidad de que se desencadene una respuesta de escape y en última instancia desambiguar situaciones críticas.

BIBLIOGRAFÍA

Ahrens, M. B., Orger, M. B., Robson, D. N., Li, J. M., & Keller, P. J. (2013). Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. Nature Methods, 10(5), 413–420. https://doi.org/10.1038/nmeth.2434

Allman, B. L., & Meredith, M. A. (2007). Multisensory Processing in “Unimodal” Neurons: Cross-Modal Subthreshold Auditory Effects in Cat Extrastriate Visual Cortex. Journal of Neurophysiology, 98(1), 545–549. https://doi.org/10.1152/jn.00173.2007

Baier, H., & Scott, E. K. (2024). The Visual Systems of Zebrafish. *Annual Review of Neuroscience*, *47*(1), 255–276. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-111020-104854

Bever, M. M., & Fekete, D. M. (2002). Atlas of the developing inner ear in zebrafish. Developmental Dynamics, 223(4), 536–543. https://doi.org/10.1002/dvdy.10062

Bhandiwad, A. A., Zeddies, D. G., Raible, D. W., Rubel, E. W., & Sisneros, J. A. (2013). Auditory sensitivity of larval zebrafish (Danio rerio) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *Journal of Experimental Biology*, *216*(18), 3504–3513. https://doi.org/10.1242/jeb.087635

Bhattacharyya, K., McLean, D. L., & MacIver, M. A. (2017). Visual Threat Assessment and Reticulospinal Encoding of Calibrated Responses in Larval Zebrafish. *Current Biology*, *27*(18), 2751-2762.e6. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.012

Bilotta, J., & Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. International Journal of Developmental Neuroscience, 19(7), 621–629. https://doi.org/10.1016/S0736-5748(01)00050-8

Budick, S. A., & O’Malley, D. M. (2000). Locomotor repertoire of the larval zebrafish: Swimming, turning and prey capture. The Journal of Experimental Biology, 203(Pt 17), 2565–2579. https://doi.org/10.1242/jeb.203.17.2565

Bullock, T. H. (1984). Comparative Neuroethology of Startle, Rapid Escape, and Giant Fiber-Mediated Responses. In R. C. Eaton (Ed.), Neural Mechanisms of Startle Behavior (pp. 1–13). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2286-1_1

Burgess, H. A., & Granato, M. (2007). Sensorimotor Gating in Larval Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, *27*(18), 4984–4994. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0615-07.2007

Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5679), 1926–1929. https://doi.org/10.1126/science.1099745

Canfield, J. G. (2003). Temporal Constraints on Visually Directed C-Start Responses: Behavioral and Physiological Correlates. *Brain, Behavior and Evolution*, *61*(3), 148–158. https://doi.org/10.1159/000069751

Cervi, A. L., Poling, K. R., & Higgs, D. M. (2012). Behavioral Measure of Frequency Detection and Discrimination

in the Zebrafish, Danio rerio. Zebrafish, 9(1), 1–7. https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0720

Chen, F., Wang, X., Zhao, Y., Lv, S., & Niu, X. (2022). Visual object tracking: A survey. Computer Vision and Image Understanding, 222, 103508. https://doi.org/10.1016/j.cviu.2022.103508

Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. Nature, 499(7458), 295–300. https://doi.org/10.1038/nature12354

Cherry, E. C. (1953). Some Experiments on the Recognition of Speech, with One and with Two Ears. The Journal of the Acoustical Society of America, 25(5), 975–979. https://doi.org/10.1121/1.1907229

Choi, T.-Y., Choi, T.-I., Lee, Y.-R., Choe, S.-K., & Kim, C.-H. (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. Experimental & Molecular Medicine, 53(3), 310–317. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5

Davis, M. (1984). The Mammalian Startle Response. In R. C. Eaton (Ed.), Neural Mechanisms of Startle Behavior (pp. 287–351). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2286-1_10

de Vries, S. E. J., & Clandinin, T. R. (2012). Loom sensitive neurons link computation to action in the Drosophila visual system. Current Biology, 22(5), 353–362. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.007

Deeg, K. E., Sears, I. B., & Aizenman, C. D. (2009). Development of Multisensory Convergence in the Xenopus Optic Tectum. Journal of Neurophysiology, 102(6), 3392–3404. https://doi.org/10.1152/jn.00632.2009

