



**RIDAA**  
Repositorio Institucional  
Digital de Acceso Abierto de la  
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Carpaneto Freixas, Agustín Eduardo

# Receptor colinérgico de la sinapsis eferente de la línea lateral del pez cebra



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Carpaneto Freixas, A. E. (20201). *Receptor colinérgico de la sinapsis eferente de la línea lateral del pez cebra.* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3535>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## Receptor colinérgico de la sinapsis eferente de la línea lateral del pez cebra

**Agustín Eduardo Carpaneto Freixas**

agustin\_carpaneto@hotmail.com

### Resumen

La línea lateral es un sistema sensorial que permite a peces y anfibios obtener información hidrodinámica del ambiente. En el pez cebra, este sistema es crucial para una amplia variedad de comportamientos, tales como el nado en cardumen, la evasión de predadores y la captura de presas. La línea lateral está formada por tres componentes principales: neuromastos, compuestos por células ciliadas y células de soporte, que constituyen la unidad sensorial funcional y son los órganos encargados del proceso de mecanotransducción; neuronas aferentes, que transmiten la información sensorial desde las células ciliadas hacia áreas centrales y neuronas eferentes, que proyectan desde áreas centrales hacia la periferia para modular la transducción sensorial. En particular, las neuronas eferentes colinérgicas conforman un sistema inhibitorio.

En otras especies se ha demostrado que la actividad inhibitoria del sistema eferente colinérgico está mediada por un receptor colinérgico nicotínico (nAChR) del tipo  $\alpha 9\alpha 10$  acoplado a un canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  del tipo SK2. Este tipo de nAChRs poseen características biofísicas y farmacológicas peculiares, con diferencias entre especies dadas por cambios en sus secuencias codificantes. En este trabajo demostramos que, en un sistema heterólogo (oocitos de *Xenopus laevis*), las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra pueden formar receptores funcionales tanto homoméricos  $\alpha 9$  como heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$ , pero no homoméricos  $\alpha 10$ . Estos receptores poseen una marcada desensibilización y una gran contribución de la corriente de  $Ca^{2+}$  a la corriente iónica total pero, a diferencia de lo que sucede en otras especies, las respuestas generadas por la ACh no son moduladas por el  $Ca^{2+}$  extracelular. Además, mediante un análisis sobre estudios de expresión génica, observamos que tanto *chrna9*, el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 9$ , como los genes que codifican para los canales SK1a y SK2 están enriquecidos en las células ciliadas del pez cebra.

Para poder evaluar si estos mismos receptores participan en la sinapsis eferente colinérgica de la línea lateral posterior del pez cebra, realizamos experimentos de imaging de  $Ca^{2+}$  in vivo en larvas enteras mientras estimulamos mecánicamente a las células ciliadas de los neuromastos. Pudimos comprobar que la aplicación de ACh genera una inhibición en la

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que se da como consecuencia final de la activación mecánica y consecuente despolarización de las células ciliadas. Más aun, esta inhibición es bloqueada tanto por  $\alpha$ -bungarotoxina, bloqueante específico de los nAChRs  $\alpha 9$  de pez cebra, como por apamina, bloqueante de los canales SK2.

En conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la sinapsis eferente colinérgica de la línea lateral posterior del pez cebra está mediada por un nAChR homomérico compuesto por la subunidad  $\alpha 9$ . Más aún, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos receptores activa canales cercanos del tipo SK2, lo cual finalmente lleva a una hiperpolarización de las células ciliadas.



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

# RECEPTOR COLINÉRGICO DE LA SINAPSI EFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL DEL PEZ CEBRA.

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de  
la Universidad Nacional de Quilmes



Licenciado Agustín Eduardo Carpaneto Freixas

Directora de tesis: Dra. Ana Belén Elgoyhen

Co-directora: Dra. Paola Viviana Plazas

Laboratorio de Fisiología y Genética de la Audición.

INGEBI-CONICET

Junio 2021

Los resultados de la presente tesis doctoral han dado lugar a la siguiente publicación:

“Carpaneto Freixas AE, Moglie MJ, Castagnola T, Salatino L, Domene S, Marcovich I, Gallino S, Wedemeyer C, Goutman JD, Plazas PV, Elgoyhen AB. Unraveling the Molecular Players at the Cholinergic Efferent Synapse of the Zebrafish Lateral Line. *J Neurosci*. 2021 Jan 6;41(1):47-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1772-20.2020. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33203744; PMCID: PMC7786207.”

# RESUMEN

La línea lateral es un sistema sensorial que permite a peces y anfibios obtener información hidrodinámica del ambiente. En el pez cebra, este sistema es crucial para una amplia variedad de comportamientos, tales como el nado en cardumen, la evasión de predadores y la captura de presas. La línea lateral está formada por tres componentes principales: neuromastos, compuestos por células ciliadas y células de soporte, que constituyen la unidad sensorial funcional y son los órganos encargados del proceso de mecanotransducción; neuronas aferentes, que transmiten la información sensorial desde las células ciliadas hacia áreas centrales y neuronas eferentes, que proyectan desde áreas centrales hacia la periferia para modular la transducción sensorial. En particular, las neuronas eferentes colinérgicas conforman un sistema inhibitorio.

En otras especies se ha demostrado que la actividad inhibitoria del sistema eferente colinérgico está mediada por un receptor colinérgico nicotínico (nAChR) del tipo  $\alpha 9\alpha 10$  acoplado a un canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  del tipo SK2. Este tipo de nAChRs poseen características biofísicas y farmacológicas peculiares, con diferencias entre especies dadas por cambios en sus secuencias codificantes. En este trabajo demostramos que, en un sistema heterólogo (oocitos de *Xenopus laevis*), las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra pueden formar receptores funcionales tanto homoméricos  $\alpha 9$  como heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$ , pero no homoméricos  $\alpha 10$ . Estos receptores poseen una marcada desensibilización y una gran contribución de la corriente de  $Ca^{2+}$  a la corriente iónica total pero, a diferencia de lo que sucede en otras especies, las respuestas generadas por la ACh no son moduladas por el  $Ca^{2+}$  extracelular. Además, mediante un análisis sobre estudios de expresión génica, observamos que tanto *chrna9*, el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 9$ , como los genes que codifican para los canales SK1a y SK2 están enriquecidos en las células ciliadas del pez cebra.

Para poder evaluar si estos mismos receptores participan en la sinapsis eferente colinérgica de la línea lateral posterior del pez cebra, realizamos experimentos de *imaging* de  $Ca^{2+}$  *in vivo* en larvas enteras mientras estimulamos

mecánicamente a las células ciliadas de los neuromastos. Pudimos comprobar que la aplicación de ACh genera una inhibición en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que se da como consecuencia final de la activación mecánica y consecuente despolarización de las células ciliadas. Mas aun, esta inhibición es bloqueada tanto por  $\alpha$ -bungarotoxina, bloqueante específico de los nAChRs  $\alpha 9$  de pez cebra, como por apamina, bloqueante de los canales SK2.

En conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la sinapsis eferente colinérgica de la línea lateral posterior del pez cebra está mediada por un nAChR homomérico compuesto por la subunidad  $\alpha 9$ . Más aún, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos receptores activa canales cercanos del tipo SK2, lo cual finalmente lleva a una hiperpolarización de las células ciliadas.

# INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>INDICE.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>LA LÍNEA LATERAL .....</b>	<b>9</b>
<i>Neuromastos.....</i>	<i>10</i>
<i>Células ciliadas.....</i>	<i>15</i>
Transducción mecanoeléctrica.....	15
Exocitosis en la sinapsis en cinta .....	20
<i>Neuronas Aferentes.....</i>	<i>23</i>
<i>Neuronas Eferentes.....</i>	<i>25</i>
Anatomía y Función.....	28
Neurotransmisores Eferentes .....	32
<b>LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA .....</b>	<b>36</b>
<i>Afinidad por la ACh y farmacología.....</i>	<i>40</i>
<i>Desensibilización .....</i>	<i>41</i>
<i>Permeabilidad al Ca<sup>2+</sup>.....</i>	<i>42</i>
<i>Modulación por Ca<sup>2+</sup>.....</i>	<i>43</i>
<i>Relación corriente-potencial .....</i>	<i>44</i>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENRIQUECIDA EN LAS CÉLULAS CILIADAS DEL PEZ CEBRA. ....</b>	<b>48</b>
<b>CLONADO DE LAS SUBUNIDADES A9 Y A10 DE <i>DANIO RERIO</i>.....</b>	<b>50</b>
<i>Obtención de ADNc total de larvas enteras .....</i>	<i>50</i>
<i>Amplificación por PCR de las subunidades de interés.....</i>	<i>50</i>
<i>Purificación de los fragmentos amplificados.....</i>	<i>53</i>
<i>Clonado de las subunidades de nAChRs de D. rerio en pTOPO-TA.....</i>	<i>53</i>
<i>Subclonado de las subunidades de nAChRs de D.rerio en pSGEM.....</i>	<i>54</i>
<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. ....</b>	<b>56</b>
<b>ELECTROFISIOLOGÍA .....</b>	<b>57</b>
<i>Preparación de ARNc para la expresión heteróloga en oocitos de Xenopus laevis.....</i>	<i>57</i>
<i>Obtención de oocitos de Xenopus laevis.....</i>	<i>57</i>



<i>Inyección de oocitos de Xenopus laevis</i> .....	58
<i>Registros electrofisiológicos</i> .....	58
<i>Caracterización de los receptores</i> .....	60
Farmacología.....	60
Curvas concentración – respuesta.....	60
Evaluación de la modulación por Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	61
Desensibilización .....	61
Evaluación de la entrada de Ca <sup>2+</sup> por activación de la corriente secundaria de Cl de los oocitos. ....	61
Curvas corriente – potencial .....	61
<i>Análisis estadístico</i> .....	62
IMAGING IN VIVO.....	63
<i>Mantenimiento y cría de peces cebra</i> .....	63
<i>Preparación de los peces</i> .....	63
<i>Estimulación de los neuromastos</i> .....	65
<i>Adquisición de Imágenes de Ca<sup>2+</sup></i> .....	66
Microscopía de fluorescencia de campo amplio.....	66
Análisis de imágenes.....	67
Aplicación local de drogas.....	68
Protocolo .....	68
<i>Análisis estadístico</i> .....	69
<i>Drogas Utilizadas</i> .....	70
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
EXPRESIÓN GÉNICA, CLONADO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS SUBUNIDADES DE nAChRS $\alpha 9$ Y $\alpha 10$ DE PEZ CEBRA. ....	71
<i>Expresión génica</i> .....	71
Conclusión.....	76
<i>Clonado de las subunidades de nAChRs <math>\alpha 9</math> y <math>\alpha 10</math> de pez cebra</i> .....	76
<i>Caracterización funcional de receptores mediante la expresión heteróloga de las subunidades <math>\alpha 9</math> y <math>\alpha 10</math> de pez cebra</i> .....	80
Expresión de ARNc en oocitos de <i>X. laevis</i> .....	80
Sensibilidad al agonista ACh.....	81
Desensibilización .....	83
Estimación de la contribución de la corriente de Ca <sup>2+</sup> a la corriente iónica total.....	85
Modulación por calcio extracelular .....	87
Relación corriente - potencial .....	89
Caracterización farmacológica de los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de pez cebra.....	90
Nicotina .....	90
Estricnina .....	91
$\alpha$ -bungarotoxina.....	93

Tricaína .....	96
Conclusión.....	97
CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL RECEPTOR NATIVO DE LA SINAPSIS EFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL POSTERIOR.....	98
<i>Imaging de calcio</i> .....	98
<i>Conclusión</i> .....	111
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>112</b>
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y CLONADO DE LAS SUBUNIDADES NICOTÍNICAS RECOMBINANTES A9 Y A10 DE PEZ CEBRA.....	113
HOMEOSTASIS DEL CALCIO Y ANALOGÍA CON LAS CÉLULAS CILIADAS DE LA CÓCLEA .....	115
CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES RECOMBINANTES FORMADOS POR LAS SUBUNIDADES A9 Y A10 DE PEZ CEBRA. .	116
CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR NATIVO DE LA SINAPSIS EFERENTE DE LA LÍNEA LATERAL DEL PEZ CEBRA. ....	121
INTERACCIÓN ENTRE LOS SISTEMAS EFERENTES COLINÉRGICO Y DOPAMINÉRGICO.....	128
FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA EFERENTE.....	129
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>132</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>133</b>

# ABREVIATURAS

5-HT3: receptores de 5-hidroxitriptamina de tipo 3

$\alpha$ -Btx:  $\alpha$ -Bungarotoxina

$\alpha$ -Ctx:  $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1

ACh: Acetilcolina

Apa: apamina

C: Cys, cisteína

Cav1.3a: Canales de Calcio voltaje dependientes de tipo L 1.3a

CBRP: Correlación biserial de rangos pareados.

CC: Célula ciliada

CCIs: Células ciliadas internas

CCEs: Células ciliadas externas

CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

DELL: Núcleo diencefálico eferente de la línea lateral

dpf: días post fertilización

GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

Gllp: Ganglio aferente de la línea lateral posterior

GcAMP7a: Sensor de calcio genéticamente codificado

I<sub>ACh10</sub>: Corriente evocada por ACh 10  $\mu$ M

I<sub>ACh300</sub>: Corriente evocada por ACh 300  $\mu$ M

I.C.: Intervalo de confianza

IC: Índice de cambio

ICl<sub>Ca</sub>: Corriente de Cl<sup>-</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup>

Ih: Corriente del canal catiónico no selectivo activable por hiperpolarización

II: Índice de inhibición

Isr: isradipina

IV: (curva) corriente - potencial

LL: Línea lateral

IIa: Línea lateral anterior

llp: Línea lateral posterior

MOC: Sistema eferente medial olivococlear

mV: milivolts

NEC: Núcleo eferente caudal

NER: Núcleo eferente rostral

NM: Neuromasto

NOE: Núcleo octavolateral eferente

NOM: Núcleo octavolateral medial

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

pLGIC: Receptores pentaméricos activados por ligando

PPIs: Potenciales postsinápticos inhibitorios

RIC: Rango Inter cuartil

SK2: Canal de potasio de conductancia baja tipo 2

SNC: Sistema nervioso central

Str: Estricnina

TEVC: Técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos

TM: Transmembrana

TME: Canal de transducción mecanoeléctrica

U.A.: Unidades Arbitrarias

# INTRODUCCIÓN

## La línea lateral

La línea lateral (LL) es un sistema sensorial que permite a peces y anfibios obtener información hidrodinámica del ambiente. Este sistema es crucial para una amplia variedad de comportamientos, tales como el nado en cardumen, la evasión de obstáculos y predadores, la captura de presas y la reotaxis (Bleckmann and Zelik, 2009; McHenry et al., 2009; Oteiza et al., 2017; Partridge and Pitcher, 1980; Suli et al., 2012). La línea lateral está formada por tres componentes principales: 1. neuromastos (NM), que constituyen la unidad sensorial funcional y son los órganos encargados del proceso de transducción mecánica de los movimientos del agua; 2. neuronas aferentes, que transmiten la información sensorial desde la periferia hacia áreas centrales y 3. neuronas eferentes, que proyectan desde áreas centrales hacia la periferia para modular la transducción sensorial (Figura 1). La representación a nivel central de la información generada por el flujo hidrodinámico depende de la posición, orientación e inervación de los neuromastos individuales que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el cuerpo del pez (Figura 1). A grandes rasgos, se puede dividir al sistema en dos: la línea lateral anterior (lla), formada por los neuromastos craneales, y la línea lateral posterior (llp), formada por los neuromastos del tronco (Metcalf, 1989; Raible and Kruse, 2000). En *Danio rerio* (pez cebra), a los 7 días después de la fertilización (dpf), la llp está formada por 14 neuromastos: 8 primarios y 6 secundarios (Kimmel et al., 1995; Metcalf et al., 1985; Pujol-Martí and López-Schier, 2013; Sarrazin et al., 2010). Los neuromastos primarios son sensibles a las deflexiones en el eje antero-posterior del pez (neuromastos paralelos), mientras que los secundarios son sensibles a las deflexiones dorso-ventrales (neuromastos perpendiculares), a excepción del primer neuromasto secundario derivado del primordio primD, que también es paralelo (López-Schier et al., 2004).

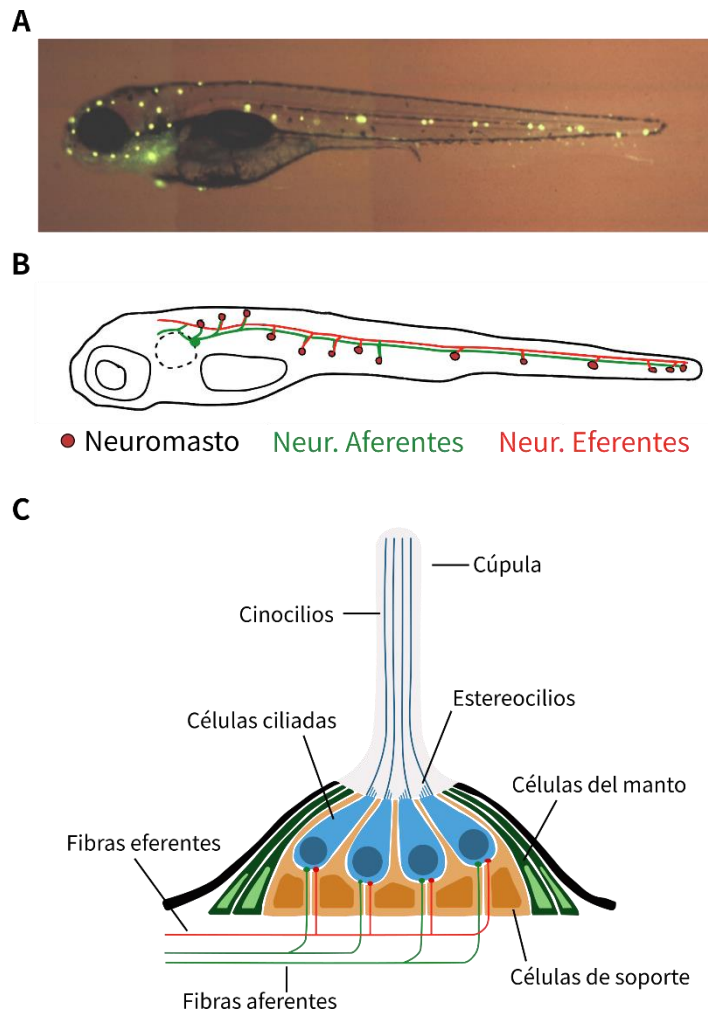


Figura 1 | Vista esquemática de la línea lateral posterior del pez cebra y los neuromastos que la conforman.

A. Imagen de una larva de pez cebra con los neuromastos marcados con DASPEI. Se observan tanto los neuromastos de la Ila, ubicados en la cabeza, como aquellos pertenecientes a la Iip, ubicados en el tronco y la cola (adaptado de Whitfield et al., 1996) B. A los 7 dpf, la línea lateral posterior de la larva de pez cebra está compuesta por 14 neuromastos de cada lado (puntos rojos). Cada neuromasto está inervado por al menos dos neuronas aferentes (verde) y una fibra eferente (roja). Adaptado de Pichler and Lagnado 2020. C. Diagrama esquemático de una sección transversal de un neuromasto donde se pueden observar las diferentes estructuras, tipos celulares e inervaciones. Adaptado de Ma, Raible 2009.

## Neuromastos

Las unidades funcionales de la línea lateral son los neuromastos. Estos órganos están distribuidos a lo largo de la superficie del pez y cada uno está compuesto por células de soporte, células del manto y células ciliadas (CCs). Estas últimas están encargadas de realizar la transducción de las señales mecánicas producidas por el movimiento del agua en señales eléctricas. Al igual que en los sistemas auditivo y vestibular, el contexto anatómico de las células ciliadas

determina la propiedad física que va a ser transducida. En el sistema vestibular, por ejemplo, la inercia de los otolitos, posicionados sobre un epitelio formado por células ciliadas proporciona la sensación de aceleración lineal. En el sistema auditivo, a través de una serie de mecanismos complejos del oído interno, la vibración del tímpano es transmitida por el oído medio a la endolinfa, el líquido que baña la superficie apical de las células ciliadas y estos cambios de presión del fluido provocan el movimiento de los estereocilios de las mismas (Figura 2). En la línea lateral, los grupos de cilios apicales de las CCs están insertos dentro de una estructura gelatinosa denominada cúpula (Figura 2) y la disposición espacial de los mismos permite que cada neuromasto sea sensible a la estimulación mecánica en direcciones opuestas a lo largo de un único eje (Figura 2).