Del Bene, F., Wyart, C., Robles, E., Tran, A., Looger, L., Scott, E. K., Isacoff, E. Y., & Baier, H. (2010). Filtering of Visual Information in the Tectum by an Identified Neural Circuit. *Science*, *330*(6004), 669–673. https://doi.org/10.1126/science.1192949

Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P., & Dobrucki, J. (2006). Photobleaching. In J. B. Pawley (Ed.), *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (pp. 690–702). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_39

Dill, L. M. (1974). The escape response of the zebra danio (Brachydanio rerio) I. The stimulus for escape. Animal Behaviour, 22(3), 711–722. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(74)80022-9

Domenici, P. (2002). The Visually Mediated Escape Response in Fish: Predicting Prey Responsiveness and the Locomotor Behaviour of Predators and Prey. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 35(1–2), 87–110. https://doi.org/10.1080/10236240290025635

Dunn, T. W., Gebhardt, C., Naumann, E. A., Riegler, C., Ahrens, M. B., Engert, F., & Del Bene, F. (2016). Neural Circuits Underlying Visually Evoked Escapes in Larval Zebrafish. *Neuron*, *89*(3), 613–628. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.021

Eaton, R. C., Bombardieri, R. A., & Meyer, D. L. (1977). The mauthner-initiated startle response in teleost fish. Journal of Experimental Biology, 66(1), 65–81. https://doi.org/10.1242/jeb.66.1.65

Eaton, R. C., & Emberley, D. S. (1991). How stimulus direction determines the trajectory of the Mauthner-initiated

escape response in a teleost fish. The Journal of Experimental Biology, 161, 469–487. https://doi.org/10.1242/jeb.161.1.469

Eaton, R. C., Lee, R. K. K., & Foreman, M. B. (2001). The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Progress in Neurobiology*, *63*(4), 467–485. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00047-2

Eaton, R. C., Nissanov, J., & Wieland, C. M. (1984). Differential activation of Mauthner and non-Mauthner startle circuits in the zebrafish: Implications for functional substitution. Journal of Comparative Physiology A, 155(6), 813–820. https://doi.org/10.1007/BF00611598

Edmunds, M. (with Internet Archive). (1974). Defence in animals: A survey of anti-predator defences. Burnt Mill [Eng.] : Longman. http://archive.org/details/defenceinanimals0000edmu_d9u6

Edwards, D. (2017). Crayfish Escape. In Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience. https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.158

Eilam, D. (2005). Die hard: A blend of freezing and fleeing as a dynamic defense—implications for the control of defensive behavior. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 29(8), 1181–1191. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.027

Evans, D. A., Stempel, A. V., Vale, R., & Branco, T. (2019). Cognitive Control of Escape Behaviour. Trends in Cognitive Sciences, 23(4), 334–348. https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.01.012

Filosa, A., Barker, A. J., Dal Maschio, M., & Baier, H. (2016). Feeding State Modulates Behavioral Choice and Processing of Prey Stimuli in the Zebrafish Tectum. Neuron, 90(3), 596–608. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.014

Furshpan, E. J., & Furukawa, T. (1962). Intracellular and extracellular responses of the several regions of the Mauthner cell of the goldfish. *Journal of Neurophysiology*, *25*, 732–771. https://doi.org/10.1152/jn.1962.25.6.732

Gabbiani, F., Krapp, H. G., & Laurent, G. (1999). Computation of Object Approach by a Wide-Field, Motion-Sensitive Neuron. The Journal of Neuroscience, 19(3), 1122–1141. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-03-01122.1999

Gallivan, J. P., Chapman, C. S., Wolpert, D. M., & Flanagan, J. R. (2018). Decision-making in sensorimotor control. Nature Reviews. Neuroscience, 19(9), 519–534. https://doi.org/10.1038/s41583-018-0045-9

Gamlin, P. D. R. (2006). The pretectum: Connections and oculomotor-related roles. In J. A. Büttner-Ennever (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 151, pp. 379–405). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)51012-4

Giovannucci, A., Friedrich, J., Gunn, P., Kalfon, J., Brown, B. L., Koay, S. A., Taxidis, J., Najafi, F., Gauthier, J. L., Zhou, P., Khakh, B. S., Tank, D. W., Chklovskii, D. B., & Pnevmatikakis, E. A. (2019). CaImAn an open source tool for scalable calcium imaging data analysis. eLife, 8, e38173.

https://doi.org/10.7554/eLife.38173

Gleiss, S., & Kayser, C. (2012). Audio-Visual Detection Benefits in the Rat. PLoS ONE, 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045677

Graham, J. (1977). An autoradiographic study of the efferent connections of the superior colliculus in the cat. The Journal of Comparative Neurology, 173(4), 629–654. https://doi.org/10.1002/cne.901730403

Grantyn, A., & Grantyn, R. (1982). Axonal patterns and sites of termination of cat superior colliculus neurons projecting in the tecto-bulbo-spinal tract. Experimental Brain Research, 46(2), 243–256. https://doi.org/10.1007/BF00237182

Grunwald, D. J., & Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish—Emergence of a new model vertebrate. Nature Reviews Genetics, 3(9), 717–724. https://doi.org/10.1038/nrg892

He, K., Zhang, X., Ren, S., & Sun, J. (2016). Deep Residual Learning for Image Recognition. 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 770–778. https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.90

Heap, L. A. L., Vanwalleghem, G., Thompson, A. W., Favre-Bulle, I. A., & Scott, E. K. (2018). Luminance Changes Drive Directional Startle through a Thalamic Pathway. *Neuron*, *99*(2), 293-301.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.013

Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory* (pp. xix, 335). Wiley.

Heinemans, M., & Moita, M. A. (2022). Looming stimuli reliably drive innate, but not learned, defensive responses in rats (p. 2022.02.07.479432). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.02.07.479432

Helmbrecht, T. O., dal Maschio, M., Donovan, J. C., Koutsouli, S., & Baier, H. (2018). Topography of a Visuomotor Transformation. *Neuron*, *100*(6), 1429-1445.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.021

Herberholz, J. (2022). The giant escape neurons of crayfish: Past discoveries and present opportunities. Frontiers in Physiology, 13. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1052354

Hershenson, M. (1962). Reaction time as a measure of intersensory facilitation. Journal of Experimental Psychology, 63(3), 289–293. https://doi.org/10.1037/h0039516

Higashijima, S., Masino, M. A., Mandel, G., & Fetcho, J. R. (2003). Imaging Neuronal Activity During Zebrafish Behavior With a Genetically Encoded Calcium Indicator. Journal of Neurophysiology, 90(6), 3986–3997. https://doi.org/10.1152/jn.00576.2003

Hiramoto, M., & Cline, H. T. (2009). Convergence of multisensory inputs in Xenopus tadpole tectum. *Developmental Neurobiology*, *69*(14), 959–971. https://doi.org/10.1002/dneu.20754

Huda, R., Goard, M., Pho, G., & Sur, M. (2019). Neural mechanisms of sensorimotor transformation and action selection. The European Journal of Neuroscience, 49(8), 1055–1060. https://doi.org/10.1111/ejn.14069

Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., & Stelzer, E. H. K. (2004). Optical Sectioning Deep Inside Live

Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. Science, 305(5686), 1007–1009. https://doi.org/10.1126/science.1100035

Isa, T., Marquez-Legorreta, E., Grillner, S., & Scott, E. K. (2021). The tectum/superior colliculus as the vertebrate solution for spatial sensory integration and action. Current Biology, 31(11), R741–R762. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.001

Issa, F. A., O'Brien, G., Kettunen, P., Sagasti, A., Glanzman, D. L., & Papazian, D. M. (2011). Neural circuit activity in freely behaving zebrafish (Danio rerio). Journal of Experimental Biology, 214(6), 1028–1038. https://doi.org/10.1242/jeb.048876

Jain, R. A., Wolman, M. A., Marsden, K. C., Nelson, J. C., Shoenhard, H., Echeverry, F. A., Szi, C., Bell, H., Skinner, J., Cobbs, E. N., Sawada, K., Zamora, A. D., Pereda, A. E., & Granato, M. (2018). A Forward Genetic Screen in Zebrafish Identifies the G-Protein-Coupled Receptor CaSR as a Modulator of Sensorimotor Decision Making. Current Biology, 28(9), 1357-1369.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.025

Jensen, E. C. (2012). Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. The Anatomical Record, 295(10), 1621–1627. https://doi.org/10.1002/ar.22548

Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., … Schneider, H. (2013). Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. Zebrafish, 10(1), 70–86. https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861

Kardamakis, A. A., Pérez-Fernández, J., & Grillner, S. (2016). Spatiotemporal interplay between multisensory excitation and recruited inhibition in the lamprey optic tectum. *eLife*, *5*, e16472. https://doi.org/10.7554/eLife.16472