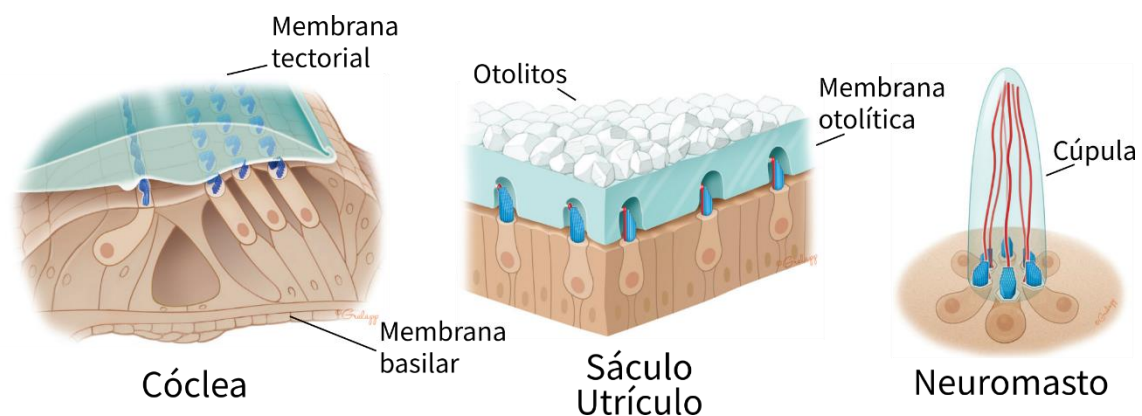


Figura 2 | Diferentes órganos sensoriales presentan diferentes estructuras que generan la estimulación de las células ciliadas.

En la cóclea de mamíferos, las ondas de presión aérea (sonido) se transmiten a través de un medio líquido y generan el movimiento de los cilios de las células ciliadas internas. Las propiedades estructurales de la membrana basilar (sobre la cual se posa el órgano de Corti) y la membrana tectorial (en la cual se encuentran embebidos los haces ciliares de las células ciliadas externas) permiten una sintonización macromecánica (Dallos et al., 1996) y micromecánica (Hudspeth et al., 1989), respectivamente. En el sáculo o el utrículo, la orientación y la aceleración traslacional de la cabeza producen el movimiento de pequeños cristales de carbonato cálcico denominados otolitos que, a su vez, se traduce en el movimiento de la membrana otolítica, lo cual genera el desplazamiento de los haces ciliares de las células ciliadas y su consiguiente activación. En los neuromastos el movimiento del agua genera el desplazamiento de la cúpula, lo que a su vez lleva al movimiento de los haces ciliares de las CC. Adaptado de Maoiléidigh y Ricci, 2019.

Hay dos aspectos de los neuromastos que son, en particular, cruciales para la funcionalidad de la línea lateral. El primero es la organización anatómica altamente ordenada de las células ciliadas con respecto a su polaridad intrínseca, que restringe la sensibilidad global del neuromasto a un solo eje (con dos orientaciones posibles). El segundo, es la presencia de la cúpula, que restringe mecánicamente a los haces ciliares (en particular al cinocilio, superior en tamaño al resto), de tal manera que todas las CCs individuales de los neuromastos estén sometidas exactamente al mismo estímulo. La cúpula, a su vez, también constituye un filtro mecánico que modula la información que el sistema sensorial recibe (Figura 1).

En los peces adultos existen dos tipos de NM, los neuromastos de canal que se encuentran insertos en canales óseos debajo de las escamas del pez, están compuestos por cientos de células ciliadas y son sensibles a la aceleración del flujo (van Netten, 2006). Por su parte, los neuromastos superficiales se encuentran, como su nombre lo indica, en la superficie del animal expuestos directamente al entorno y son sensibles a la velocidad del flujo (McHenry and van Netten, 2007). En su estado larval, el pez cebrá posee únicamente NM superficiales (Ghysen and Dambly-Chaudiere, 2007).

Cada neuromasto superficial está compuesto por entre 10 y 20 CCs rodeadas por alrededor de 30 células de soporte (López-Schier and Hudspeth, 2006). Las CCs dentro de un mismo neuromasto pueden ser divididas en dos poblaciones que se orientan de manera opuesta según su polaridad funcional (Flock and Wersall, 1962; Kindt et al., 2012). Las células ciliadas “hermanas” (con polaridad opuesta) se generan a partir de la proliferación mitótica de las células de soporte (López-Schier and Hudspeth, 2006). El resultado de este proceso es que ambas poblaciones de CCs poseen el mismo número de células. Esto es llamativo ya que las CCs del pez son capaces de regenerarse a lo largo de la vida e integrarse apropiadamente al neuromasto (López-Schier et al., 2004; Pinto-Teixeira et al., 2015). Este tipo de organización no solo retiene la polaridad intrínseca de cada CC en el neuromasto, sino que también genera una sensibilidad bidireccional a lo largo de un eje único. Consecuentemente, la deflexión de la cúpula a lo largo del eje de sensibilidad del NM en una dirección activa la mitad de las CCs e inhibe, aunque a un nivel mucho menor, a la otra mitad y viceversa (Figura 3).



Estas dos poblaciones de células ciliadas son inervadas específicamente por diferentes neuronas aferentes. De esta forma se mantienen los dos “canales” de sensibilidad direccional opuesta (Faucherre et al., 2009). Como resultado de esta inervación selectiva y, debido al hecho de que las CCs liberan glutamato durante el reposo (Trapani and Nicolson, 2011), cualquier deflexión de la cúpula a lo largo de su eje de sensibilidad, lleva a un aumento en la tasa de disparo en una neurona aferente y a la disminución de la tasa de disparo en la otra (Figura 3).

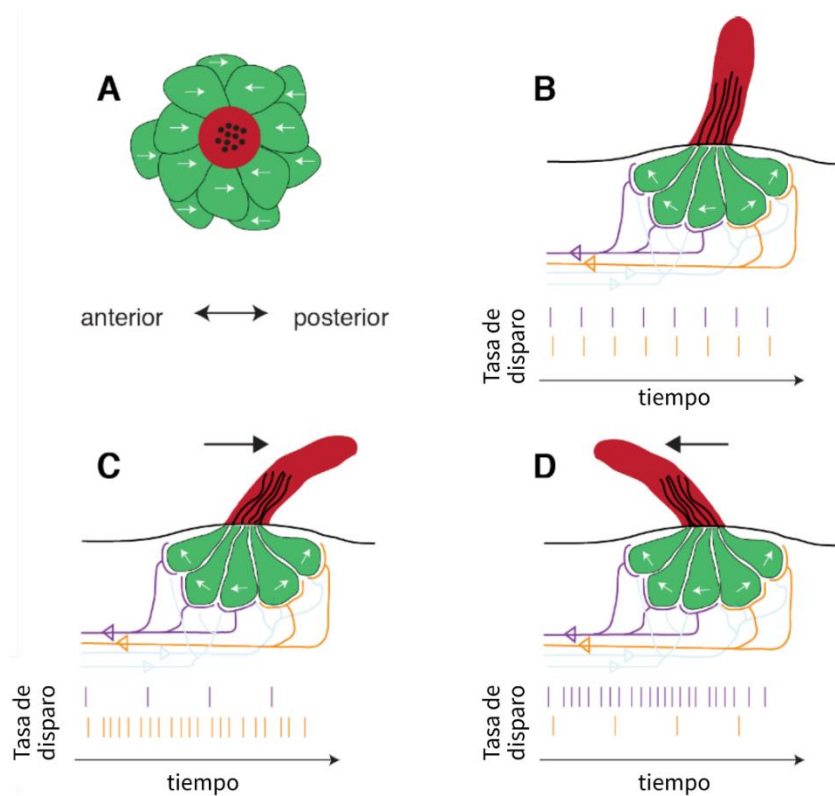


Figura 3 | Polarización funcional de los neuromastos.

A. La polarización funcional de los neuromastos es el resultado del arreglo paralelo, pero opuesto de las células ciliadas que lo constituyen. B. Todos los haces ciliares de las CCs están contenidos en la cúpula gelatinosa (roja) que proyecta ~20-50  $\mu\text{m}$  hacia los alrededores del pez. Las CCs poseen cinocilios largos que se extienden aproximadamente hasta la mitad de la cúpula (líneas negras) y que transmiten la deflexión de la cúpula hacia los estereocilios (muchos más cortos). Las dos poblaciones de células ciliadas están inervadas específicamente por al menos dos neuronas aferentes (naranja y violeta). De esta manera la deflexión de la cúpula a lo largo de su eje de sensibilidad está codificado por dos canales diferentes. Durante el reposo todas las fibras aferentes disparan de manera espontánea a una tasa entre 10 y 50 Hz (Levi et al., 2014; Lv et al., 2016; Trapani & Nicolson 2011). C. y D. con la deflexión de la cúpula, la mitad de las células se despolarizan y esto induce un aumento en la tasa de disparo de las neuronas aferentes que las inervan (naranja en C). La otra población de CCs se hiperpolariza por el mismo estímulo, lo cual lleva a una disminución en la tasa de disparo de la otra neurona aferente (violeta en C). Adaptado de Pichler, 2018.

Las células ciliadas y de soporte, a su vez, están rodeadas por células del manto (o células de cubierta) (Figura 1), que son las encargadas de producir la cúpula gelatinosa compuesta de glicosaminoglicanos (McHenry and van Netten, 2007). Las cúpulas en los neuromastos del pez cebra tienen un radio promedio de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  y se extienden entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  hacia el agua circundante (Van Trump and McHenry, 2008). Un estímulo hidrodinámico, como puede ser una corriente uniforme o turbulencias debidas al acercamiento de un depredador, es filtrado considerablemente antes de inducir la deflexión de los cilios y disparar una respuesta. Los dos componentes mayoritarios de este filtrado son la capa de agua ubicada en la proximidad inmediata del animal y la interacción entre el flujo local y la mecánica propia de la cúpula. Las capas de agua previamente mencionadas se producen debido a las propiedades viscosas de los fluidos. A medida que el agua fluye a través de un objeto (o viceversa), existen fuerzas viscosas que enlentecen a la capa de agua que rodea inmediatamente al objeto, generando así un gradiente de velocidad entre aquella de “flujo libre” y las capas más cercanas al objeto. El ancho de esta capa depende de la velocidad del líquido y del tamaño del objeto que lo esté atravesando. En el caso de las larvas de pez cebra, se estima que los NM de superficie se encuentran dentro de esta capa. Al atenuar las frecuencias bajas, actúa como un filtro pasa-altos para las fuentes de estímulos oscilantes (Levi et al., 2014; Windsor and McHenry, 2009). El segundo componente que contribuye al filtrado del flujo es la interacción entre el flujo local (comprendido dentro de la capa de proximidad inmediata) y la cúpula misma. La cúpula posee una alta compliancia, el 80% de su rigidez puede ser atribuida a los cinocilios de las células ciliadas que se extienden aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  dentro de la cúpula (McHenry and van Netten, 2007). Por lo tanto, esta región de la cúpula puede ser modelada como una palanca rígida que pivota alrededor de su base (McHenry and van Netten, 2007). Los determinantes principales de la interacción entre la cúpula y el fluido son el tamaño de la primera y su rigidez (dada por el número de cinocilios). Estas interacciones atenúan los estímulos de bajas frecuencias y, en conjunto, estos dos componentes (la alta compliancia y el tamaño de la cúpula) generan un filtro pasa banda (McHenry et al., 2009). El tamaño de la cúpula en las larvas del pez cebra varía considerablemente entre NMs, lo que sugiere un alto nivel de

heterogeneidad en los perfiles de las respuestas de los mismo (Van Trump and McHenry, 2008).

En resumen, los neuromastos, incluyendo sus cúpulas, generan el contexto anatómico para la mecanotransducción en la línea lateral. El arreglo en paralelo, pero de manera opuesta, de las CCs mantiene funcionalmente su polarización intrínseca y determina la sensibilidad direccional de toda la unidad receptora funcional. Mediante el acoplamiento de todos los cinocilios y la interacción con el ambiente hidrodinámico local, la cúpula constituye un filtro cuyas propiedades dan forma a la transformación de las velocidades locales del flujo en la deflexión angular de los haces ciliares.

## Células ciliadas

Las células ciliadas constituyen la base celular de la mecanorrecepción a lo largo de diferentes sistemas en todos los vertebrados (Burighel et al., 2011). Estas células son las encargadas de transformar las deflexiones mecánicas en señales neuronales. Dependiendo del contexto anatómico en el cual se encuentran inmersas, estas deflexiones mecánicas pueden ser: el resultado de ondas de presión de aire en el sistema auditivo, fuerzas inerciales en el sistema vestibular o corrientes locales de agua en la línea lateral (Figura 2). La morfología y fisiología de las CCs varía entre los diferentes sistemas sensoriales, niveles organizacionales e, incluso, etapa del desarrollo. Sin embargo, su principio operacional básico siempre es el mismo. Todas las células ciliadas pueden ser caracterizadas por dos estructuras altamente especializadas: un haz de cilios en su región apical y la sinapsis en cinta en la región basal. Los primeros facilitan la transducción de los estímulos mecánicos en señales eléctricas graduadas, mientras que las segundas aseguran una liberación sostenida y temporalmente precisa de los neurotransmisores presentes en las vesículas sinápticas hacia las neuronas aferentes.

## Transducción mecanoeléctrica

Los estereocilios que conforman el haz ciliar varían en número, tamaño y posición entre las CCs de los sistemas auditivo, vestibular y línea lateral, pero en todos los casos se organizan formando filas de altura creciente, produciendo una apariencia similar a una escalera. En las células vestibulares y aquellas

pertenecientes a la LL, existe además un cinocilio no móvil, junto al estereocilio más largo, conformado por el arreglo clásico 9 + 2 de microtúbulos (Furness and Hackney, 2006). El proceso de transducción mecanoeléctrica es el resultado directo de las propiedades morfológicas y mecánicas de los cilios de las CCs.

Las células ciliadas de la LL de la larva del pez cebra, por ejemplo, contienen varias docenas de estereocilios, con los más altos midiendo alrededor de 5  $\mu\text{m}$ , que se ordenan de manera hexagonal y un único cinocilio de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de altura (Flock and Wersall, 1962; Kindt et al., 2012; Van Trump and McHenry, 2008). En contraste con el cinocilio, los estereocilios están compuestos de filamentos de actina fuertemente empaquetados y entrecruzados (Flock and Wersall, 1962; Kindt et al., 2012; Van Trump and McHenry, 2008). En la base, se organizan en forma de huso y forman una radícula, que se ancla a una red densa de actina llamada placa cuticular (Kitajiri et al., 2010). Debido a la existencia de múltiples enlaces entre los estereocilios y el, relativamente rígido, cinocilio (Goodyear et al., 2005; Goodyear and Richardson, 2003; Karavitaki and Corey, 2010; Kozlov et al., 2007; Nayak et al., 2007; Spoon and Grant, 2011), cualquier fuerza ejercida sobre el extremo del cinocilio conduce al pivoteo de todos los estereocilios sobre sus bases. Existen estructuras denominadas "*tip links*" que conectan la punta de los estereocilios al cuerpo de sus vecinos más altos (Pickles et al., 1984). Esta arquitectura asimétrica es la que genera la polarización funcional de las células ciliadas (Flock and Wersall, 1962) y, en consecuencia, de todo el neuromasto. Cuando el haz ciliar se deflecta hacia la posición del cinocilio, la tensión en los *tip links* genera la apertura de los canales de transducción electromecánica que llevan a una despolarización del potencial de membrana (Figura 4).

Los componentes moleculares que conforman la maquinaria de mecanotransducción han sido ampliamente identificados, sin embargo todavía no se conocen a fondo todos los detalles del proceso (Fettiplace, 2017; Peng et al., 2011; Zhao and Müller, 2015). Los *tip links* están compuestos por dos homodímeros conectados, cadherina 23 y protocadherina 15, respectivamente (Kazmierczak et al., 2007). En su extremo superior, la cadherina 23 está asociada con filamentos de actina a través de la proteína motora miosina (las isoformas 1c, Holt et al., 2002, y 7a, Kros et al., 2002), lo que mantiene la tensión

del *tip link* durante el reposo y cumple un papel importante en la adaptación. En el extremo inferior del *tip link*, la protocadherina 15 está conectada a un gran complejo proteico, ubicado en la parte superior del estereocilio, que contiene el canal de transducción (Beurg et al., 2009; Hudspeth, 1982; Lumpkin and Hudspeth, 1995). El complejo del receptor mecanotransductor está formado por las proteínas TMIE, LHFPL4 y TMC1 y 2, siendo estas últimas las candidatas más probables para formar el poro en sí, aunque esto continúa siendo un tema en constante estudio (Corey and Holt, 2016; Wu and Müller, 2016).

Independientemente de su identidad molecular, el canal de transducción mecanoeléctrica (TME) y sus corrientes iónicas asociadas han sido estudiadas en profundidad. Se ha determinado que se trata de un canal catiónico no selectivo (Beurg et al., 2006; Ohmori, 1985), con un tamaño de poro relativamente grande, lo que permite que incluso moléculas de gran tamaño, como el colorante de estirilo FM1-43, entren a través del mismo (Gale et al., 2001). La corriente está dada predominantemente por el influjo de potasio ( $K^+$ ), sin embargo el influjo de calcio ( $Ca^{2+}$ ) cumple un rol central en la adaptación de las señales (Assad and Corey, 1992; Crawford et al., 1989; Eatock et al., 1987). El desplazamiento de los cilios y la consecuente tensión que esto genera en los *tip links* ejerce una fuerza de tracción mediante un mecanismo de apertura tipo “resorte” (Howard et al., 1989; Howard and Hudspeth, 1987). Debido a que la probabilidad de apertura del canal en reposo no es cero, deflexiones en la dirección “negativa”, es decir hacia los estereocilios más pequeños, puede incluso disminuir la probabilidad de apertura (Shepherd and Corey, 1994). La sensibilidad de las CCs, que se puede describir por el rango de trabajo de los procesos de transducción (la deflexión que cambia la probabilidad de apertura del 10 al 90%), varía entre los 50 y varios cientos de nanómetros (Fettiplace and Kim, 2014) y depende no solo del tipo de célula ciliada sino también de los medios de estimulación (Vollrath and Eatock, 2003). La cinética de activación del canal TME es extremadamente rápida, en un rango inferior a los milisegundos (Corey and Hudspeth, 1983, 1979) y, por lo tanto, a veces resulta enmascarada por el filtrado mecánico que sucede durante la estimulación del haz ciliar.

Una propiedad muy importante de la mecanotransducción eléctrica es la adaptación. Al igual que en otros sistemas sensoriales, este fenómeno modifica

el rango dinámico del sensor en respuesta a estímulos sostenidos y de esta manera se restablece la sensibilidad ante estimulaciones subsiguientes. La adaptación de la corriente del canal TME a una estimulación de tipo pulso cuadrado puede ser explicada por dos mecanismos diferentes. Se ha demostrado que ambos son dependientes de calcio (Corey and Holt, 2016; Vollrath and Eatock, 2003; Wu et al., 1999), pero ocurren en escalas temporales diferentes. La adaptación rápida, que opera en una escala temporal inferior a los milisegundos o en milisegundos, dependería del calcio actuando directamente en el canal TME (Kennedy et al., 2003). La adaptación lenta, en contraste, opera a una escala temporal de varias decenas de milisegundos y se debe a la relajación mecánica de los cilios (Howard and Hudspeth, 1987).

El haz ciliar transforma los estímulos mecánicos en una deflexión angular acotada de los estereocilios. El estímulo se proyecta en un plano de polaridad morfológicamente definido, donde las deflexiones hacia el estereocilio más grande incrementan la probabilidad de apertura del canal TME y las deflexiones en la dirección opuesta la disminuyen. El resultado de este comportamiento es una relación sigmoidea entre las deflexiones y la corriente del canal TME, que puede ser modulada rápidamente de manera dependiente del calcio. El cambio gradual resultante en el potencial de membrana genera la exocitosis de vesículas llenas de glutamato en la base de las CCs, en una sinapsis sensorial especializada, la sinapsis en cinta, lo que facilita la transmisión de la información mecánica con alta fidelidad.

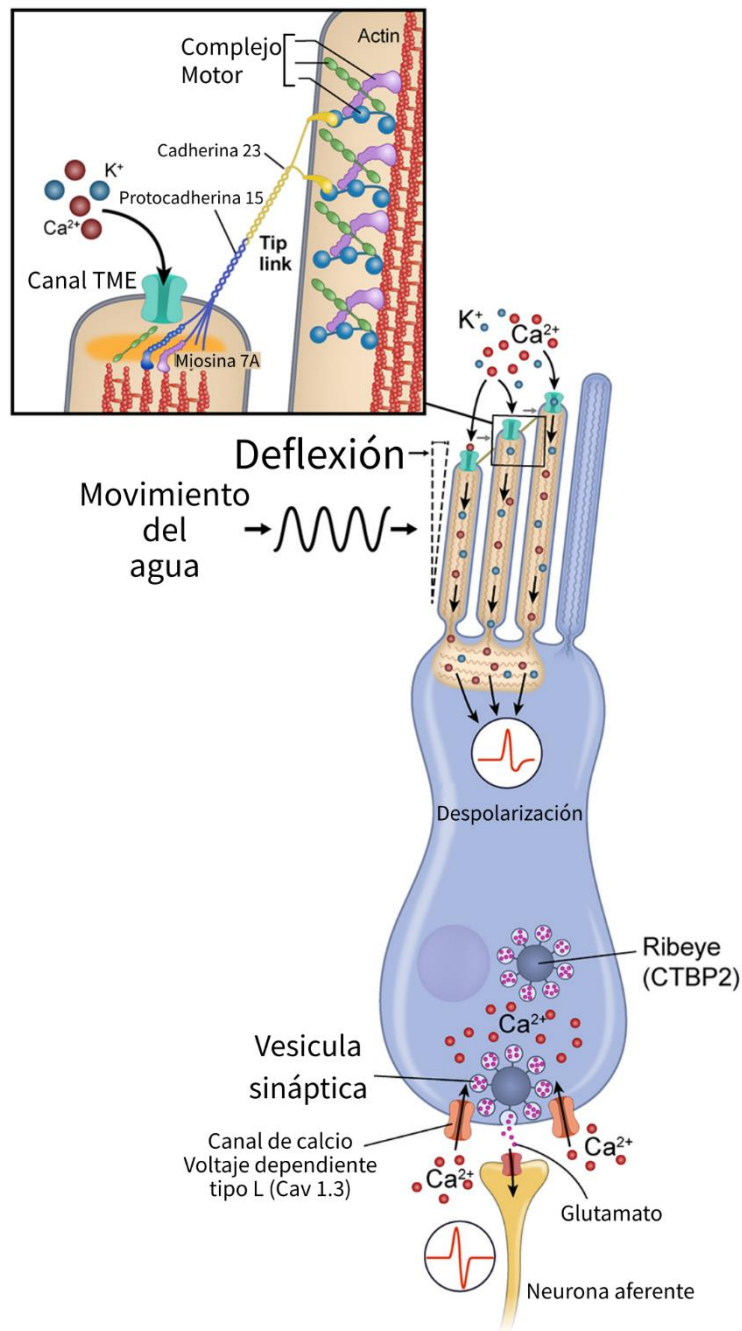


Figura 4 | La deflexión de los cilios provocada por el movimiento del agua genera la liberación de glutamato en la base de la CC.

El movimiento del agua genera el movimiento de los estereocilios en el ápex, lo que induce la apertura de los canales de transducción mecanoeléctrica (TME) ubicados en sus extremos. Esta apertura permite la entrada de iones  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  hacia la célula, generando un cambio en el potencial de reposo de la membrana de las células ciliadas. Esta despolarización lleva a la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L en la región basal de la CC. El calcio entra a la célula a través de estos canales y, por lo tanto, la concentración intracelular de este ion aumenta. Como consecuencia final de este fenómeno se produce la liberación de glutamato de las vesículas sinápticas ubicadas en la sinapsis en cinta y la subsecuente estimulación de las neuronas aferentes. Adaptado de Koleiat et al., 2020.

## Exocitosis en la sinapsis en cinta

Las sinapsis en cinta son sinapsis altamente especializadas que están presentes en las células ciliadas, en las células fotorreceptoras y bipolares de la retina y en la glándula pineal (Matthews and Fuchs, 2010). Este tipo de sinapsis tienen, al menos, dos características fundamentales: por un lado, pueden liberar de manera tónica grandes cantidades de neurotransmisor para facilitar la transmisión continua de la información sensorial, y por otro lado, la exocitosis se da como resultado de cambios graduales en el potencial de membrana, a diferencia de lo que ocurre en las sinapsis canónicas donde la exocitosis es gatillada por potenciales de acción.

La estructura morfológica por la cual estas sinapsis reciben su nombre y que, se cree, facilita la liberación continua y graduada de vesículas sinápticas, es el cuerpo sináptico. En los fotorreceptores y las células bipolares de la retina, el cuerpo sináptico presenta una forma alargada, mientras que en las células ciliadas posee una forma más redondeada. También es llamado “cuerpo denso”, ya que presenta una apariencia electrónica densa cuando se observa bajo un microscopio electrónico. En todos los casos, los cuerpos sinápticos se ubican directamente encima de la zona activa y están rodeados de un halo de vesículas glutamatérgicas. Dentro de las CCs, el número y tamaño de los cuerpos sinápticos varía entre los diferentes tipos de células (Nouvian et al., 2006). En la línea lateral del pez cebra, hay entre 2 y 5 cuerpos sinápticos por CC, con un diámetro promedio de 500 nm (Lv et al., 2016; Nicolson, 2015; Sheets, 2017).

El componente estructural principal de los cuerpos sinápticos es la proteína ribeye, que constituye dos tercios de todas las proteínas que lo forman y es responsable de la apariencia eléctricamente densa (Schmitz et al., 2000; Zenisek et al., 2004). El cuerpo sináptico parecería estar anclado a la membrana presináptica mediante dos grandes proteínas de anclaje, piccolo y bassoon (Dick et al., 2001; Khimich et al., 2005) y juega un papel crítico en la organización espacial de la maquinaria de exocitosis. En larvas de pez cebra, tanto la sobreexpresión como el *knock-down* de ribeye conducen a una menor agrupación de los canales de calcio en *clusters* (Sheets, 2017; Sheets et al., 2011). Contrariamente a lo que podría esperarse, un *knock out* completo de ribeye conduce a la pérdida de la densidad electrónica y de la agrupación de



canales de calcio, pero no a una desagregación de las vesículas. Incluso se observa una exocitosis exacerbada (Lv et al., 2016).

En principio, la exocitosis a nivel de las sinapsis en cinta sigue los mismos pasos que en cualquier otro tipo de sinapsis. La entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) activa un sensor de calcio que gatilla la fusión de vesículas ancladas, usualmente a través de proteínas SNARE (Figura 4). En este tipo de sinapsis, sin embargo, los componentes funcionales que ocupan estos roles parecen ser diferentes (Nouvian et al., 2011). Las CCs en el oído interno y la LL utilizan los canales de calcio voltaje dependientes de tipo L CaV1.3 (Platzer et al., 2000; Sidi, 2004; Spassova et al., 2001). Este canal se caracteriza por tener un gatillado muy rápido y poca o nula inactivación (Johnson and Marcotti, 2008; Platzer et al., 2000), características fundamentales para una sinapsis que debe transmitir de manera tónica señales con alta precisión temporal. Las identidades moleculares del sensor de calcio y la maquinaria de fusión todavía son tema de debate, ya que muchos de los componentes tradicionales del complejo SNARE no se expresan en CCs. Actualmente, el candidato más fuerte para ocupar el rol de sensor de calcio es la otoferlina (Beurg et al., 2010; Dulon et al., 2009; Roux et al., 2006). Sin embargo, esta proteína también parece estar involucrada en otros procesos sinápticos como el rellenado de vesículas sinápticas (Pangrsic et al., 2010).

El acoplamiento espacial estrecho y la existencia de amplios lotes vesiculares inmovilizados en la sinapsis en cinta tiene varias consecuencias funcionales importantes. La relación entre el potencial receptor y la fusión de las vesículas, medida utilizando los cambios en la capacitancia de membrana, sigue una relación lineal (Johnson et al., 2005; Schnee et al., 2005). Esto fue confirmado mediante la realización de registros electrofisiológicos simultáneos en las células ciliadas y los botones postsinápticos de una sinapsis en cinta única (Goutman and Glowatzki, 2007; Keen and Hudspeth, 2006), que demostraron que la corriente excitatoria postsináptica también conserva una relación lineal con la corriente de calcio presináptica. Además, se demostró que el establecimiento de esta relación lineal correlaciona con el nivel de madurez de la célula ciliada y que es dependiente del acoplamiento espacial estrecho entre los canales de calcio y

las vesículas presinápticas (Johnson et al., 2005; Olt et al., 2014; Wong et al., 2014).

Otro fenómeno que puede ser observado en las sinapsis en cinta, y que afecta la precisión temporal de las señales, es la liberación multivesicular (Glowatzki and Fuchs, 2002; Goutman and Glowatzki, 2007; Grant et al., 2010; Li et al., 2009). Se ha observado que las corrientes postsinápticas excitatorias en las neuronas aferentes varían considerablemente en su magnitud, pero sin embargo son indistinguibles en cuanto a su cinética. Estos datos implican que varias vesículas, cada una constituyendo un único cuanto, se liberan simultáneamente (Glowatzki and Fuchs, 2002; Keen and Hudspeth, 2006; Li et al., 2009). El mecanismo mediante el cual se logra esto y el rol de la estructura sináptica no están claros. La estructura sináptica podría proveer un andamiaje para la fusión sincronizada de vesículas ancladas o facilitar la fusión de las vesículas antes de que éstas se fusionen con la membrana plasmática (Matthews and Fuchs, 2010). Independientemente del mecanismo, la liberación multivesicular parece jugar un papel fundamental en el acople de fases, es decir la habilidad de una célula ciliada para acoplarse a la fase de una estimulación sinusoidal (Li et al., 2014).

Además de su alta precisión temporal, otra característica fundamental de las sinapsis en cinta es su habilidad de mantener tasas altas de liberación vesicular durante periodos prolongados. De hecho se considera que estas sinapsis no se fatigan (Schnee et al., 2011, 2005). Esto implica que el recambio vesicular en este tipo de sinapsis tiene que ser rápido y eficiente.

Es importante destacar que el potencial de membrana de las células ciliadas se encuentra dentro del rango de activación del canal CaV1.3, lo cual genera la fusión espontánea de vesículas y la consecuente liberación de glutamato. En las CCs de la línea lateral del pez cebra, el potencial de reposo se encuentra alrededor de los -68 mV (aunque la variabilidad es alta) (Olt et al., 2016, 2014) y se superpone con el potencial de activación registrado para CaV1.3 que es de -70 mV (Olt et al., 2014). Esto se debe parcialmente a que los canales TME tienen una probabilidad de apertura diferente de cero en el reposo, pero también a la expresión del canal catiónico no selectivo activable por hiperpolarización (Ih) (Holt and Eatock, 1995; Trapani and Nicolson, 2011). Como resultado, las neuronas aferentes de la LL del pez cebra disparan de manera espontánea a

tasas de entre 8 y 50 disparos por segundo (Haehnel-Taguchi et al., 2014; Liao, 2014, p. 201, 2010; Lunsford et al., 2019; Trapani and Nicolson, 2011). En peces mutantes que carecen de *tip links* y, por lo tanto, no presentan ninguna corriente del canal TME, la tasa de disparo aferente se ve reducida. Sin embargo, solo el bloqueo adicional de la corriente Ih elimina los disparos espontáneos (Trapani and Nicolson, 2011). Por todo lo mencionado anteriormente, el potencial de reposo de la membrana se mueve dentro del rango dinámico de la exocitosis. Esto permite que la sinapsis en cinta transmita no solo las deflexiones positivas despolarizantes sino también las deflexiones negativas hiperpolarizantes de los cilios, facilitando de esta manera la señalización del rango dinámico completo de las corrientes inducidas mecánicamente.

## Neuronas Aferentes

Las neuronas bipolares aferentes transmiten la información hidrodinámica del entorno del pez desde la periferia hacia el romboencéfalo (Figura 5). Los cuerpos celulares de estas neuronas residen en el ganglio de la línea lateral posterior (Gllp), que se ubica de manera posterior a la vesícula ótica. Los axones centrales de las neuronas aferentes proyectan hacia el núcleo octavolateral medial (NOM) ipsilateral en el romboencéfalo y los axones distales viajan a través de la línea media del pez e inervan a los neuromastos. Cada neuromasto está inervado por, al menos, dos neuronas aferentes, cada una formando sinapsis exclusivamente con células ciliadas de la misma polaridad funcional (Dow et al., 2018; Faucherre et al., 2009; Nagiel et al., 2008; Odstrcil, 2018). Este patrón de inervación asegura que la información proveniente de un neuromasto cualquiera consista de dos canales diferentes con sensibilidad direccional opuesta a lo largo del mismo eje (Figura 3) y que se mantiene de manera estricta durante el desarrollo, cuando tanto el número de neuromastos como el número de neuronas aferentes que inervan un neuromasto individual aumenta (Haehnel et al., 2012).

En el NOM, cada neurona aferente se bifurca para formar una rama posterior y una anterior y forma, en total, ~60 contactos sinápticos (Pujol-Martí et al., 2012). El NOM recibe *inputs* no solo de la llp, sino también de la lla y el oído interno. Está organizado de manera somatotópica con respecto a los *inputs* de la LL: las neuronas de la lla proyectan a regiones más ventrales y aquellas de la llp

proyectan a regiones más dorsales (Alexandre and Ghysen, 1999). Esta regla general también aplica para las neuronas aferentes dentro de la llp, aunque en este último caso la somatotopía no es tan definida. Los axones centrales de las neuronas aferentes primarias que inervan a los neuromastos posteriores proyectan hacia áreas dorsomediales del NOM, y las neuronas aferentes primarias que inervan a los neuromastos anteriores proyectan hacia áreas ventrolaterales en el NOM (Alexandre and Ghysen, 1999; Pujol-Martí et al., 2010). Sin embargo, los axones centrales de las neuronas aferentes secundarias, que inervan a los neuromastos secundarios (y a algunos neuromastos primarios que se ubican de manera muy anterior), siempre proyectan hacia el sector ventral, independientemente de la posición del neuromasto que inervan (Pujol-Martí et al., 2012).

Las neuronas aferentes primarias y secundarias poseen diferencias en su morfología, fisiología y células blanco. Las aferentes primarias, que inervan neuromastos posteriores tienden a tener cuerpos celulares más grandes, suelen inervar varios neuromastos (en su mayoría neuromastos terminales) y poseen una tasa de disparos espontáneos menor que las aferentes secundarias. Además, sólo las neuronas aferentes primarias inervan directamente a la célula de Mauthner, una gran neurona central reticuloespinal que participa en los mecanismos reflejos de escape rápido (Haehnel-Taguchi et al., 2014; Korn and Faber, 2005; McHenry et al., 2009; Metcalfe et al., 1985; Pujol-Martí et al., 2012; Troconis et al., 2017). Estas diferencias han dado lugar a la propuesta de que la llp es un sistema funcional y morfológicamente dimórfico (Pujol-Martí et al., 2012). Las neuronas aferentes primarias son responsables de detectar estímulos “fuertes” como por ejemplo el movimiento de un predador grande (McHenry et al., 2009), con poca capacidad de resolución espacial (ya que pueden inervar a más de un neuromasto) y pueden gatillar directamente respuestas de escape rápido (mediadas por la célula de Mauthner), prescindiendo de áreas superiores del cerebro, a través de la estimulación de un único neuromasto (Haehnel-Taguchi et al., 2014; Liao, 2010; Monesson-Olson et al., 2014; Troconis et al., 2017). Por su parte, las neuronas aferentes secundarias poseen una mayor resolución espacial y están involucradas en comportamientos más sofisticados tales como la reotaxis y la búsqueda de presas, que no están mediados por la

célula de Mauthner sino por neuronas premotoras de orden superior (Haehnel-Taguchi et al., 2014; Liao, 2014, 2010; Pujol-Martí et al., 2012; Pujol-Martí and López-Schier, 2013).

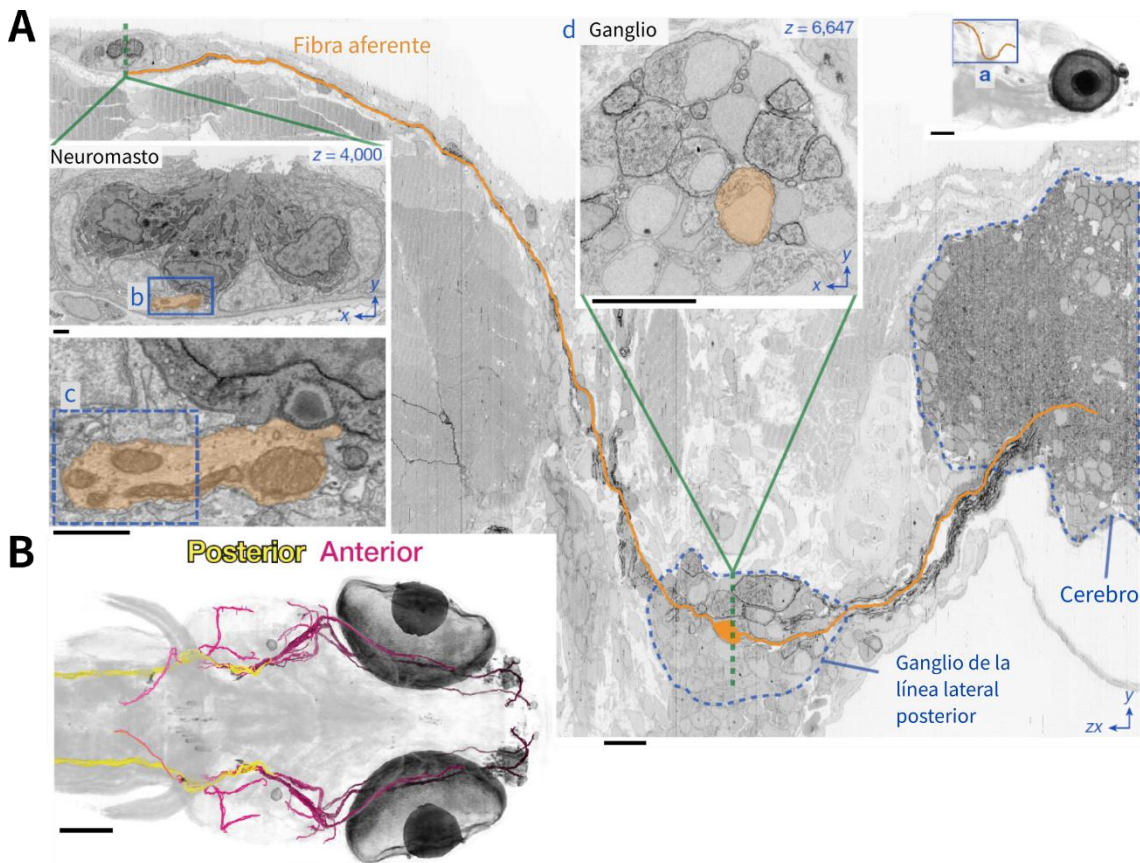


Figura 5 | Reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de una neurona aferente

A. Neurona bipolar aferente de la línea lateral mapeada desde un neuromasto (b-c), a través del ganglio de la línea lateral posterior (d) hacia el romboencéfalo; (a) Región “magnificada” en la figura. B. Reconstrucción de las neuronas aferentes de la línea lateral. Aquellas neuronas que inervan neuromastos en la llp están marcadas con amarillo. Escalas en A: (a) 100  $\mu\text{m}$ , (b, c) 1  $\mu\text{m}$ , (d) 10  $\mu\text{m}$ . Escala en B: 100  $\mu\text{m}$ . Adaptado de Hildebrand et al., 2017.