Kim, D. H., Kim, J., Marques, J. C., Grama, A., Hildebrand, D. G. C., Gu, W., Li, J. M., & Robson, D. N. (2017). Pan-neuronal calcium imaging with cellular resolution in freely swimming zebrafish. *Nature Methods*, *14*(11), 1107–1114. https://doi.org/10.1038/nmeth.4429

Kimmel, C. B., Patterson, J., & Kimmel, R. O. (1974). The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Developmental Psychobiology*, *7*(1), 47–60. https://doi.org/10.1002/dev.420070109

Knogler, L. D., & Drapeau, P. (2014). Sensory gating of an embryonic zebrafish interneuron during spontaneous motor behaviors. Frontiers in Neural Circuits, 8. https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00121

Knudsen, E. (1982). Auditory and visual maps of space in the optic tectum of the owl. *The Journal of Neuroscience*, *2*(9), 1177–1194. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.02-09-01177.1982

Kohashi, T., Nakata, N., & Oda, Y. (2012). Effective sensory modality activating an escape triggering neuron switches during early development in zebrafish. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the*

Society for Neuroscience, *32*(17), 5810–5820. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6169-11.2012

Komura, Y., Tamura, R., Uwano, T., Nishijo, H., & Ono, T. (2005). Auditory thalamus integrates visual inputs into behavioral gains. *Nature Neuroscience*, *8*(9), 1203–1209. https://doi.org/10.1038/nn1528

Korn, H., & Faber, D. S. (2005). The Mauthner Cell Half a Century Later: A Neurobiological Model for Decision-Making? Neuron, 47(1), 13–28. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.019

Krapp, H. G. (2010). Sensorimotor Transformation: From Visual Responses to Motor Commands. Current Biology, 20(5), R236–R239. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.024

Krasne, F. B. (1965). ESCAPE FROM RECURRING TACTILE STIMULATION IN BRANCHIOMMA VESICULOSUM. The Journal of Experimental Biology, 42, 307–322. https://doi.org/10.1242/jeb.42.2.307

Lanz, F., Moret, V., Rouiller, E. M., & Loquet, G. (2013). Multisensory Integration in Non-Human Primates during a Sensory-Motor Task. Frontiers in Human Neuroscience, 7. https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00799

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture, 269(1), 1–20. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

Levine, J. D. (1974). Giant neuron input in mutant and wild typeDrosophila. Journal of Comparative Physiology, 93(4), 265–285. https://doi.org/10.1007/BF00606797

Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L., & Raible, D. W. (1999). Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. Development, 126(17), 3757–3767. https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3757

Lu, Z., & DeSmidt, A. A. (2013). Early Development of Hearing in Zebrafish. Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 14(4), 509–521. https://doi.org/10.1007/s10162-013-0386-z

Luksch, H. (2009). Optic Tectum: Sensorimotor Integration. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 263–269). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01115-3

Marquart, G. D., Tabor, K. M., Bergeron, S. A., Briggman, K. L., & Burgess, H. A. (2019). Prepontine non-giant neurons drive flexible escape behavior in zebrafish. PLOS Biology, 17(10), e3000480. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000480

Marquez-Legorreta, E., Piber, M., & Scott, E. K. (2020). Chapter 4 - Visual escape in larval zebrafish: Stimuli, circuits, and behavior. In R. T. Gerlai (Ed.), *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish* (pp. 49–71). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00004-8

Marsden, K. C., & Granato, M. (2015). In Vivo Ca2+ Imaging Reveals that Decreased Dendritic Excitability Drives Startle Habituation. Cell Reports, 13(9), 1733–1740. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.060

Martorell, N., & Medan, V. (2021). Audiovisual integration in the Mauthner cell enhances escape probability and reduces response latency. Scientific Reports, 12. https://doi.org/10.1038/s41598-022-04998-2

Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., & Bethge, M. (2018). DeepLabCut:

Markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. Nature Neuroscience, 21(9), 1281–1289. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y

May, P. J. (2006). The mammalian superior colliculus: Laminar structure and connections. Progress in Brain Research, 151, 321–378. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)51011-2

Medan, V., & Preuss, T. (2014). The Mauthner-cell circuit of fish as a model system for startle plasticity. *Journal of Physiology-Paris*, *108*(2–3), 129–140. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.006

Meredith, M. A., Nemitz, J. W., & Stein, B. E. (1987). Determinants of multisensory integration in superior colliculus neurons. I. Temporal factors. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 7(10), 3215–3229. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-10-03215.1987

Meredith, M. A., & Stein, B. E. (1983). Interactions among converging sensory inputs in the superior colliculus. Science, 221(4608), 389–391. https://doi.org/10.1126/science.6867718

Meredith, M. A., & Stein, B. E. (1985). Spatial factors determine the activity of muitisensory neurons in cat superior colliculus. 5.