## Neuronas Eferentes

Las células ciliadas sensoriales del oído interno y la línea lateral reciben inervación eferente que desciende del sistema nervioso central. Estos sistemas eferentes pueden proveer información contextual, que permite ajustar la sensibilidad de las células ciliadas (Lin and Bozovic, 2020), inhibir la actividad por retroalimentación negativa para proteger del daño producido por sonidos

intensos (Taranda et al., 2009; Zheng et al., 1997) o contrarrestar la estimulación autoinducida por movimientos propios del organismo (Chagnaud et al., 2015). También se ha demostrado que el sistema eferente está involucrado en la maduración funcional de las CCs (Glowatzki and Fuchs, 2000; Wang et al., 2021). Esta heterogeneidad funcional está debidamente reflejada tanto en las características anatómicas como fisiológicas de los diferentes sistemas eferentes. Dependiendo del tipo de célula y del organismo, las neuronas eferentes pueden formar sinapsis mediante el contacto directo con las CCs o con los botones postsinápticos de las neuronas aferentes. La modulación llevada a cabo por este tipo de neuronas puede ser inhibitoria o excitatoria y está mediada por la liberación de diferentes neurotransmisores, tales como la dopamina, la acetilcolina (ACh) y el ácido gamma-aminobutírico (Ryugo, 2011). A pesar de esta heterogeneidad, la ACh es el neurotransmisor más abundante (Fuchs, 2014; Jordan et al., 2013; Mathews et al., 2017).

Las neuronas eferentes del sistema vestibular de tortugas, mediante la liberación de ACh, pueden actuar sobre las CCs y sus aferentes de, al menos, tres maneras diferentes (Jordan et al., 2013). Por un lado, los botones aferentes que expresan el receptor nicotínico  $\alpha 4\beta 2$  se despolarizan ante la liberación de ACh (Holt et al., 2015). Por otro lado, la excitabilidad de los botones aferentes se incrementa mediante la supresión de la corriente M mediada por receptores colinérgicos muscarínicos (Holt et al., 2017). Por último, las propias células ciliadas pueden ser hiperpolarizadas por la acción de la ACh directamente sobre receptores nicotínicos presentes en las CCs (Glowatzki and Fuchs, 2000; Holt et al., 2006).

Por otro lado, en el epitelio auditivo de mamíferos, las células ciliadas internas (CCIs) constituyen el fonoreceptor propiamente dicho mientras que las células ciliadas externas (CCEs) participan de mecanismos de amplificación coclear que producen un refinamiento en el grado de discriminación de las frecuencias sonoras (sintonización fina) y un incremento en la sensibilidad a estímulos sonoros de baja intensidad (Ashmore, 2008). La amplificación coclear provista por las CCEs se basa en su capacidad electromotil, mediante la cual las CCEs se elongan o contraen como resultado de cambios en su potencial de membrana (Frolenkov, 2006). Las CCEs están inervadas por el sistema eferente medial olivococlear (MOC) que desciende desde la oliva superior y, al activarse,

disminuye la electromotilidad de las células ciliadas y, consecuentemente, inhibe la amplificación.

Numerosas evidencias farmacológicas y electrofisiológicas han permitido elaborar un modelo que explica la inhibición producida por el sistema MOC sobre las CCEs (Figura 6); La llegada del potencial de acción a los terminales de las fibras eferentes activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q y N que median la liberación de acetilcolina (Eybalin, 1993; Zorrilla de San Martín et al., 2010). Este neurotransmisor genera la activación de un receptor postsináptico colinérgico nicotínico formado por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001; Gómez-Casati et al., 2005; Rothlin et al., 2003; Sgard et al., 2002), lo que da lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la subsecuente activación de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo SK2. Es a través de estos canales que se produce una rápida salida de  $\text{K}^+$  de las CCEs, lo que conduce a una hiperpolarización de las mismas y, consecuentemente, a una disminución de la electromotilidad (Castellano-Muñoz et al., 2010; Dallos et al., 1997; Fuchs and Murrow, 1992; Glowatzki and Fuchs, 2000; Housley and Ashmore, 1991). Una de las características morfológicas destacables de esta sinapsis eferente es la existencia de una cisterna postsináptica co-extensiva y opuesta a los terminales colinérgicos (Figura 6, Fuchs, 2014; Saito, 1983). Debido a la ubicación de esta cisterna, se ha propuesto que podría tener un rol en mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (contribuyendo a la respuesta colinérgica tras la activación del receptor  $\alpha 9\alpha 10$ ), participar en la recaptación del  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a la célula a través del nAChR o simplemente presentar una limitación física para la difusión de este catión (Fuchs, 2014; Lioudyno et al., 2004; Moglie et al., 2018).

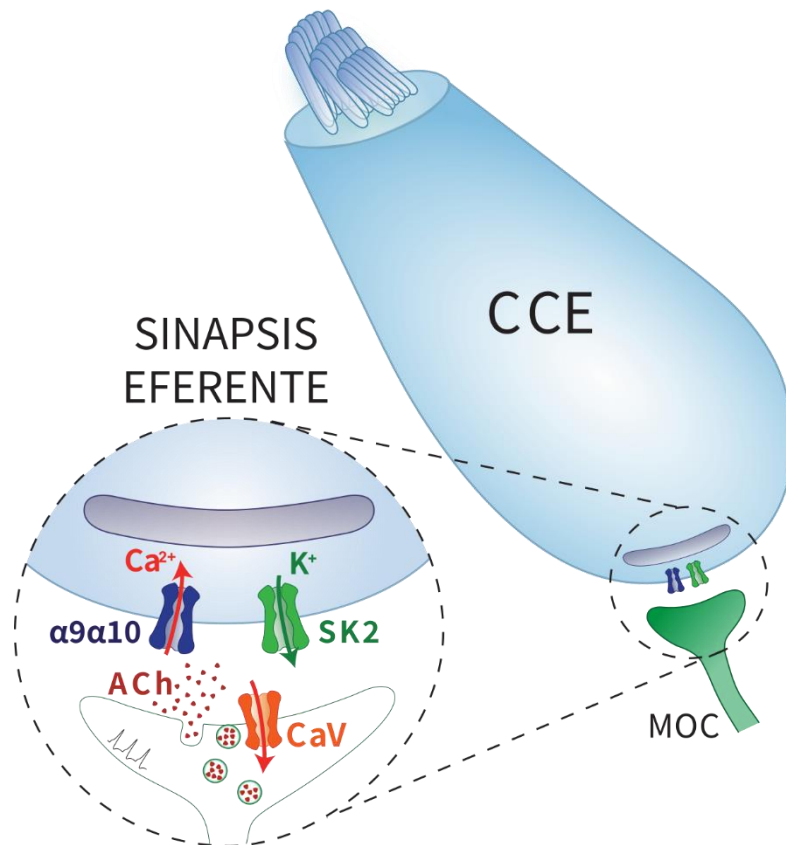


Figura 6 | Representación gráfica de la sinapsis eferente MOC a las CCEs.

La llegada de un potencial de acción al terminal MOC genera la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y la liberación del neurotransmisor ACh. La activación del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  da lugar a la entrada de  $Ca^{2+}$  permitiendo la activación del canal SK2 e hiperpolarizando la célula ciliada. La cisterna subsináptica se ubica a escasos nanómetros de la membrana plasmática y opuesta al terminal eferente. Adaptado de Moglie et al., 2018

## Anatomía y Función

Al día de hoy existen pocos trabajos que se hayan centrado en el sistema eferente de la línea lateral del pez cebra. La mayor parte de la información proviene de experimentos hechos en anfibios y otras especies de peces. Estudios de microscopía electrónica realizados en *Xenopus laevis*, pez cebra y otras especies han demostrado la existencia de axones que descienden desde áreas centrales y presentan terminaciones ricas en vesículas en la proximidad de la base de las células ciliadas y las fibras aferentes en los neuromastos (Dow et al., 2015; Hama, 1965; Toyoshima and Shimamura, 1982; Yamada and Hama, 1972). Incluso en el pez sapo *Opsanus tau*, se demostró que los axones eferentes contactan directamente en las células ciliadas (Flock, 1965; Hama, 1965; Yamada, 1973). Utilizando técnicas de marcaje retrógrado en el nervio de



la LL de la anguila, el pez dorado y el pez cebra se ha logrado determinar que las proyecciones eferentes se originan en tres núcleos centrales pequeños (Figura 7, Meredith and Roberts, 1987; Metcalfe et al., 1985; Zottoli and Van Horne, 1983): los núcleos eferentes rostral y caudal (NER y NEC, respectivamente), ubicados en el romboencéfalo y el núcleo diencefálico eferente de la línea lateral (DELL) ubicado en el hipotálamo ventral. Mientras que el NER y el NEC son colinérgicos y son conocidos colectivamente como el núcleo octavolateral eferente (NOE) (Brantley and Bass, 1988; Danielson et al., 1988; Meredith and Roberts, 1987; Odstrcil, 2018), el DELL es catecolaminérgico (Bricaud et al., 2001; Odstrcil, 2018; Tay et al., 2011; Toro et al., 2015).

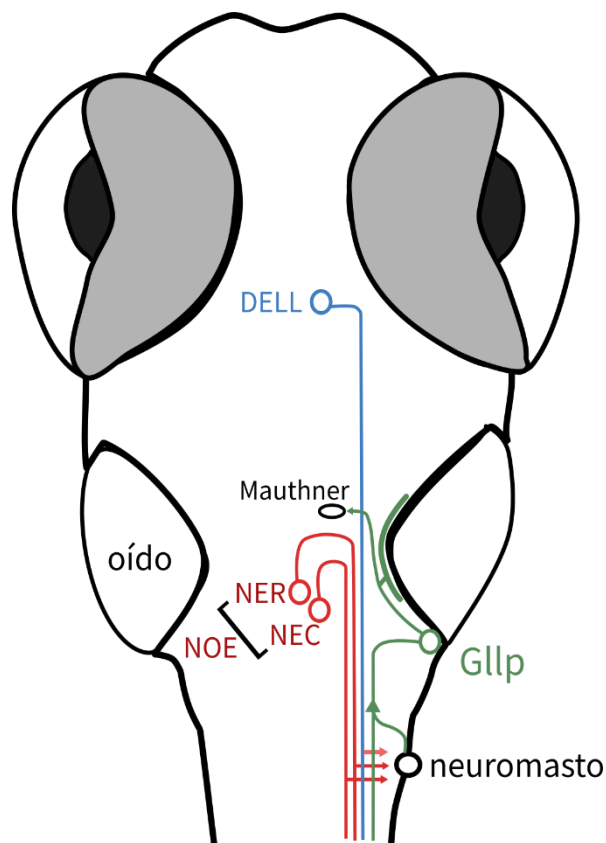


Figura 7 | Anatomía del sistema eferente de la línea lateral posterior

Esquema que representa los componentes principales del circuito de la línea lateral. Además de poseer una inervación aferente de neuronas cuyos somas están ubicados en el ganglio de la línea lateral posterior (Gllp, azul), los órganos sensoriales periféricos (neuromasto) son inervados por fibras descendentes que provienen de los núcleos eferentes rostral y caudal (NER y NEC, rojo) que conforman el núcleo octavolateral eferente (NOE) y por el núcleo diencefálico eferente de la línea lateral (DELL, naranja). Este último núcleo es catecolaminérgico mientras que el NOE es colinérgico. Adaptado de Odstrcil, 2018.

En el pez cebra, se ha demostrado que a los 5 dpf, hay entre 15 y 20 neuronas aferentes sensoriales que hacen contacto con todos los neuromastos de la IIP y este número aumenta en los adultos. Por otro lado, existen únicamente alrededor de cinco neuronas en el romboencéfalo y cuatro en el diencéfalo tanto en larvas como en el adulto. Es decir que en esta etapa del desarrollo ya existen todas las neuronas eferentes que se encontrarán en la etapa adulta, mientras que los neuromastos y las neuronas aferentes van a aumentar su número durante el desarrollo subsiguiente (Metcalf et al., 1985; Odstrcil, 2018).

Las neuronas del DELL se extienden de manera ipsilateral para inervar el oído interno, neuromastos de la cabeza y la cola y a la médula espinal. Las neuronas del NOE presentan una mayor variabilidad y no poseen proyecciones colaterales hacia la médula espinal. Sus axones proyectan únicamente a las células ciliadas del oído interno ipsilateral y los neuromastos anteriores y posteriores. Cada neurona de este núcleo puede inervar una o varias de estas regiones al mismo tiempo, pero no se ha demostrado hasta el momento la existencia de una neurona que inerve únicamente al oído interno. Cabe destacar que los blancos celulares de las neuronas eferentes pertenecientes a los diferentes sub-núcleos del NOE se superponen (Odstrcil, 2018), lo que implica que la inervación del neuromasto no está determinada por la posición de los somas en el romboencéfalo. El marcaje de neuronas eferentes individuales demostró que éstas no tienen un patrón de organización somatotópica, lo cual sugiere que los mecanismos eferentes deben estar actuando de manera global y no están dirigidos específicamente a diferentes regiones del cuerpo. Sosteniendo esta teoría, existen reconstrucciones hechas utilizando datos de microscopía electrónica que muestran que una única neurona eferente contacta a todas las células ciliadas dentro del mismo neuromasto, por lo tanto, una misma neurona inerva CCs de polaridades opuestas (Dow et al., 2018; Faucher et al., 2009; Nagiel et al., 2008; Odstrcil, 2018). El hecho de que una única neurona eferente inerve a todas las células ciliadas del NM sugiere que la activación de este sistema probablemente desensibiliza de manera no específica a un neuromasto, en lugar de ajustar su capacidad de respuesta a los movimientos de agua provenientes ya sean de la región rostral o de la región caudal (Dow et al., 2015; Lunsford et al., 2019). Recientemente ha sido demostrado en larvas de pez cebra

que todas las neuronas del NOE se activan durante la actividad locomotora, independientemente de la posición de su soma. Además, la actividad en los diferentes sub-núcleos está altamente correlacionada, lo cual indica que el NOE puede considerarse un único núcleo en términos funcionales. Si bien tanto el NOE como el DELL presentan actividad correlacionada con la actividad motora, las neuronas del DELL también responden a estímulos mecánicos y sonoros en ausencia de “*outputs*” motores (Odstrcil, 2018).

Recientemente, se ha demostrado en larvas de pez cebra que la frecuencia de disparo espontánea de las fibras aferentes disminuye cuando se activan las neuronas eferentes (con grados variables de inhibición) y que la ablación de los núcleos del NOE suprime esta inhibición (Lunsford et al., 2019; Odstrcil, 2018). La disminución en la tasa de disparo de las neuronas aferentes es consecuencia directa de una disminución del glutamato liberado por parte de las CCs y no solo afecta al disparo espontáneo de las fibras aferentes sino que también inhibe la actividad aferente inducida por estímulos mecánicos (Pichler and Lagnado, 2020). Además, se propuso que esta inhibición es selectiva sobre aquellas CCs que se activan mediante deflexiones en el sentido antero-posterior (Pichler and Lagnado, 2020).

Existe evidencia directa que sugiere que, en la línea lateral, el sistema eferente es fundamental para distinguir entre estímulos dados por factores exógenos (exaferencia) y estímulos generados por el movimiento del propio organismo (reaferencia, Dawkins et al., 2005; Lunsford et al., 2019; Odstrcil, 2018; Pichler and Lagnado, 2020; Sewell and Starr, 1991). Se ha postulado que las neuronas eferentes que proyectan desde el cerebro a la LL del pez conforman un mecanismo para filtrar la reaferencia sensorial, a través de una copia eferente o una descarga corolaria (Sperry, 1950; von Holst and Mittelstaedt, 1950). Esta conclusión se basa en el descubrimiento de que, en el pez cebra, la actividad eferente está correlacionada con la actividad motora del animal (Lunsford et al., 2019; Pichler and Lagnado, 2020). En los esciliorrínidos, las fibras eferentes se activan cuando se somete a los animales a estímulos que normalmente causan respuestas motoras, pero no cuando se fuerza el movimiento del cuerpo de manera pasiva o cuando se expone a los neuromastos a pequeños pulsos de agua proyectada (Roberts and Russell, 1972). Además, la estimulación eléctrica

de la célula de Mauthner y de otras neuronas reticuloespinales también activan al sistema eferente, lo que sugiere que las señales en las neuronas premotoras del mesencéfalo y el romboencéfalo son transmitidas al sistema eferente de la LL (Roberts and Russell, 1972). Un efecto similar se observa en peces dorados, donde se pudo registrar actividad de las fibras eferentes luego de la excitación de neuronas que proyectan a la espina dorsal, incluida la célula de Mauthner (Russell, 1974). Otros movimientos tales como los de las aletas, ojos o incluso movimientos respiratorios también pueden disparar una descarga eferente (Art and Kroese, 1982; Montgomery and Bodznick, 1994; Paul and Roberts, 1977). Estos datos refuerzan la idea de que los comandos motores, aún aquellos no locomotores, pueden inducir la actividad eferente con el objetivo de contrarrestar la estimulación autoinducida. Cabe destacar que el filtrado de la reaferencia puede ocurrir en múltiples sitios dentro del circuito. Por ejemplo, se ha demostrado que las CCs son inhibidas por comandos locomotores directamente mediante la estimulación del nervio de la LL, mientras que los estímulos asociados a los movimientos respiratorios parecen ser procesados río arriba en el MON (Montgomery and Bodznick, 1994).

Experimentos recientes en larvas de pez cebra demuestran que, aunque las neuronas aferentes tienen la capacidad de activarse por un estímulo mecanosensitivo, éstas no se excitan con la deflexión de las cilias de las CCs mientras el pez está nadando. Esto podría indicar que la señal de la copia eferente se transmite de manera directa a los neuromastos desde los núcleos inhibitorios pertenecientes al NOE. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que la ablación de estos núcleos genera la aparición de respuestas robustas en las neuronas aferentes durante el nado, lo cual demuestra que son necesarios para la inhibición sensorial que ocurre durante la locomoción (Odstrcil, 2018).

### Neurotransmisores Eferentes

En términos fisiológicos, la actividad eferente sobre la línea lateral de los peces y los anfibios tiene un componente mayoritariamente inhibitorio mediado por la acetilcolina. En *Xenopus*, el pez gadiforme *Lota lota* y los *esciliorrínidos*, la estimulación de las fibras eferentes del nervio de la llp inhibe la actividad espontánea y evocada de las neuronas aferentes a través de la generación de potenciales postsinápticos inhibitorios (PPIs) en las células ciliadas (Flock and

Russell, 1976; Roberts and Russell, 1972; Russell Ij, 1971). Estos efectos no se observan cuando se realiza la estimulación en presencia de antagonistas de receptores de acetilcolina (Flock and Russell, 1973; Russell, 1971). En la línea lateral de *Xenopus laevis*, la aplicación de acetilcolina exógena (en concentraciones supra-milimolares) combinada con la aplicación de fisostigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa) reduce la frecuencia de disparos aferentes (Roberts and Russell, 1970; Sewell and Starr, 1991). Este efecto es bloqueado por la pre-aplicación de atropina y d-tubocurarina (bloqueantes de receptores muscarínicos, en el primer caso, y nicotínicos en el segundo, y ambos bloqueantes de los receptores nicotínicos  $\alpha 9\alpha 10$ ). Además, se demostró que la inhibición de los impulsos aferentes generados por la estimulación eléctrica de las fibras eferentes desaparece al disminuir la concentración de calcio extracelular (Dawkins et al., 2005; Roberts and Russell, 1970). También en *Xenopus laevis*, se demostró que la estimulación eléctrica de las fibras eferentes produce una supresión rápida (100 ms) de la tasa de disparo aferente, seguida por un incremento, también rápido, de la misma (Russell, 1971; Sewell and Starr, 1991). Ambos efectos se bloquean con la aplicación de curare, atropina y estrocurina (las tres drogas bloqueantes del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ ). Existe también un efecto lento de la estimulación eléctrica de las fibras eferentes, que produce un incremento lento en la tasa de disparo aferente que puede persistir por varios minutos aún después de finalizar la estimulación. Este último efecto no es bloqueado por las drogas previamente mencionadas (Sewell and Starr, 1991).

En el sistema vestibular de tortugas, al igual que en el sistema auditivo de mamíferos, el efecto inhibitorio de la ACh sobre las CCs está mediado por un mecanismo de dos pasos. En el primer paso, la ACh liberada por la neurona eferente activa un receptor colinérgico  $\alpha 9\alpha 10$  presente en las CC. En un segundo paso, el calcio que ingresa a través de estos receptores nicotínicos activa canales de baja conductancia de potasio activados por calcio (SK2) lo que finalmente genera la hiperpolarización de las células ciliadas (Dawkins et al., 2005; Glowatzki and Fuchs, 2000; Kong et al., 2008). A través de este mecanismo, las neuronas eferentes pueden modular el potencial de membrana “graduado” que lleva a la fusión de las vesículas, generando de esta manera un desacople entre la maquinaria de transducción mecanoeléctrica a nivel de los

cilios y la transmisión de dicha información mediada por la sinapsis en cinta. En la LL de *Xenopus laevis*, la aplicación de antagonistas de canales SK (apamina y decualinio) bloquea los efectos inhibitorios del sistema eferente. Asimismo, la aplicación de rianodina (un agente que puede interferir con la liberación de calcio inducida por calcio) en altas concentraciones, también atenúa los efectos inhibitorios de este sistema. En la línea lateral de varios organismos, incluyendo al pez cebra, se ha demostrado la existencia de contactos eferentes directos con las CC y la presencia de una cisterna postsináptica (Figura 8 Dow et al., 2018), que al igual que lo propuesto en las CCEs de mamíferos, estaría involucrada en la homeostasis del calcio y en mecanismos de liberación de calcio inducida por calcio (Dawkins et al., 2005).

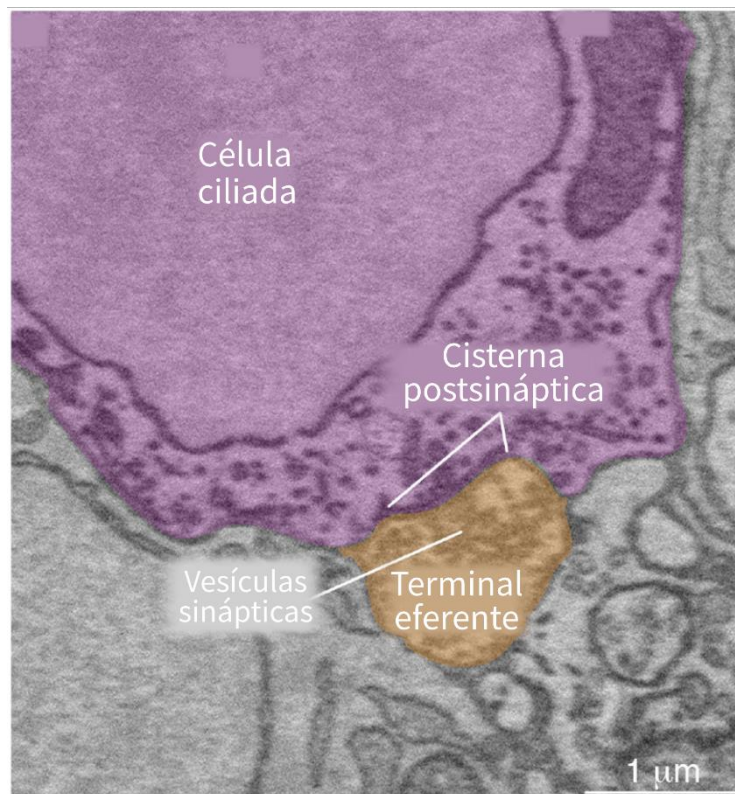


Figura 8 | Las CC de los neuromastos de la llp poseen una cisterna subsináptica opuesta a los terminales eferentes.

Imagen de microscopía electrónica de escaneo de bloques seriados de un neuromasto de la línea lateral posterior. Se puede observar que, frente a un botón eferente lleno de vesículas, existe una cisterna dentro del citoplasma de la célula ciliada. Adaptado de Dow et. al, 2018.

Además del rol inhibitorio, algunos estudios sugieren un rol excitatorio para las fibras eferentes de la línea lateral. La estimulación del nervio de la llp durante el bloqueo de los receptores colinérgicos desenmascara un pequeño aumento creciente en la descarga aferente espontánea, que puede persistir durante minutos aún después de la estimulación (Sewell and Starr 1991). De manera paradójica, la aplicación de CGRP en los neuromastos de *Xenopus* aumenta la tasa de disparo espontánea de los aferentes, pero al mismo tiempo suprime las respuestas evocadas cuando las CCs son estimuladas mecánicamente (Bailey and Sewell, 2000). Las condiciones fisiológicas y del entorno bajo las cuales se libera el CGRP todavía se desconocen y no está claro por qué habría de ser co-liberado con la acetilcolina.

Los resultados más concluyentes sobre el rol excitatorio de las neuronas eferentes provienen de un estudio sobre la modulación dopaminérgica de la LL del pez cebra (Toro et al., 2015). A través de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia, se observó que las células ciliadas expresan el receptor de dopamina D1b y que las fibras eferentes dopaminérgicas llegan a la cercanía de las CCs, pero no parecen formar sinapsis directas con las mismas. La estimulación de las células ciliadas en presencia de agonistas del receptor D1 provoca un aumento en las corrientes excitatorias, que pueden ser disminuidas en presencia de antagonistas de receptores D1. Estos resultados sugieren que la dopamina modula de manera positiva la actividad de las CCs de forma paracrina. Para ayudar a entender el contexto en el cual estas neuronas son reclutadas, registros electrofisiológicos de las neuronas eferentes en larvas paralizadas, demostraron que existen patrones de ráfagas de disparos fásicas estrechamente correlacionadas con la actividad locomotora (Jay et al., 2015), nuevamente demostrando una relación entre la actividad eferente y la ocurrencia de actividad motora.

La variedad de neurotransmisores presente en los neuromastos sugiere la existencia de varios niveles de control eferente con, presumiblemente, roles diferentes. Un problema considerable de los experimentos fisiológicos que se han realizado hasta el momento es que, en gran parte, se basaron en la estimulación de todo el nervio de la LLP que está conformado por una colección heteróloga de axones. Bajo estas condiciones experimentales es difícil discernir

los efectos excitatorios e inhibitorios del sistema eferente sobre las células ciliadas y fibras aferentes de los neuromastos. Uno de los objetivos específicos del presente trabajo es estudiar la acción directa de la acetilcolina sobre la actividad de las células ciliadas y su señalización río abajo.

## Los receptores nicotínicos de acetilcolina

Los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) pertenecen a la superfamilia de receptores pentaméricos activados por ligando (pLGIC), que también incluye a los receptores de 5-hidroxitriptamina de tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>), a los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) de tipo A y C, a los receptores de glicina y a los receptores de glutamato e histidina de invertebrados (Karlin, 2002; Lester, 2004; Pan et al., 2018; Spurny et al., 2012). Son receptores oligoméricos y están compuestos por combinaciones pentaméricas de subunidades glicosiladas  $\alpha$  y no- $\alpha$ , que atraviesan la membrana y se disponen de manera simétrica alrededor de un poro central, que conforma un canal iónico. La distinción entre subunidades tipo  $\alpha$  y no- $\alpha$  se basa en la presencia de un par de cisteínas (C192-C193 en la subunidad  $\alpha$ 1 del pez Torpedo marmorata, Figura 9) que es clave para la unión del agonista (Albuquerque et al., 2009).

Cada una de las subunidades presenta un dominio extracelular N-terminal constituido principalmente por hojas  $\beta$ , una región que atraviesa la membrana con cuatro pasos de  $\alpha$ -hélice transmembrana (TM) y un dominio intracelular ubicado entre los dominios TM3 y TM4, que constituye la porción más variable de la proteína. Cada subunidad se posiciona perpendicular a la membrana y contribuye a los tres dominios estructurales (Figura 9). Todos los miembros de esta familia pertenecientes a vertebrados cuentan con un *loop*, denominado *Cys loop*, ubicado en el dominio extracelular, que constituye la característica más saliente de este grupo. El *Cys loop* está constituido por 13 aminoácidos altamente conservados, flanqueados por dos cisteínas unidas covalentemente por un puente disulfuro, que resulta fundamental para la unión con el ligando (Karlin, 2002) y el tráfico intracelular del receptor (Rajendra et al., 1995).



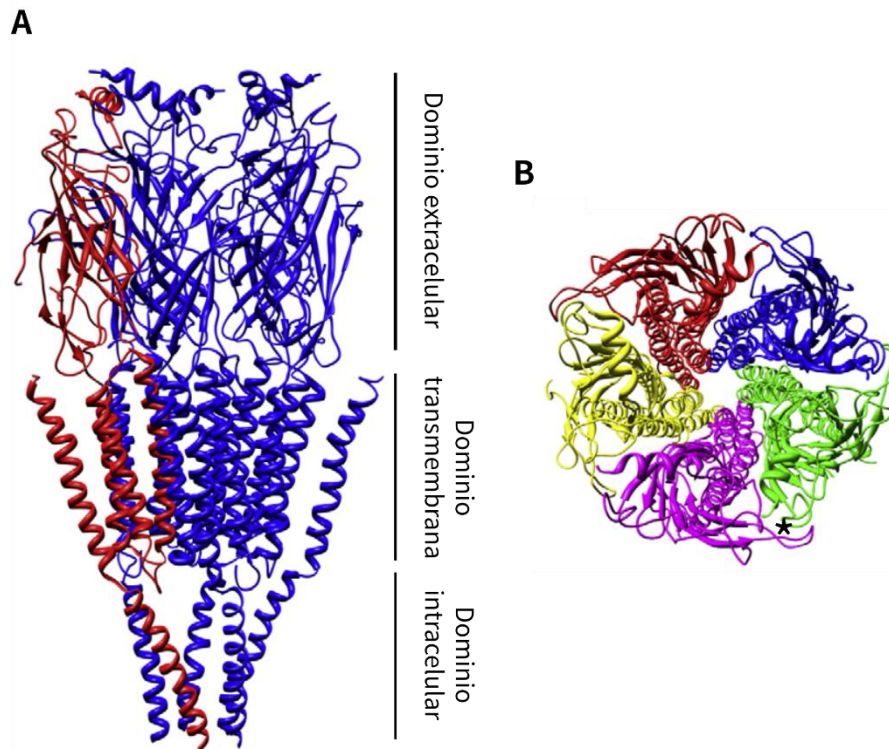


Figura 9 | Diagrama de cintas de la estructura del nAChR del pez eléctrico *Torpedo marmorata*.

Diagrama de cintas de la estructura del nAChR expresado en el órgano eléctrico de *Torpedo marmorata* (Protein Data Bank 2bg9; [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)) determinada a una resolución de 4 Å (Unwin et al., 2005). Se observa la estructura general, conservada en todos los pLGICs: dominio extracelular, región transmembrana y dominio intracelular. Cada una de las 5 subunidades se dispone alrededor de un poro central. (A) Vista lateral (B) Vista desde arriba (espacio extracelular). Asterisco: indica la posición de un sitio de unión a ligando, entre dos subunidades adyacentes. Adaptado de Millar and Gotti, 2009.

El sitio de unión a ACh se encuentra en el dominio extracelular en la interfaz entre dos subunidades. Los residuos aportados por las subunidades que forman parte del sitio de unión no son equivalentes, por lo tanto, una subunidad aporta el componente principal con residuos muy conservados y la adyacente aporta el componente complementario, con residuos menos conservados (Karlín, 2002). Los componentes principales son aportados únicamente por las subunidades de tipo  $\alpha$ , mientras que los componentes complementarios pueden ser aportados por subunidades de tipo  $\alpha$  y no- $\alpha$  (Corringer et al., 2000). Consecuentemente, diferentes combinaciones de subunidades dan lugar a distintos sitios de unión a ACh, que se pueden diferenciar en cuanto a su afinidad por el agonista y por sus

propiedades farmacológicas y funcionales. Dependiendo de la estequiometría del receptor, las interfaces de subunidades que se generan en el pentámero pueden o no ser funcionales.

La capacidad de los nAChRs de gatillar la apertura del canal iónico frente a la unión del ligando ACh en el sitio ortostérico permite el flujo iónico y, consecuentemente, la inducción de una rápida respuesta biológica. En particular, los nAChRs permean cationes.

Los nAChRs son receptores oligoméricos que contienen múltiples sitios de unión del agonista y sitios de unión de antagonistas no competitivos (Karlín, 2002). Además, los nAChRs poseen regulación alostérica y se encuentran en un equilibrio entre diferentes estados funcionales cuya estabilidad es afectada por la unión de agonistas o antagonistas (Colquhoun, 1998). Estos estados y sus transiciones pueden ser descritos por el modelo de Monod-Wyman-Changeaux de interacciones alostéricas (Léna and Changeux, 1993). Los cuatro estados funcionales en los que se pueden encontrar los receptores son: un estado de reposo no conductor, un estado activo conductor de baja afinidad por el agonista, un estado desensibilizado rápido y un estado desensibilizado lento. Ambos estados desensibilizados son no conductores y presentan una afinidad por la ACh muy alta. En ausencia de ACh, el estado más estable es el de reposo, mientras que en presencia de ACh, es más probable que el receptor se encuentre en estado de desensibilización rápida (Karlín, 2002; Léna and Changeux, 1993).

En los vertebrados se han descrito 17 genes que codifican para diferentes subunidades de receptores nicotínicos:  $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Karlín, 2002; Millar and Gotti, 2009). La subunidad  $\alpha 8$  se encuentra en todos los linajes con excepción de los mamíferos (Jones et al., 2003; Schoepfer et al., 1988). Diferentes combinaciones de estas subunidades se ensamblan para dar lugar a receptores pentaméricos funcionales. Las posibles combinaciones están regidas por el sitio de expresión de dichas subunidades y por reglas intrínsecas a su naturaleza química. Típicamente, los nAChRs se clasifican, según sus propiedades y el tejido en que se encuentran en; musculares, neuronales y epiteliales. En este último grupo nos centraremos en este trabajo.

Los nAChRs neuronales y epiteliales están compuestos por las subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ . Los receptores nicotínicos que se expresan en el sistema nervioso central (SNC) están formados por las subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 7$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 8$  en vertebrados no mamíferos) y  $\beta 2$ - $\beta 4$ . Estas pueden ensamblarse con diferentes estequiometrias para dar lugar a receptores homoméricos o heteroméricos generados por dos, tres y hasta cuatro subunidades diferentes (Zoli et al., 2015). Si bien estas subunidades son tradicionalmente consideradas neuronales, existen numerosas evidencias sobre su expresión y función en otros tipos celulares no neuronales (Albuquerque et al., 2009; Gahring and Rogers, 2006). En particular, los receptores nicotínicos compuestos por subunidades de tipo  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se expresan en el epitelio auditivo de los vertebrados (de esta característica deriva su denominación de epiteliales), en donde regulan la actividad de las células ciliadas del oído interno (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Fuchs and Murrow, 1992; Gómez-Casati et al., 2005; Rothlin et al., 2003). Además, la subunidad  $\alpha 9$  también se expresa en la pars tuberalis de la glándula hipófisis, el epitelio nasal, la lengua, ganglios de la raíz dorsal, médula ósea y células sanguíneas (Elgoyhen et al., 1994; Millar and Gotti, 2009). Las subunidades  $\alpha 9$  son capaces de formar receptores homoméricos funcionales (Elgoyhen et al., 1994; Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020), pero se ensamblan en receptores heteroméricos cuando son expresadas conjuntamente con las subunidades  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001; Marcovich et al., 2020; Sgard et al., 2002). Las subunidades  $\alpha 10$  de aves y anfibios son capaces de formar receptores homoméricos funcionales, no así las de mamíferos (Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek et al., 2014; Marcovich et al., 2020).

Los nAChRs neuronales presentan un alto nivel de conservación en sus secuencias codificantes, y en las propiedades funcionales para un mismo receptor a lo largo de los diferentes clados de tetrápodos (Marcovich et al., 2020). La variabilidad funcional en los nAChR neuronales entre especies está dada por la expresión diferencial de distintas subunidades en distintos tejidos (Marcovich et al., 2020). En contraposición, las subunidades de nAChRs epiteliales  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  tienen un patrón de expresión más reducido y exhiben una gran divergencia en las secuencias codificantes entre diferentes especies de vertebrados. Esto deriva en que los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  exhiben una gran variabilidad en sus

propiedades biofísicas y farmacológicas entre diferentes especies de vertebrados tetrápodos (Marcovich et al., 2020). Los cambios funcionales que presenta el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de cada linaje, responden a adaptaciones a los requerimientos impuestos por los sistemas auditivos divergentes de cada grupo (Marcovich et al., 2020). Acompañando los cambios en la funcionalidad de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de vertebrados, se ha reportado que un proceso de selección positiva operó sobre *chrna10* (el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 10$ ) en el linaje de mamíferos (Franchini and Elgoyhen, 2006; Lipovsek et al., 2012; Pisciotano et al., 2019).

En base a estos resultados se han propuesto trayectorias evolutivas diferentes para los nAChR neuronales comparados con el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de células ciliadas. En el caso de los receptores neuronales la variabilidad funcional deriva de diferencias en la expresión y en las diversas combinaciones de las subunidades que los componen, debido a cambios en las secuencias regulatorias entre distintas especies, mientras que para el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  los cambios funcionales derivan de cambios en las secuencias codificantes (Marcovich et al., 2020). Debido a estas trayectorias evolutivas diferentes, las propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores neuronales (como por ejemplo  $\alpha 7$  o  $\alpha 4\beta 2$ ) son similares entre distintas especies de vertebrados mientras que en los nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ , las propiedades varían entre especies (Marcovich et al., 2020).

### Afinidad por la ACh y farmacología

Los perfiles farmacológicos de los nAChRs están determinados por las diferentes subunidades que los componen. Los receptores homoméricos, pero no los heteroméricos neuronales, son sensibles al bloqueo por  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -Btx) y metilcaconitina. Los receptores heteroméricos  $\alpha/\beta$  pueden diferenciarse por la potencia relativa de agonistas y antagonistas (Wonnacott and Barik, 2007). Aún con distintos niveles de sensibilidad, todos los nAChRs responden a acetilcolina. La concentración efectiva de ACh que genera un 50% de la respuesta ( $CE_{50}$ ) reportada para los receptores recombinantes  $\alpha 7$  de pollo (*Gallus gallus*) es de  $\sim 115 \mu M$  (Couturier et al., 1990) y para los receptores recombinantes de  $\alpha 7$  rata (*Rattus norvegicus*) es de  $\sim 515 \mu M$  (Papke and Porter Papke, 2002). Se

considera que estos nAChRs presentan una baja afinidad aparente por la ACh. Si bien el valor preciso de la  $CE_{50}$  depende del tipo y la cantidad de subunidades presentes en el pentámero, los nAChRs heteroméricos presentan una mayor sensibilidad por este agonista. Por ejemplo, los nAChRs más sensibles a ACh, tienen valores de  $CE_{50}$  del orden micromolar (Gerzanich et al., 1995, Zwart and Vijverberg, 1998). Por su parte, tanto los nAChRs homoméricos  $\alpha 9$  de rata como los de pollo presentan un  $CE_{50}$  del orden de los  $\sim 10 \mu M$  y los receptores heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  de estas especies presentan afinidades aparentes del mismo orden de magnitud (Tabla 1, Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek, 2011). En lo que respecta a los nAChRs homoméricos  $\alpha 9$  y los heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  de rana (*Xenopus tropicalis*), ambos presentan una afinidad aparente casi un orden de magnitud más grande, siendo de  $\sim 100 \mu M$  (Tabla 1, Marcovich 2020).

La nicotina, cuyo nombre otorga la denominación al grupo conformado por este tipo de receptores, funciona como un agonista de todos los nAChRs estudiados hasta el momento, con excepción de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , donde actúa como un antagonista competitivo (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Sgard et al., 2002). Se han reportado diversos antagonistas del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  que incluyen tanto agonistas como bloqueantes nicotínicos, muscarínicos, gabaérgicos, glicinérgicos y serotoninérgicos. (Elgoyhen et al., 2001; Ellison et al., 2006; McIntosh et al., 2005; Rothlin et al., 2003).