Meredith, M. A., & Stein, B. E. (1986). Visual, auditory, and somatosensory convergence on cells in superior colliculus results in multisensory integration. *Journal of Neurophysiology*, *56*(3), 640–662. https://doi.org/10.1152/jn.1986.56.3.640

Metcalfe, W. K., Kimmel, C. B., & Schabtach, E. (1985). Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. Journal of Comparative Neurology, 233(3), 377–389. https://doi.org/10.1002/cne.902330307

Michelson, A. A. (1927). Studies in Optics. University of Chicago Press.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature, 388(6645), 882–887. https://doi.org/10.1038/42264

Nakai, J., Ohkura, M., & Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca2+ probe composed of a single green fluorescent protein. Nature Biotechnology, 19(2), 137–141. https://doi.org/10.1038/84397

Nicolelis, M. A., Baccala, L. A., Lin, R. C., & Chapin, J. K. (1995). Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system. *Science (New York, N.Y.)*, *268*(5215), 1353–1358. https://doi.org/10.1126/science.7761855

Oliva, D., Medan, V., & Tomsic, D. (2007). Escape behavior and neuronal responses to looming stimuli in the crab Chasmagnathus granulatus (Decapoda: Grapsidae). Journal of Experimental Biology, 210(5), 865–880. https://doi.org/10.1242/jeb.02707

Otero Coronel, S., Martorell, N., Berón de Astrada, M., & Medan, V. (2020). Stimulus contrast information modulates sensorimotor decision making in goldfish. https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00023

Otero-Coronel, S., Preuss, T., & Medan, V. (2024). Multisensory integration enhances audiovisual responses in

the Mauthner cell. *eLife*, *13*. https://doi.org/10.1101/2023.05.30.542841

Otis, T. S., & Gilly, W. F. (1990). Jet-propelled escape in the squid Loligo opalescens: Concerted control by giant and non-giant motor axon pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(8), 2911–2915. https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.2911

Pachitariu, M., Stringer, C., Dipoppa, M., Schröder, S., Rossi, F., Dalgleish, H., Carandini, M., & Harris, K. (2016). Suite2p: Beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscop. https://doi.org/10.1101/061507

Pantoja, C., Hoagland, A., Carroll, E. C., Karalis, V., Conner, A., & Isacoff, E. Y. (2016). Neuromodulatory Regulation of Behavioral Individuality in Zebrafish. Neuron, 91(3), 587–601. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.016

Park, H.-C., Kim, C.-H., Bae, Y.-K., Yeo, S.-Y., Kim, S.-H., Hong, S.-K., Shin, J., Yoo, K.-W., Hibi, M., Hirano, T., Miki, N., Chitnis, A. B., & Huh, T.-L. (2000). Analysis of Upstream Elements in the HuC Promoter Leads to the Establishment of Transgenic Zebrafish with Fluorescent Neurons. Developmental Biology, 227(2), 279–293. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9898

Poulsen, R. E., Scholz, L. A., Constantin, L., Favre-Bulle, I., Vanwalleghem, G. C., & Scott, E. K. (2021). Broad frequency sensitivity and complex neural coding in the larval zebrafish auditory system. Current Biology, 31(9), 1977-1987.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.103

Preuss, S. J., Trivedi, C. A., vom Berg-Maurer, C. M., Ryu, S., & Bollmann, J. H. (2014). Classification of object size in retinotectal microcircuits. *Current Biology: CB*, *24*(20), 2376–2385. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.012

Preuss, T. (2006). Neural Representation of Object Approach in a Decision-Making Motor Circuit. Journal of Neuroscience, 26(13), 3454–3464. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5259-05.2006

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

Ramón y Cajal, S. (1904). Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados: Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. Volumen III. Madrid : Nicolás Moya. https://digibug.ugr.es/handle/10481/69715