## Desensibilización

La desensibilización de los nAChRs se manifiesta como una disminución reversible de la respuesta macroscópica registrada durante una exposición continua al agonista. Tanto la concentración como el tiempo de aplicación de este último determinarán el grado de desensibilización. A nivel de canal único, la desensibilización implica un aumento en la cantidad de receptores que pasan a estar en un estado no conductor (Quick and Lester, 2002).

Los diferentes nAChRs presentan diferencias cuantitativas en cuanto a su desensibilización: los nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$  desensibilizan en una escala temporal de milisegundos, pero los nAChRs heteroméricos desensibilizan en un rango de segundos. Los nAChRs musculares presentan cinéticas lentas de desensibilización (Giniatullin et al., 2005). Respecto de los nAChRs

heteroméricos neuronales, la desensibilización depende del tipo y la cantidad de subunidades presentes en el receptor.

En el caso de los receptores homoméricos  $\alpha 9$  estudiados hasta el momento, tanto los receptores de rata como de pollo presentan una desensibilización lenta. La incorporación de la subunidad  $\alpha 10$  aumenta la desensibilización de los receptores heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  ante la aplicación sostenida de ACh (Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek et al., 2012). En el caso de los receptores de rana, sucede lo contrario, el receptor homomérico  $\alpha 9$  presenta un patrón de desensibilización muy pronunciado mientras que el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , si bien presenta una desensibilización más importante que sus contrapartes de rata y pollo, lo hace en un grado menor que el receptor homomérico de la misma especie (Marcovich et al., 2020). En este caso, la incorporación de la subunidad  $\alpha 10$  al nAChR epitelial del anfibio, disminuye la desensibilización del receptor y permite el pasaje de una mayor cantidad de corriente a través del canal frente a las mismas condiciones de exposición al agonista (Tabla 1).

### Permeabilidad al $\text{Ca}^{2+}$

Los nAChRs son canales permeables a cationes (Unwin, 2005). La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a las células a través de los mismos cuando son activados es de suma importancia para varios procesos celulares. Estos incluyen la plasticidad sináptica, la motilidad celular y la activación de cascadas de señalización dependientes de este catión (Fucile, 2004). En particular, en la sinapsis eferente entre las fibras del sistema eferente MOC y las CCEs en la cóclea de mamíferos, la entrada de calcio permite la activación de los canales de potasio SK2 que en último término son los que le confieren la propiedad inhibitoria a esta sinapsis (Fuchs and Murrow, 1992).

Los receptores nicotínicos musculares presentan la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  más baja reportada para los nAChRs, cuando están compuestos por la subunidad embrionaria  $\gamma$ . El reemplazo de la subunidad  $\gamma$  por la subunidad  $\epsilon$  en el receptor muscular adulto provoca un aumento en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Ragozzino et al., 1998). Los nAChRs neuronales heteroméricos presentan una permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  mayor que los receptores musculares, pero menor que los nAChRs neuronales homoméricos (Fucile, 2004). Estos últimos presentan valores de

permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  sumamente elevados, comparables con la de los receptores de glutamato de tipo NMDA (Vernino et al., 1992). En invertebrados, los nAChRs sensibles a  $\alpha$ -Bungarotoxina ( $\alpha$ -Btx) también presentan alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual sugiere que, en general, esta propiedad de los receptores homoméricos estaría conservada a lo largo de la evolución (Le Novère et al., 2002).

La permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  varía entre los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de distintas especies (Tabla 1). Tanto el receptor homomérico  $\alpha 9$ , como el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  de rata, presentan una permeabilidad al calcio alta (comparable a la del receptor nicotínico  $\alpha 7$  o a la del receptor de glutamato del tipo NMDA (Katz et al., 2000; Lipovsek et al., 2012; Weisstaub et al., 2002). Lo mismo sucede con los receptores de rana, que poseen una permeabilidad alta por este catión (Marcovich et al., 2020). En el caso de los receptores de pollo se puede observar una baja permeabilidad al calcio, similar a la de los nAChRs heteroméricos neuronales, tanto en el caso del receptor  $\alpha 9$  como del  $\alpha 9\alpha 10$  (Lipovsek et al., 2014, 2012). Estas diferencias se deberían a una función diferencial que el sistema eferente cumple en las diferentes especies (Köppl, 2011).

### Modulación por $\text{Ca}^{2+}$

Casi la totalidad de los nAChRs estudiados hasta el momento presentan una potenciación de su respuesta frente a un incremento en la concentración del calcio extracelular. Esta modulación de tipo alostérico que ejerce el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los receptores se da de manera independiente del voltaje y se registra como un aumento en la amplitud de la respuesta macroscópica y en la eficacia y la potencia de la acetilcolina (Galzi et al., 1996; Lindstrom, 2006; Mülle et al., 1992; Vernino et al., 1992).

En el caso de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de mamíferos, tanto los nativos como los recombinantes presentan una modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  bifásica: potenciación a concentraciones micromolares de este ion y un bloqueo voltaje-dependiente a concentraciones milimolares (Gómez-Casati et al., 2005; Weisstaub et al., 2002). Los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de pollo, en cambio, presentan potenciación pero no se observa un bloqueo de la respuesta macroscópica por este catión (Lipovsek et al., 2012). Se ha propuesto que esto puede deberse, o bien a una saturación del

mecanismo de potenciación, o a la compensación funcional de ambos mecanismos (potenciación y bloqueo). Por su parte, el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rana presenta una potenciación de la respuesta evocada a todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Marcovich et al., 2020)

En el caso de los nAChRs  $\alpha 9$  homoméricos de rata y pollo, estos son capaces de transmitir corriente aún en condiciones de ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y no presentan potenciación frente a un aumento de la concentración de calcio, pero son bloqueados por este catión en forma voltaje-dependiente (Tabla 1). Esto sugiere que el o los sitios de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  están en el poro del canal. (Katz et al., 2000; Lipovsek et al., 2012). Los receptores  $\alpha 9$  de rana poseen la misma capacidad de transmitir corriente en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  pero no presenta un bloqueo en la respuesta a ACh tras aumentar la concentración de este catión en la solución extracelular (Marcovich et al., 2020).

## Relación corriente-potencial

Los distintos subtipos de nAChRs presentan diferentes perfiles de respuesta en función del potencial de membrana (curva IV). Los nAChRs musculares presentan curvas completamente óhmicas, es decir que la proporción de corriente que pasa a potenciales hiperpolarizados y despolarizados es la misma (sigue un comportamiento lineal) (Mishina et al., 1986). En cambio, tanto los nAChRs neuronales como epiteliales, presentan curvas IV con distintos tipos y grados de rectificación.

Los nAChRs neuronales conducen corriente entrante a potenciales negativos pero casi no conducen corriente a potenciales positivos, lo cual se denomina rectificación entrante (Forster and Bertrand, 1995). A nivel fisiológico, la rectificación entrante, así como la alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , permiten que los nAChRs neuronales presinápticos funcionen regulando la cantidad de neurotransmisor que se libera.

Los nAChRs epiteliales  $\alpha 9\alpha 10$  presentan curvas IV con rectificación saliente, esto implica que la cantidad de corriente que conducen a potenciales despolarizados es mucho mayor que aquella que conducen a potenciales hiperpolarizados (Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek et al., 2012). Este perfil de rectificación particular que presenta el nAChR epitelial  $\alpha 9\alpha 10$  podría constituir un



mecanismo funcional para limitar la cantidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a las células ciliadas del epitelio auditivo en condiciones fisiológicas. Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de rata y pollo presentan una curva corriente-potencial (IV) peculiar. Los receptores heteroméricos de pollo presentan una rectificación saliente muy marcada, similar a la que muestran los receptores homoméricos de rata y pollo (Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek et al., 2014, 2012). Por su parte, en los receptores heteroméricos de rata, existe una importante corriente saliente a potenciales despolarizados, similar en proporción a aquella que existe a potenciales hiperpolarizados (Tabla 1). Esto es marcadamente diferente a lo que sucede en los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de rana, que presentan una marcada rectificación entrante (Marcovich et al., 2020).

Por todo lo expuesto anteriormente, queda en evidencia que los receptores epiteliales  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  presentan características biofísicas y farmacológicas particulares que lo distinguen del resto de los receptores nicotínicos.

Receptor	CE <sub>50</sub> de la ACh (μM)	Desensibilización (%I a los 20 seg)	Modulación por Ca <sup>2+</sup> (I <sub>0.5 mM</sub> /I <sub>3 mM</sub> )	Permeabilidad al Ca <sup>2+</sup> (%I post-BAPTA)	Rectificación (I <sub>+40 mV</sub> /I <sub>-90 mV</sub> )
Rata α9	11.0	94.9	1.75	14.3	3.0
Rata α10	-	-	-	-	-
Rata α9α10	19.39	64.46	3.76	24.89	1.21
Pollo α9	12.4	83.3	1.75	99.5	2.87
Pollo α10	1.74	61.6	0.9	12.7	2.85
Pollo α9α10	17.62	60.84	1.00	100.28	2.31
Rana α9	91.4	5.9	1.00	32.5	N/D
Rana α10	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Rana α9α10	110.89	14.53	0.63	19.56	0.21

Tabla 1 | Propiedades de los nAChRs α9 y α9α10 de las diferentes especies estudiadas hasta el momento.

Los datos fueron determinados experimentalmente y corresponden a la sensibilidad por ACh (CE<sub>50</sub>), el patrón de desensibilización (% de I remanente 20 seg luego del pico de respuesta a ACh), la modulación por Ca<sup>2+</sup> extracelular (corriente, I, a 0.5 mM de Ca<sup>2+</sup>/ I a 3 mM de Ca<sup>2+</sup>), la permeabilidad al Ca<sup>2+</sup> (% de I post-BAPTA) y la rectificación (I<sub>+40 mV</sub>/I<sub>-90 mV</sub>). (Elgoyhen 1994, 2001, Weisstaub 2002, Lipovsek 2012, 2014, Marcovich 2020)

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la información presentada hasta el momento sobre el sistema eferente colinérgico de la línea lateral posterior del pez cebra y los paralelismos establecidos con sistemas eferentes colinérgicos ya estudiados, nos propusimos las siguientes hipótesis:

- Los genes *chrna9* y *chrna10* de pez cebra codifican para subunidades de nAChRs que se pueden ensamblar para formar receptores funcionales.
- Las propiedades biofísicas y farmacológicas de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra tendrán características particulares y no necesariamente iguales a las de otras especies.
- La sinapsis eferente colinérgica de la línea lateral posterior del pez cebra está mediada por un nAChR compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y/o  $\alpha 10$  acoplado a un canal del tipo SK.

Con el fin de poner a prueba estas hipótesis, nos propusimos lograr los siguientes objetivos:

- Evaluar los niveles de expresión en las CCs de los genes potencialmente involucrados en la sinapsis eferente colinérgica de la llp a través de un análisis de estudios previamente realizados.
- Clonar los genes que codifican para las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra y expresarlos en un sistema heterólogo con el fin de estudiar sus propiedades biofísicas y farmacológicas.
- Estudiar *in vivo* el efecto directo de la ACh sobre las CCs de la llp del pez cebra.
- Evaluar *in vivo* la participación de los nAChR  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  y el canal SK2 en la sinapsis eferente de la llp del pez cebra a través del uso de antagonistas específicos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Estudio de la expresión génica enriquecida en las células ciliadas del pez cebra.

Las colecciones de datos pre-procesados de expresión génica de células ciliadas de pez cebra (Tabla 2) fueron obtenidas de tres estudios de secuenciación de ARN de célula única (Erickson and Nicolson, 2015; Lush et al., 2019; Matern et al., 2018) y de un estudio que utilizó chips de ADN (Steiner et al., 2014) (Tabla 2). Los genes de interés se buscaron tanto por su nombre común como por su número de acceso. Para todos los grupos, se utilizaron los datos normalizados internamente y con una corrección de “batch” provenientes de cada estudio. Para cada gen de interés se obtuvieron los valores de expresión en células ciliadas y en su respectivo control (Tabla 2), junto con el valor  $p$  ajustado a la Tasa de Falso Descubrimiento (FDR por sus siglas en inglés) o el valor  $q$ , obtenidos de cada estudio. Para poder comparar la expresión diferencial entre los diferentes estudios, todas las proporciones entre los niveles de expresión en células ciliadas y células control fueron calculadas como “log2 Fold Change”.

Para el estudio que utilizó chips de ADN (Steiner et al., 2014), se extrajeron los datos en los cuales se contrastó las CC con células mCh+, GFP+ del manto. En el caso de Matern, et al. la comparación fue contra el resto de las células del pez y en el caso de Erickson, et al. al haber utilizado marcación por 4-tirouracilo específicamente en células ciliadas, se utilizaron todas las células no marcadas como control. Para Lush et al. 2019, se utilizaron datos de CC maduras vs. otras células del neuromasto (incluyendo las CC inmaduras).

Publicación	DOI	Edad (dpf)	Promotor (CC)	Método de separación	Control	Técnica de medición de expresión
Steiner, et al. 2014	<a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1318692111">10.1073/pnas.1318692111</a>	4	pou4f3	Separación celular activable por fluorescencia (FACS)	Piel	Microarray
Erickson, et al. 2015	<a href="https://doi.org/10.1186/s12864-015-2072-5">10.1186/s12864-015-2072-5</a>	3.5	myo6b	Tag de Tirouracilo (TU)	Células sin TU	RNA-Seq
Matern, et al. 2018	<a href="https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00047">10.3389/fcell.2018.00047</a>	5	myo6b	RiboTag	Larva entera	RNA-Seq
Lush, et al. 2019	<a href="https://doi.org/10.7554/eLife.44431">10.7554/eLife.44431</a>	5	pou4f3	FACS	Células no-CC del neuromasto	RNA-Seq

Tabla 2 | Metadatos de los estudios utilizados para analizar el enriquecimiento de la expresión génica en las células ciliadas del pez cebra.

# Clonado de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de *Danio rerio*

## Obtención de ADNc total de larvas enteras

Se obtuvieron larvas de pez cebra a través de cruas naturales. Un total de 50 larvas en estadio de 7 días post-fertilización (7 dpf) fueron lavadas con medio E3 (Tabla 3) y se procedió a realizar la extracción de ARN total mediante la utilización de TRIzol (Invitrogen), según el protocolo estándar. Dos muestras independientes fueron eluidas en tubos separados utilizando 10  $\mu$ l de solución de elución y tratadas con DNAsa según el protocolo estándar. Se cuantificó la cantidad de ARN extraído para medir el rendimiento de la extracción utilizando un espectrofotómetro de UV visible (NanoDrop 1000, Thermo Scientific):

<b>Muestra</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>A<sup>260 nm</sup>/ A<sup>280 nm</sup></b>	<b>A<sup>260 nm</sup>/ 230 nm</b>
Larva entera (i)	309.3	1.923	2.021
Larva entera (ii)	51.55	1.768	1.984

A continuación, utilizando el sistema SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) se realizó una transcripción reversa del ARNm con primers poli-T, con el fin de obtener la primera hebra del ADNc total de larvas enteras. Para cuantificar el rendimiento de la reacción de transcripción reversa, se midió la cantidad de ADN en un espectrofotómetro de UV visible (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Las concentraciones obtenidas estuvieron en el rango de los 600-1900 ng/ $\mu$ l, con relaciones A260nm/280nm superiores a 1.8 y A260nm/230 nm superiores a 1.96.

## Amplificación por PCR de las subunidades de interés

Basándonos en las secuencias reportadas en el Genome Reference Consortium z11 (GRCz11), diseñamos primers específicos para poder amplificar las secuencias codificantes de las subunidades  $\alpha 9$  (ENSDARG00000054680) y  $\alpha 10$  (ENSDARG00000011113).

Para el clonado de cada una de las subunidades de interés completas se realizaron protocolos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), utilizando los siguientes sets de primers:

Primer	TM (°C)	Secuencia
a9 Fw	51.5	ATGAAGAGCAGTAGCAAATAATAA
a9 Rv	46.9	AATTGCATCAAGTTGTAAAC
a10 Fw	37.7	ATGATTTTATACTATATCC
a10 Rv	53.4	TCAAATGGCTTTCCCCATTATAAG

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando las siguientes soluciones:

α9:

Componente	Concentración final
Buffer PCR	1x
dNTPs	200 μM
Primer sentido	0.2 μM
Primer antisentido	0.2 μM
ADNc	500 ng
Polimerasa <i>Platinum</i> <sup>TM</sup> Taq (Invitrogen)	0.025 U/μl
H2O	C.s.p 25 μl

α10:

Componente	Concentración final
Buffer PCR	1x
dNTPs	200 μM
MgSO4	1.5 mM
Primer sentido	0.2 μM
Primer antisentido	0.2 μM
ADNc	500 ng
Polimerasa <i>Platinum</i> <sup>TM</sup> Taq (Invitrogen)	0.02 U/μl
H2O	C.s.p 50 μl

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 Gradient Thermal Cyclers (MJ Research), empleando los siguientes protocolos de ciclado:

$\alpha 9$ :

94 °C	30 seg.		
94 °C	30 seg.		
45 °C	30 seg.	35 ciclos	
72 °C	2 min.		
72 °C	2 min		

$\alpha 10$ :

94 °C	30 seg.		
94 °C	30 seg.		
45 °C	30 seg.	35 ciclos	
68 °C	1.5 min.		

Los productos de las PCR fueron observados en geles de agarosa al 1%, sembrando 5  $\mu$ l del producto. Los geles se prepararon disolviendo 1g de agarosa (Invitrogen) en 100 ml de buffer TAE (40 mM Tris base – 20 mM Acetato – 1 mM EDTA). El tamaño de los productos de PCR se determinó por comparación de las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular de 1 kb ladder (Genbiotech SRL), tal como se muestra en el ejemplo presentado en la Figura 10.



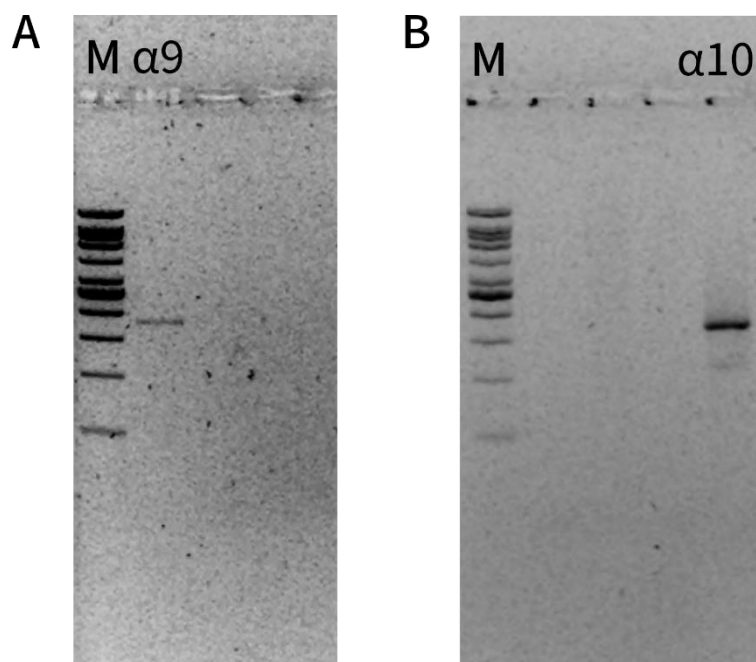


Figura 10 | Productos de PCR de las subunidades de los nAChRs de *Danio rerio* generados a partir del ADNc.

Reacciones de PCR para la subunidad  $\alpha 9$  (A) y  $\alpha 10$  (B) sobre los ADNc obtenidos de larva entera de pez cebra. En ambos casos, las bandas corresponden al tamaño esperado del amplicón. M Marcador de peso molecular - 1kb ladder Genbiotech (Genbiotech SRL).