Randlett, O., Wee, C. L., Naumann, E. A., Nnaemeka, O., Schoppik, D., Fitzgerald, J. E., Portugues, R., Lacoste, A. M. B., Riegler, C., Engert, F., & Schier, A. F. (2015). Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. Nature Methods, 12(11), 1039–1046. https://doi.org/10.1038/nmeth.3581

Roelofs, K. (2017). Freeze for action: Neurobiological mechanisms in animal and human freezing. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 372(1718), 20160206. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0206

Romano, S. A., Pietri, T., Pérez-Schuster, V., Jouary, A., Haudrechy, M., & Sumbre, G. (2015). Spontaneous neuronal network dynamics reveal circuit's functional adaptations for behavior. *Neuron*, *85*(5), 1070–1085. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.027

Rowland, B. A., & Stein, B. E. (2007). Multisensory integration produces an initial response enhancement. Frontiers in Integrative Neuroscience, 1. https://doi.org/10.3389/neuro.07.004.2007

Russell, J. T. (2011). Imaging calcium signals in vivo: A powerful tool in physiology and pharmacology. British Journal of Pharmacology, 163(8), 1605–1625. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00988.x

Ruxton, G. D., & Beauchamp, G. (2008). Time for some a priori thinking about post hoc testing. Behavioral Ecology, 19(3), 690–693. https://doi.org/10.1093/beheco/arn020

Scaramella, C., Alzagatiti, J. B., Creighton, C., Mankatala, S., Licea, F., Winter, G. M., Emtage, J., Wisnieski, J. R., Salazar, L., Hussain, A., Lee, F. M., Mammootty, A., Mammootty, N., Aldujaili, A., Runnberg, K. A., Hernandez, D., Zimmerman-Thompson, T., Makwana, R., Rouvere, J., … Roberts, A. C. (2022). Bisphenol A Exposure Induces Sensory Processing Deficits in Larval Zebrafish during Neurodevelopment. eNeuro, 9(3), ENEURO.0020-22.2022. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0020-22.2022

Schiff, W., Caviness, J. A., & Gibson, J. J. (1962). Persistent Fear Responses in Rhesus Monkeys to the Optical Stimulus of "Looming." Science, 136(3520), 982–983. https://doi.org/10.1126/science.136.3520.982

Schölkopf, B., Smola, A., & Müller, K.-R. (1998). Nonlinear Component Analysis as a Kernel Eigenvalue Problem. Neural Computation, 10(5), 1299–1319. https://doi.org/10.1162/089976698300017467

Scott, E. K. (2009). The cellular architecture of the larval zebrafish tectum, as revealed by Gal4 enhancer trap lines. *Frontiers in Neural Circuits*, *3*. https://doi.org/10.3389/neuro.04.013.2009

Shang, C., Chen, Z., Liu, A., Li, Y., Zhang, J., Qu, B., Yan, F., Zhang, Y., Liu, W., Liu, Z., Guo, X., Li, D., Wang, Y., & Cao, P. (2018). Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. Nature Communications, 9(1), 1232. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03580-7

Shenoy, A., Banerjee, M., Upadhya, A., Bagwe-Parab, S., & Kaur, G. (2022). The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 16. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.861155

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 83(1), 13–34. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x

Stein, B. E., & Meredith, M. A. (1993). The merging of the senses (pp. xv, 211). The MIT Press.

Stein, B. E., Meredith, M. A., & Wallace, M. T. (1993). Chapter 8 The visually responsive neuron and beyond: Multisensory integration in cat and monkey. In T. P. Hicks, S. Molotchnikoff, & T. Ono (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 95, pp. 79–90). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60359-3

Stein, B. E., & Stanford, T. R. (2008). Multisensory integration: Current issues from the perspective of the single neuron. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(4), 255–266. https://doi.org/10.1038/nrn2331

Stevenson, R. A., Ghose, D., Fister, J. K., Sarko, D. K., Altieri, N. A., Nidiffer, A. R., Kurela, L. R., Siemann, J. K., James, T. W., & Wallace, M. T. (2014). Identifying and quantifying multisensory integration: A tutorial review. Brain Topography, 27(6), 707–730. https://doi.org/10.1007/s10548-014-0365-7

Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. Trends in Neurosciences, 37(5), 264–278. https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011

Stierle, I. E., Getman, M., & Comer, C. M. (1994). Multisensory control of escape in the cockroach Periplaneta americana. Journal of Comparative Physiology A, 174(1), 1–11. https://doi.org/10.1007/BF00192001

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio). Nature, 291(5813), 293–296. https://doi.org/10.1038/291293a0

Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose: A generalist algorithm for cellular segmentation. Nature Methods, 18(1), 100–106. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x

Szabo, T. M., Weiss, S. A., Faber, D. S., & Preuss, T. (2006). Representation of Auditory Signals in the M-Cell: Role of Electrical Synapses. *Journal of Neurophysiology*, *95*(4), 2617–2629. https://doi.org/10.1152/jn.01287.2005

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), 171. https://doi.org/10.1038/ncomms1171

Temizer, I., Donovan, J. C., Baier, H., & Semmelhack, J. L. (2015). A Visual Pathway for Looming-Evoked Escape in Larval Zebrafish. *Current Biology*, *25*(14), 1823–1834. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.002

Thieu, M. K., Ayzenberg, V., Lourenco, S. F., & Kragel, P. A. (2024). Visual looming is a primitive for human emotion. bioRxiv, 2023.08.29.555380. https://doi.org/10.1101/2023.08.29.555380

Thompson, A. W., Vanwalleghem, G. C., Heap, L. A., & Scott, E. K. (2016). Functional Profiles of Visual-, Auditory-, and Water Flow-Responsive Neurons in the Zebrafish Tectum. *Current Biology*, *26*(6), 743–754. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.041

Thompson, R. F., & Spencer, W. A. (1966). Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. Psychological Review, 73(1), 16–43. https://doi.org/10.1037/h0022681

Troconis, E. L., Ordoobadi, A. J., Sommers, T. F., Aziz-Bose, R., Carter, A. R., & Trapani, J. G. (2017). Intensity-dependent timing and precision of startle response latency in larval zebrafish. *The Journal of Physiology*, *595*(1), 265–282. https://doi.org/10.1113/JP272466

Vanwalleghem, G., Heap, L. A., & Scott, E. K. (2017). A profile of auditory‐responsive neurons in the larval

zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, *525*(14), 3031–3043. https://doi.org/10.1002/cne.24258

von Reyn, C. R., Breads, P., Peek, M. Y., Zheng, G. Z., Williamson, W. R., Yee, A. L., Leonardo, A., & Card, G. M. (2014). A spike-timing mechanism for action selection. Nature Neuroscience, 17(7), 962–970. https://doi.org/10.1038/nn.3741

Wang, Y., & Frost, B. J. (1992). Time to collision is signalled by neurons in the nucleus rotundus of pigeons. Nature, 356(6366), 236–238. https://doi.org/10.1038/356236a0

Ward Jr., J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, *58*(301), 236–244. https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845

Whitfield, T. T., Riley, B. B., Chiang, M.-Y., & Phillips, B. (2002). Development of the zebrafish inner ear. Developmental Dynamics, 223(4), 427–458. https://doi.org/10.1002/dvdy.10073

Wijesinghe, R., Protti, D. A., & Camp, A. J. (2015). Vestibular Interactions in the Thalamus. *Frontiers in Neural Circuits*, *9*. https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00079

Wulliman, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (2012). Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas. Birkhäuser.

Yilmaz, M., & Meister, M. (2013). Rapid Innate Defensive Responses of Mice to Looming Visual Stimuli. Current Biology, 23(20), 2011–2015. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.015

Yuste, R. (2015). From the neuron doctrine to neural networks. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(8), 487–497. https://doi.org/10.1038/nrn3962

Zottoli, S. J. (1977b). Correlation of the startle reflex and Mauthner cell auditory responses in unrestrained goldfish. *The Journal of Experimental Biology*, *66*(1), 243–254. https://doi.org/10.1242/jeb.66.1.243

Zottoli, S. J., & Freemer, M. M. (2003). Recovery of C-starts, equilibrium and targeted feeding after whole spinal cord crush in the adult goldfish Carassius auratus. *The Journal of Experimental Biology*, *206*(Pt 17), 3015–3029. https://doi.org/10.1242/jeb.00512

Zwaka, H., McGinnis, O. J., Pflitsch, P., Prabha, S., Mansinghka, V., Engert, F., & Bolton, A. D. (2022). Visual object detection biases escape trajectories following acoustic startle in larval zebrafish. *Current Biology*, *32*(23), 5116-5125.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.10.050