## Purificación de los fragmentos amplificados

A continuación, se realizó la purificación a partir de gel de los fragmentos de PCR, empleando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Para cada subunidad, se obtuvo un total de 15  $\mu$ l con los siguientes rendimientos:

Muestra	ng/ $\mu$ l	$A^{260 \text{ nm}}/A^{280 \text{ nm}}$	$A^{260 \text{ nm}}/A^{230 \text{ nm}}$
$\alpha 9$	37.8	1.83	2.02
$\alpha 10$	23.5	1.87	1.98

## Clonado de las subunidades de nAChRs de *D. rerio* en pTOPO-TA

Se utilizó el kit TA Cloning™ Kit (ThermoFisher Scientific) para clonar cada una de las subunidades de nAChRs de interés del pez en el vector pCR® 2.1 TOPO

(ThermoFisher). La relación inserto: vector para la reacción de ligación se calculó según las instrucciones brindadas por el fabricante del kit. De la misma manera, la reacción de ligación se realizó según las indicaciones estándar provistas en el kit. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias quimiocompetentes One Shot TOP10 (ThermoFisher Scientific). Las colonias que incorporaron el inserto clonado en el vector fueron identificadas utilizando placas de LB agar con ampicilina 0.1 mg/ml a las cuales se les agregó IPTG y X-Gal. Las mismas se prepararon agregando 100  $\mu$ l de IPTG 0.1 M y 20  $\mu$ l de X-Gal 50 mg/ $\mu$ l a las placas de LB con ampicilina e incubando durante 30 minutos a 37°C antes del plaqueo. Las colonias blancas fueron repicadas en medio LB + ampicilina (0.1 mg/ml). De estos cultivos se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purifications System (Promega). Los productos de la purificación fueron analizados en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad. La presencia del inserto fue determinada mediante un mapeo de restricción con la enzima KpnI (New England Biolabs) en el caso de la subunidad  $\alpha$ 9 y PstI en el caso de  $\alpha$ 10, obteniéndose fragmentos de los tamaños deseados en varios clones. La presencia del inserto correcto se corroboró finalmente por secuenciación por el método de Sanger (Macrogen).

## Subclonado de las subunidades de nAChRs de *D. rerio* en pSGEM

Para ambas subunidades, una vez detectado un clon positivo, se procedió al subclonado del ADNc codificante en el vector pSGEM. Este vector es un derivado del pGEM-HE, que posee los segmentos 5'-UTR y 3'-UTR del gen de  $\beta$ -globina de *X. laevis*, al que se le agregó el sitio múltiple de clonado del vector pBlueScript (Agilent Technologies), lo que lo convierte en un vector ideal para la expresión de proteínas en oocitos de *Xenopus laevis*. Además, este vector presenta un promotor de T7 río arriba del sitio de clonado en donde fueron insertados los ADNc de forma direccionada, lo que permite su transcripción en la orientación sentido. Los insertos fueron liberados del vector pCR® 2.1 TOPO utilizando los sitios de corte para XhoI y SpeI para el caso de  $\alpha$ 9, o bien SpeI y XbaI para el caso de  $\alpha$ 10 (todas las enzimas de restricción provenientes de la empresa New England Biolabs). Por otro lado, se realizó una doble digestión del

vector pSGEM con el par de enzimas que generan sitios complementarios a los del inserto, necesarios para realizar el subclonado direccional de cada subunidad. Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes a los insertos y vectores se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La integridad de los productos purificados fue verificada mediante gel de agarosa al 1% y los mismos fueron cuantificados utilizando un espectrofotómetro de UV visible (NanoDrop 1000, Thermo scientific). La reacción de ligación fue realizada empleando ligasa T4 (Life Technologies) con las siguientes relaciones inserto: vector: 3:1, 5:1, 8:1. La cantidad de inserto necesaria en cada caso fue calculada según la fórmula:

$$ng\ inserto = \frac{ng\ vector \cdot kb\ inserto}{kb\ vector} (inserto:vector)$$

En los 3 casos, se incubó la reacción durante 15-60 minutos a 25°C.

El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes preparadas en el laboratorio (provenientes de la cepa Dh5 $\alpha$  de *E.coli* con una eficiencia de transformación de  $\sim 10^8$  UFC/ $\mu$ g). Las colonias obtenidas se repicaron en medio LB líquido + ampicilina y los cultivos se utilizaron para obtener ADN plasmídico utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purifications System (Promega). La identidad y presencia del inserto, con la orientación correcta dentro del vector (

Figura 11) se analizó mediante mapeos de restricción y luego fue corroborada mediante secuenciación por el método de Sanger (Macrogen), aprovechando las regiones del plásmido generadas para utilizar primers estándar (M13F y M13R).

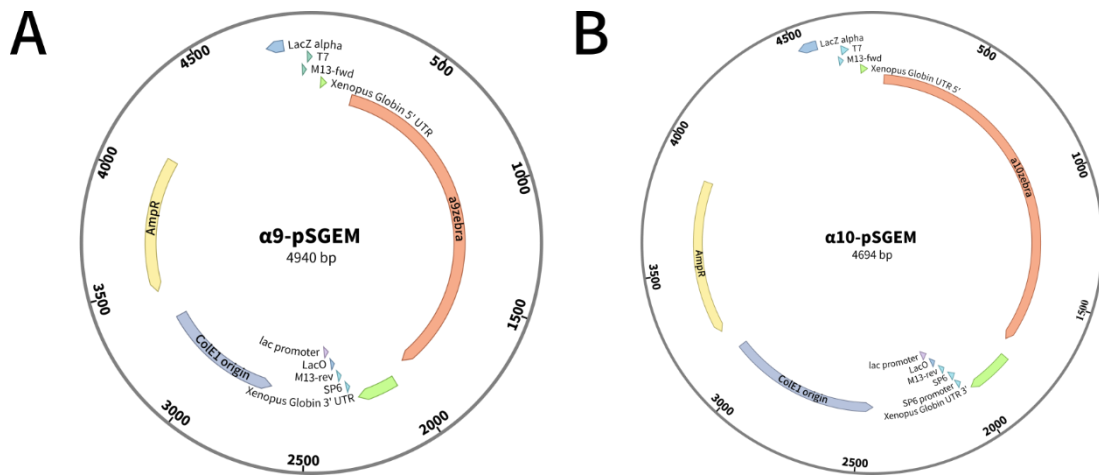


Figura 11 | Mapa de los vectores pSGEM que contienen los ADNc de nAChRs de pez cebra.

La región codificante de los genes  $\alpha 9$  (A) y  $\alpha 10$  (B) de *D. rerio* se muestra en naranja. Los indicadores verdes muestran las posiciones de los UTR de  $\beta$ -globina de *X. laevis*. Los indicadores celestes muestran la posición de los promotores para la T7 ARN polimerasa y en amarillo se muestra el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa el cual confiere resistencia a la ampicilina.

## Análisis bioinformático.

Se descargaron las secuencias codificantes de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (chrna9 y chrna10) de pez (*Danio rerio*), rana (*Xenopus tropicalis*), pollo (*Gallus gallus*) y rata (*Rattus norvegicus*) de la base de datos genómica Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Los genes fueron anotados automáticamente, sin verificación ni corrección alguna. Con las secuencias aminoacídicas generadas a partir de dichas secuencias codificantes, se realizaron alineamientos múltiples utilizando la herramienta ClustalW dentro del software MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis - Kumar et al., 2016) y se calcularon los porcentajes de identidad. Dichos alineamientos fueron graficados y coloreados según su nivel de conservación utilizando el software Jalview Version 2 (Waterhouse et al., 2009).

# Electrofisiología

## Preparación de ARNc para la expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis*

Los ADNc de las subunidades  $\alpha 9$  (crhna9) y  $\alpha 10$  (chrna10) de pez cebra, contenidos en plásmidos pSGEM, fueron linealizados con la enzima de restricción SbfI, en el caso de  $\alpha 9$ , y NheI en el caso de  $\alpha 10$  (todas las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas a New England Biolabs). Los productos de digestión fueron purificados con el kit PureLink PCR Purification (Thermo Fisher Scientific). La linealización de los plásmidos se confirmó de manera visual utilizando geles de agarosa al 1% con el marcador de peso molecular 1 kb ladder (Invitrogen) y se realizó una cuantificación y evaluación de su pureza utilizando un espectrofotómetro de UV visible (NanoDrop 1000, Thermo scientific). Una vez linealizados, los plásmidos fueron utilizados como templado para la síntesis *in vitro* de ARNc mediante el kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (Promega). Las reacciones de transcripción se realizaron en presencia de un análogo de la caperuza Me7G(5')ppp(5')G (Promega), en proporción 4:1 con respecto al GTP. Se confirmó la transcripción de los ARNc utilizando geles de agarosa 1% y se midió su concentración utilizando un espectrofotómetro de UV visible (NanoDrop 1000, Thermo scientific). Posteriormente los ARNc fueron utilizados para la microinyección de oocitos de *Xenopus laevis*.

## Obtención de oocitos de *Xenopus laevis*

Se utilizaron hembras de *Xenopus laevis* obtenidas comercialmente (Nasco). Se mantuvieron en un bioterio adecuado, de ambiente controlado (16-18°C), con un régimen de 12:12hs luz/oscuridad, en grupos de dos, en recipientes de 10 litros con agua limpia libre de cloro, y alimentadas dos veces a la semana. Para la obtención de los oocitos, las ranas fueron anestesiadas con 1 g/ml de etil éster de ácido 3-aminobenzoico (Sigma-Aldrich) disuelto en el agua. Mediante una pequeña incisión en el abdomen, fueron extraídos lóbulos de uno de los ovarios. Los oocitos maduros fueron parcialmente separados bajo lupa con ayuda de

pinzas y luego tratados con una solución de colagenasa tipo I 2 mg/ml (Worthington Biochem Corp.), disuelta en una solución salina sin  $\text{Ca}^{2+}$  de la siguiente composición (en mM): NaCl 96, KCl 2, HEPES 5,  $\text{MgCl}_2$  5, pH 7.6, con agitación lenta para remover la capa folicular durante 4 horas. Luego, los oocitos fueron lavados varias veces con la misma solución para eliminar los restos de colagenasa. Oocitos de estadios maduros (estadios V y VI) fueron seleccionados bajo lupa de acuerdo a su tamaño y apariencia y los restos de epitelio ovárico fueron removidos manualmente, con pinzas de disección. Luego se los mantuvo a 18°C en una solución de Barth's (en mM: NaCl 88,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.33,  $\text{CaCl}_2$  0.41, KCl 1,  $\text{MgSO}_4$  0.82,  $\text{NaHCO}_3$  2.4, HEPES 10) y los antibióticos gentamicina y tetraciclina a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ , pH 7.6, en grupos de no más de 25 oocitos por vial.

### Inyección de oocitos de *Xenopus laevis*

Los oocitos, previamente seleccionados, fueron inyectados dentro de las 24 hs posteriores a su extracción y colagenización. La inyección del ARNc se realizó utilizando un microinyector automático (Drummond Scientific Company) y capilares de vidrio (Drummond Scientific Company), estirados por calor utilizando un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd). Las pipetas se llenaron con aceite mineral y en su extremo se cargaron con 2-4  $\mu\text{l}$  de solución de ARNc. Los oocitos se colocaron en una caja de Petri de 35 mm de diámetro cuyo fondo posee una membrana de polietileno enrejada que limita su movimiento y se inyectaron individualmente. Para el estudio de receptores homoméricos, los oocitos fueron inyectados con 0.01-1 ng (50 nl) de ARNc correspondiente a la subunidad  $\alpha 9$  o  $\alpha 10$ . Para estudiar el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , los oocitos fueron inyectados con ARNc conteniendo cantidades equimolares de las subunidades recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  o una relación 1  $\alpha 9$ : 2  $\alpha 10$  (ver sección "Sensibilidad al agonista ACh" en Resultados).

### Registros electrofisiológicos

Dos a siete días después de la inyección, se evaluaron las propiedades de los receptores recombinantes expresados por los oocitos mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC, por sus siglas en inglés).

Figura 12). Se utilizaron micropipetas de vidrio (resistencia  $\sim 0.5-2\text{ M}\Omega$ ) estiradas por calor con un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón). Las mismas fueron llenadas con una solución de KCl 3 M. Los electrodos de registro de Ag/AgCl, insertos en las micropipetas, se conectaron a los cabezales de un amplificador Geneclamp 500 (Molecular Devices Inc.). Cada cabezal se acopló a un micromanipulador para el posicionamiento fino de los electrodos. La preparación fue llevada a tierra utilizando un alambre de Ag/AgCl sumergido en una solución de KCl 3 M conectada al baño a través de un puente de KCl-agar. La generación de protocolos de voltaje y la adquisición de datos se realizaron mediante una tarjeta analógico-digital Digidata 1200 (Molecular Devices Inc.) y el programa pClamp 7.0 (Molecular Devices Inc.) A menos que se especifique, todos los registros se realizaron a un potencial de sostén de  $-70\text{ mV}$ . Durante los registros electrofisiológicos, los oocitos fueron sometidos a un flujo continuo ( $\sim 10\text{ ml/min}$ ) de solución de Ringer (en mM: NaCl 115, KCl 2.5,  $\text{CaCl}_2$  1.8 y HEPES 10, pH 7.2). En todos los casos la ACh fue añadida al baño, diluida en la solución de perfusión, a partir de soluciones madre de una concentración 100 mM. Los lavados entre aplicaciones de drogas se realizaron mediante la perfusión continua de solución de Ringer durante 3 min para evitar la desensibilización de los receptores.

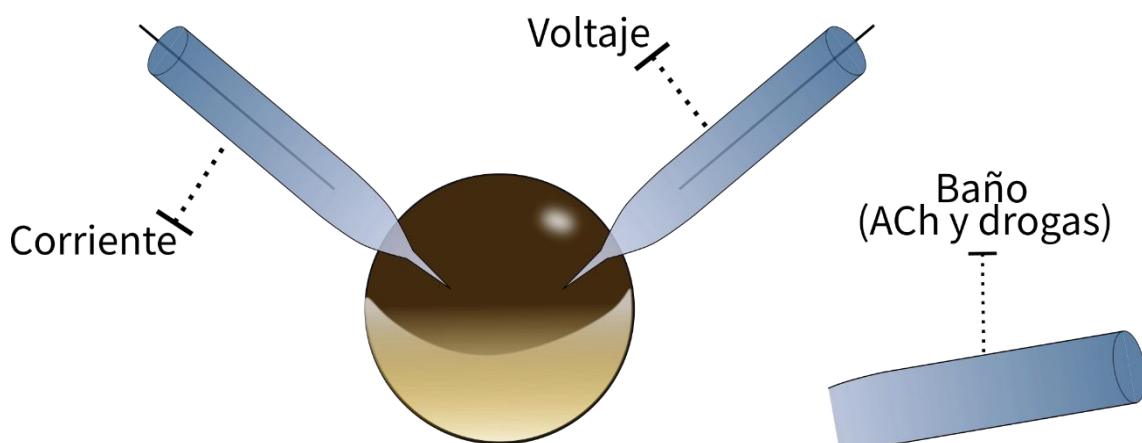


Figura 12 | Esquema de la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos en oocitos de *X. laevis*.

Debido al gran tamaño del oocito y al tamaño de las corrientes que se generan a través de los canales expresados de manera heteróloga, se requieren dos electrodos, uno para sensor cambios en el voltaje y otro para inyectar corriente (y ajustar el voltaje de membrana). La ACh y otras drogas son aplicadas a través del baño que constantemente circula alrededor del oocito

Los oocitos poseen canales endógenos de cloruro activables por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{ICl}_{\text{Ca}}$ ) (Boton et al., 1989; Miledi and Parker, 1984). Para minimizar la activación de estos canales, en respuesta a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores recombinantes, los oocitos fueron incubados en presencia del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM (acetoximetilester del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetra acético) en concentración 100  $\mu\text{M}$ , durante las 3 horas previas a los registros electrofisiológicos. El BAPTA-AM es capaz de atravesar la membrana, y una vez dentro del citoplasma es escindido por las esterasas endógenas pasando a su forma ácida, lo cual impide que vuelva a atravesar la membrana plasmática. En los experimentos que se utilizaron soluciones extracelulares conteniendo concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ , se emplearon oocitos inyectados con 7.5 ng de un oligonucleótido (5'GCTTTAGTAATTCCCATCGTCCCATGTTTC 3') antisentido del ARN mensajero de conexina-38 (Ebihara, 1996; Gerzanich et al., 1994; Katz et al., 2000), para minimizar la activación de las corrientes catiónicas no selectivas a través de los canales hemi-gap junction del oocito, activadas por la disminución de la concentración extracelular de iones divalentes.

## Caracterización de los receptores

### Farmacología

Para evaluar el comportamiento de cada receptor ante los diferentes compuestos de interés, se tomaron dos aproximaciones. Si el compuesto era, potencialmente, un agonista, simplemente se aplicó el mismo durante 1 minuto para evaluar la respuesta. En el caso de aquellos compuestos con potencialidad de ser antagonistas, se pre-aplicó la droga a evaluar durante un minuto previo a la co-aplicación de la misma con ACh.

### Curvas concentración – respuesta

Para cada receptor, las curvas concentración-respuesta se obtuvieron normalizando las amplitudes de las respuestas obtenidas en las diferentes concentraciones de ACh a la respuesta máxima del agonista en cada oocito. Se grafican las medias y los errores estándar de las medias (S.E.M.) de todos los oocitos ensayados.



## Evaluación de la modulación por Ca<sup>2+</sup> extracelular

El efecto del Ca<sup>2+</sup> extracelular sobre las respuestas a ACh de los nAChRs estudiados se analizó midiendo las amplitudes de respuesta a ACh, 10 µM en el caso del receptor homomérico α9 y 300 µM para el receptor heteromérico α9α10, al variar la concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular desde 0 nominal a 3 mM en una solución salina normal. Los valores de las amplitudes de respuesta obtenidas para cada concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular fueron normalizados a la amplitud obtenida en Ca<sup>2+</sup> 1.8 mM.

## Desensibilización

Para evaluar los patrones de desensibilización de ambos tipos de receptores se realizaron aplicaciones prolongadas de ACh durante 1 minuto a una concentración equivalente a un orden de magnitud superior al CE<sub>50</sub> de cada receptor. Se evaluó el porcentaje de corriente remanente a los 20 segundos luego del pico de respuesta a la ACh para estimar un “índice de desensibilización”.

## Evaluación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> por activación de la corriente secundaria de Cl de los oocitos.

La entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los diferentes receptores se evaluó analizando la activación de la corriente de Cl endógena de los oocitos (ICl<sub>Ca</sub>). Se midió la amplitud de la respuesta evocada por la CE<sub>50</sub> de ACh de cada receptor antes y después de 3 horas de incubación con el quelante de Ca<sup>2+</sup> BAPTA-AM para cada oocito. Se calculó el porcentaje de respuesta remanente luego de la incubación (% de respuesta post-BAPTA). Se promediaron los valores obtenidos para todos los oocitos ensayados, para cada uno de los diferentes receptores.

## Curvas corriente – potencial

El protocolo de estimulación para obtener las curvas de corriente en función del potencial (curvas I-V) consistió en una rampa lineal desde -120 a +50 mV con una duración de 2 segundos, partiendo de un potencial de sostén de -70 mV. Las rampas se efectuaron durante la aplicación de ACh 1 o 30 µM (para α9 y α9α10, respectivamente), 3 segundos luego de que la respuesta alcanzara la meseta. La corrección de las corrientes de fuga se realizó mediante la sustracción digital

del promedio de dos curvas I-Vs obtenidas mediante la aplicación de rampas de voltaje realizadas antes y después de la aplicación de la ACh en la misma solución del registro. Debido a que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  presenta una marcada desensibilización, se corroboró el perfil de las curvas I-V mediante el registro de la corriente evocada por ACh 300  $\mu\text{M}$  al fijar el potencial de oocito en distintos valores “punto por punto” (de -120 a +50 mV). Para poder comparar las curvas IV de los diferentes receptores, se normalizó la magnitud de todas las respuestas a aquella obtenida a +50 mV. La rectificación de los receptores fue estudiada obteniendo la relación entre la amplitud de corriente a +40 y a -90 mV.

### Análisis estadístico

Los ajustes de las curvas y los análisis estadísticos de los registros electrofisiológicos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 6.01 para Windows (GraphPad Software).

Para evaluar los datos de las curvas concentración-respuesta los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación empírica de Hill:

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{[A]^n}{[A]^n + CE_{50}^n}$$

donde I es la amplitud de la corriente producida por el agonista a una concentración [A]; Imax es la amplitud de la corriente máxima producida por una concentración saturante del agonista; CE<sub>50</sub> es la concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima y n es el coeficiente de Hill. De esta manera se estableció un CE<sub>50</sub> para cada receptor.

Se utilizaron tanto el test de normalidad de Shapiro-Wilks como el de D'agostino y Pearson y el de Anderson-Darling para analizar la distribución de los datos y definir el tipo de test estadístico a implementar sobre cada set de datos (paramétricos o no paramétricos). Utilizamos la prueba de t de Student pareada o no pareada (con corrección de Welch cuando fue necesario) o sus versiones no paramétricas, la prueba de Wilcoxon y la prueba de Mann-Whitney, para comparar dos poblaciones de datos.

Para evaluar los datos de los experimentos de modulación por cationes divalentes, se utilizó un ANOVA de una vía con corrección de Geisser-Greenhouse. Se utilizó un test de comparación múltiple de Bonferroni para evaluar las diferencias entre las medias de los diferentes grupos. Se reporta significancia estadística con un  $\alpha = 0.05$ .

## Imaging *in vivo*

### Mantenimiento y cría de peces cebra.

Se obtuvieron embriones de pez cebra a través de cruzamientos naturales y se criaron según los lineamientos de “The Zebrafish book” (Westerfield, 2000). Larvas de entre 5 y 7 dpf se mantuvieron a 28°C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 14:10 h en medio E3 (Tabla 3). Para los experimentos de *imaging in vivo*, a las 24 horas post fertilización se le agregó al medio E3, 0.2 mM de 1-fenil2-thiourea (pTU) para prevenir la formación de pigmento en las larvas. Todos los experimentos fueron realizados con la aprobación del comité de uso de animales del INGEBI.

Componente	Conc. final (en mM)
NaCl	130
KCl	0.5
CaCl <sub>2</sub>	1.3
MgSO <sub>4</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04
NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4

Tabla 3 | Composición del medio de mantenimiento (E3) de embriones de pez cebra.

### Preparación de los peces.

A partir de la cruce de dos líneas transgénicas, se obtuvieron individuos transgénicos dobles Tg[Brn3c:Gal4;UAS:GcAMP7a] que expresan el indicador

fluorescente de calcio genéticamente codificado GcAMP7a en células ciliadas. Larvas de entre 5 y 7 dpf fueron anestesiadas con tricaína metanosulfonato (MS-222) para luego ser fijadas mediante dos sujetadores de tungsteno (ubicados en la cabeza y la cola) en una cámara de registro elaborada con SYLGARD® 184 (Sigma-Aldrich). Para suprimir el movimiento del pez durante el registro de imágenes, se inyectó  $\alpha$ -Bungarotoxina (125  $\mu$ M) directamente en el corazón. Posteriormente, las larvas fueron lavadas con solución extracelular de *imaging* (Tabla 4) sin tricaína y se esperaron 5 minutos para permitir la recuperación.

Ya que en este mismo trabajo demostramos que la  $\alpha$ -Btx es un bloqueante de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  del pez cebra, es necesario mencionar que la utilización de una inyección de esta toxina en el corazón del pez como paralizante responde a que ninguna de las estrategias alternativas que intentamos utilizar fue exitosa. En primera instancia intentamos realizar un pequeño corte en la cola del pez y sumergir brevemente a las larvas en una solución concentrada de  $\alpha$ -Btx, pero esto no paralizó de manera eficiente a los peces y nos impidió realizar una adquisición de imágenes correcta. Por otro lado, evaluamos la posibilidad de agregar tricaína a la solución de registro que se perfunde durante toda la adquisición de imágenes, pero a la concentración necesaria para paralizar a los peces (100  $\mu$ M) esta droga bloquea a los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (ver “Resultados”). Por estos motivos decidimos seguir adelante con la inyección de  $\alpha$ -Btx en el corazón según los lineamientos establecidos en el trabajo de Trapani y Nicolson del año 2010 que demuestra mediante el uso de inmunohistoquímica con anticuerpos anti- $\alpha$ -Btx que la toxina permanece unida de manera no reversible a los receptores musculares pero, al igual que demostramos en este trabajo, su efecto sobre los receptores de las células ciliadas del oído y la línea lateral es reversible. Por estos motivos concluimos que esta técnica resulta adecuada para realizar estudios en la línea lateral sin afectar el funcionamiento normal de las CC.

Componente	Conc. final (en mM)
NaCl	140
KCl	2
CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04
NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4

Tabla 4 | Composición de la solución extracelular de imaging. Siempre antes de realizar los experimentos se controló que el pH fuera 7.3 y la osmolaridad  $310 \pm 10$  osmol/ L.

## Estimulación de los neuromastos

La estimulación de los neuromastos se realizó con un *fluid-jet* desarrollado en nuestro laboratorio (Figura 13-A). La presión se aplicó a través de una jeringa de 15 ml y fue controlada a través de una válvula solenoide cuya apertura y cierre fueron controladas a través de una señal digital TTL (VC-6 valve controller, Warner instruments) que se coordinó mediante el sistema de registro. A la salida del sistema se adhirió una pipeta de vidrio cargada con solución extracelular de *imaging* (diámetro interno de ~30–50  $\mu\text{m}$ ), la cual fue posicionada de tal manera de poder estimular mecánicamente la región apical de la cúpula de los neuromastos ubicados a lo largo del eje anteroposterior del pez. Se corroboró de manera visual que las deflexiones de los cilios provocadas por el estímulo fueran sostenidas durante la duración del mismo sin fluctuaciones. Mediante la aplicación de presión positiva y negativa se logró estimular las células ciliadas con orientaciones de preferencia opuestas. El volumen impulsado a través de la jeringa se mantuvo constante durante todos los experimentos (5 ml) y la presión fue controlada mediante el uso de un manómetro. Los estímulos fueron pulsos cuadrados con una duración de 2 minutos con el fin de activar las células ciliadas con distintos rangos de sensibilidad (Pichler and Lagnado, 2019, 2018; Zhang et al., 2018). El flujo sanguíneo se monitoreó de manera constante a lo largo de cada experimento como métrica de la salud del animal.

## Adquisición de Imágenes de Ca<sup>2+</sup>

### Microscopía de fluorescencia de campo amplio

Los experimentos fueron realizados en un microscopio Olympus BX51WI (Olympus Corporation). Se realizó un seguimiento visual de las preparaciones con contraste de interferencia diferencial (DIC), utilizando un objetivo de inmersión en agua 60X. El plano focal fue ubicado en la zona basal del neuromasto con el objetivo de visualizar la mayor cantidad de células ciliadas posible (Figura 13-B). Con el fin de obtener una mejoría en la relación señal-ruido y en la frecuencia de adquisición, se realizó un *binning* 4x4 de la imagen, obteniendo una resolución final de 0.533  $\mu\text{m}$  por pixel al usar un objetivo de inmersión en agua 60X. Además, el módulo analizador del DIC del microscopio fue removido para evitar el filtrado de la señal fluorescente. El tamaño de la imagen fue fijado en 100x100 px permitiendo una tasa de adquisición de 6.6 imágenes/seg, con un tiempo de exposición de 150 mseg.

La preparación fue iluminada con un sistema LED azul (Tolket) y las imágenes fueron adquiridas utilizando una cámara EM-CCD Andor iXon 885 (Andor Technology Ltd). El sistema de adquisición fue controlado a través de una interfaz creada por Till Photonics, utilizando el software de adquisición Live Acquisition (Till Photonics).

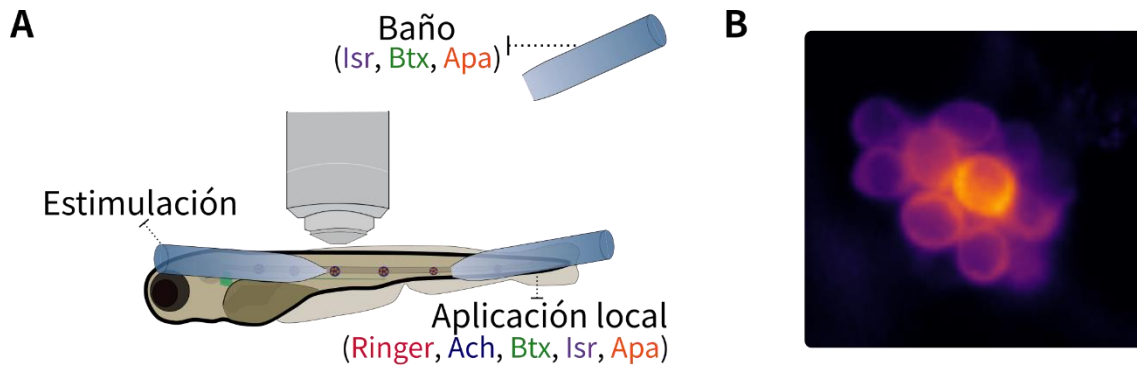


Figura 13 | Esquema de adquisición de Imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  y aplicación de drogas.

A.- Diagrama de la ubicación del fluid-jet (“Estimulación”) y la pipeta mediante la cual se aplican localmente las drogas durante el protocolo (“Aplicación local”). El objetivo del microscopio siempre fue ubicado de tal manera de registrar los neuromastos L2, L3 o L4. Ciertas drogas fueron utilizadas además durante pre-incubaciones a través del baño (“Baño”). B.- Imagen representativa del plano focal de preferencia utilizado para todos los experimentos y ubicado en la zona basal del neuromasto.

### Análisis de imágenes

Las imágenes de fluorescencia fueron procesadas utilizando la distribución FIJI del software ImageJ (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012). Debido a movimientos peristálticos lentos en el intestino del pez (que no son bloqueados con la aplicación de  $\alpha$ -Bungarotoxina), la preparación sufrió ligeros movimientos que fueron corregidos previo al análisis de las imágenes de fluorescencia mediante la aplicación del plug-in StackReg utilizando una transformación traslacional (Thévenaz et al., 1998).

Las imágenes fueron analizadas con rutinas escritas a medida en IgorPro 6.37 (WaveMetrics). Se trazaron a mano regiones de interés (ROIs, por sus siglas en inglés) alrededor de cada célula ciliada visible en el neuromasto. Para cada punto temporal de cada ROI se normalizó la señal de fluorescencia utilizando el valor inicial  $[\Delta F/F_0(\%)]$ . El fotoblanqueo del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  genéticamente codificado fue corregido. Para ello, una vez calculada la señal de fluorescencia en cada ROI, se ajustó una recta entre la línea de base previa a la aplicación del estímulo y la fluorescencia final.

Se detectaron picos en la intensidad de fluorescencia solo durante el período en el cual se estimuló mecánicamente al neuromasto. Para proseguir con el análisis,

solo se utilizaron aquellas células que presentaron un pico de  $\Delta F/F_0$  (%) al ser estimuladas en una sola orientación y, dentro de éstas, aquellos picos cuya amplitud superó en 2.5 desviaciones estándar (S.D.) a la señal de fluorescencia pre-estímulo (Ver Figura 30 en “Resultados”).

### Aplicación local de drogas

Todas las drogas aplicadas fueron disueltas en la solución de registro extracelular (Tabla 4), con la adición de DMSO 0,1%, a partir de un stock generado previamente. Las soluciones fueron cargadas en un sistema de perfusión alimentado por gravedad de seis canales VC-6 (Warner Instruments). Cada canal fue conectado a una tubuladura de polietileno de 0.61 mm de diámetro e insertado en un capilar Drummond Scientific Company (Broomall) de 200  $\mu$ l, cuyo extremo fue previamente estirado con un estirador de pipetas hasta alcanzar un diámetro de  $\sim$ 150  $\mu$ m. El extremo de esta pipeta fue colocado cerca de la cola del pez. La apertura y cierre de la válvula solenoide de cada canal fue registrada a través de una señal eléctrica (TAG) enviada a la placa analógico-digital. Antes de comenzar cada experimento, se verificó que la activación del sistema de perfusión local utilizado no generara movimiento en las cilias del neuromasto a analizar ni activara de manera alguna a las células ciliadas del mismo.

### Protocolo

La adquisición de imágenes de fluorescencia de GCaMP7a consistió en ventanas de 40 segundos divididas como se detalla en la Figura 14.

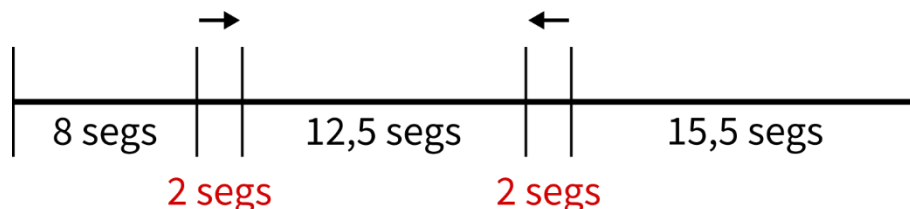


Figura 14 | Protocolo de adquisición de imágenes y estimulación mecánica del neuromasto.



Las flechas ( $\rightarrow$  y  $\leftarrow$ ) indican la aplicación de un estímulo que genera la deflexión de los cilios de los neuromastos en el sentido anterior-posterior, y viceversa, respectivamente.

En el caso de los estudios con isradipina, la droga fue aplicada a través del baño y los peces fueron pre-incubados por 5 minutos antes de la adquisición de las imágenes de fluorescencia.

Para los experimentos con ACh, la droga fue aplicada de manera local a partir del comienzo del protocolo de adquisición de imágenes y hasta el cierre del segundo estímulo ( $\leftarrow$ ).

La  $\alpha$ -Btx y la apamina fueron pre-aplicadas a través del baño durante 1 minuto antes del comienzo del protocolo de adquisición de imágenes y también aplicadas de manera local a partir del comienzo del protocolo de adquisición de imágenes y hasta el cierre del segundo estímulo ( $\leftarrow$ ).

En el caso de los experimentos de co-aplicación ( $\alpha$ -Btx + ACh, apamina + ACh), las toxinas fueron pre aplicadas como se mencionó previamente y luego co-aplicadas con la ACh a partir del comienzo del protocolo de adquisición de imágenes y hasta el cierre del segundo estímulo ( $\leftarrow$ ).

## Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados en un mínimo de 8 animales (1 neuromasto por animal) y en, al menos, tres días independientes. Los gráficos y los análisis estadísticos fueron realizados utilizando código personalizado escrito en el lenguaje Python (Python 3.7), utilizando los paquetes pandas, Scipy, numpy, lpython, matplotlib y seaborn (Hunter, 2007; McKinney, 2010; Pérez and Granger, 2007; Virtanen et al., 2020; Walt et al., 2011). La normalidad fue analizada utilizando el test de Shapiro-Wilk. Ya que los datos no siguieron una distribución normal, la significancia estadística entre dos condiciones fue determinada utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Para este tipo de análisis, el tamaño de los efectos fue calculado utilizando la Correlación Biserial de Rangos Pareados (CBRP), que representa la diferencia simple entre la proporción de evidencia favorable contra la evidencia no favorable (Kerby, 2014). Para evaluar la reversibilidad del efecto de la ACh, se realizó un test de

Friedman con una comparación múltiple de Dunn entre cada condición (aplicación de ACh y lavado) con el control inicial. Por su parte, para evaluar si la fluorescencia basal de las células ciliadas no cambiaba en presencia de acetilcolina, se realizó un test de t pareado. Finalmente, para evaluar la existencia de diferencias del efecto inhibitorio de la ACh entre células con diferente orientación de preferencia, se utilizó un test de Mann-Whitney. La significancia estadística se reporta en todos los casos con un  $\alpha = 0.05$ .

## Drogas Utilizadas

Las siguientes drogas y sales fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Argentina): Cloruro de acetilcolina (ACh), BAPTA-AM, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, gentamicina, tetraciclina, isradipina, DMSO. Por su parte, la  $\alpha$ -bungarotoxina y la apamina fueron adquiridas de Alomone. La colagenasa fue adquirida en Worthington Biochem Corp. Para los experimentos en oocitos de *Xenopus*, las soluciones de trabajo de ACh fueron preparadas mediante dilución en solución salina normal, a partir de alícuotas de soluciones madre de concentración 100 mM en agua conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El BAPTA-AM se disolvió en DMSO en una concentración 100 mM y se almacenó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las alícuotas se descongelaron y se diluyeron 1000 veces en solución salina normal en el momento de ser utilizadas. En el caso de los experimentos *in vivo*, las drogas fueron llevadas a su concentración de trabajo mediante su disolución en solución extracelular de *imaging*, con el agregado de DMSO 0.1%, para incrementar su accesibilidad a las CC en larvas de pez intactas (Sheets, 2017; Sheets et al., 2012; Toro et al., 2015; Trapani and Nicolson, 2011; Wong et al., 2019; Zhang et al., 2018).

# RESULTADOS

Expresión génica, clonado y caracterización funcional de las subunidades de nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra.

## Expresión génica

En una primera aproximación nos propusimos descifrar la identidad molecular de los actores principales que intervienen en la sinapsis eferente de la línea lateral posterior del pez cebra. Para ello, a partir de un conjunto de estudios recientemente publicados (Erickson and Nicolson, 2015; Lush et al., 2019; Matern et al., 2018; Steiner et al., 2014), evaluamos en CCs de pez cebra los niveles de expresión génica de los genes que codifican para las principales proteínas expresadas en todas las sinapsis colinérgicas eferentes descritas hasta el momento. Estas son las subunidades de los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (codificados por los genes *chrna9* y *chrna10*, respectivamente) y el canal de potasio activado por calcio SK2 (codificado por el gen *kcnn2*). Dado que existe evidencia de la expresión de otros canales del tipo SK en órganos sensoriales del pez cebra (Cabo et al., 2013), también evaluamos la expresión de *kcnn1a*, *kcnn1b* y *kcnn3* (genes que codifican para los canales SK1a, SK1b y SK3, respectivamente).

Realizamos la recolección de los datos de expresión génica de estudios de microarreglos y RNA-seq de célula única (Tabla 2 en “materiales y métodos”), a partir de los cuales evaluamos el enriquecimiento de los genes de interés en CCs de pez cebra. Para poder comparar los resultados obtenidos de los diferentes estudios, utilizamos los datos pre-procesados de libre acceso normalizados, corregidos y con su valor *p* ajustado para cada caso. A partir de estos datos, calculamos el cambio relativo en la expresión de cada gen de interés en las células ciliadas (medido como *Log2 Fold Change*), con respecto al control para cada estudio.

Como se muestra en la Tabla 5, en todos los estudios analizados, chrna9 muestra una expresión significativamente enriquecida en las células ciliadas con respecto a su control (células de la piel para Steiner et al., 2014, larva entera en el caso de Matern et al., 2018, células sin marcación con tirouracilo en Erickson et al., 2015 y células no-ciliadas del neuromasto en el caso de Lush et al., 2019). Por otro lado, chrna10, no presentó un enriquecimiento significativo en las células ciliadas en ninguno de los estudios analizados (Tabla 5).

Dos (Steiner et al., 2014 y Matern et al., 2018) de los cuatro estudios analizados muestran una expresión enriquecida de kcnn2 y kcnn1a en las células ciliadas, con un enriquecimiento particularmente notorio de kcnn2 (Log<sub>2</sub> Fold change de 3.958601, valor p ajustado 5.91E-06) en el caso de Steiner et al., 2014. Los genes que codifican para los canales SK1b y SK3 no presentaron un enriquecimiento significativo en ninguno de los estudios analizados.

Analizamos luego en las células ciliadas del pez cebra la expresión diferencial de genes conocidos como marcadores de células ciliadas internas y externas de la cóclea. En particular, y dada la importancia del calcio para activar canales de SK2 en las sinapsis eferentes (Fuchs and Murrow, 1992), nos enfocamos en genes involucrados en la homeostasis celular del calcio (Ranum et al., 2019). Como marcadores de CCI analizamos los genes Otof (que codifica para la proteína Otoferlina), Atp2a3 (que codifica para una bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del retículo sarco/endoplásmico) y Tpbgl (que codifica para la glucoproteína símil trofoblástica). Como marcadores de CCEs analizamos los genes Ocm (que codifica para la proteína oncomodulina), Sri (que codifica para la proteína sorcina) y Slc26a5 (que codifica para la proteína prestina). Como se indica en la Tabla 7, las células ciliadas del pez cebra presentan un patrón de expresión mixto entre las CCI y CCE de la cóclea, ya que poseen expresión enriquecida tanto de Otofa y Otofb, como de uno de los ortólogos de Ocm (Pvalb 8) y, a su vez, poseen una expresión relativa menor que en los controles en el caso de Tpbgl y Sri.

Gen	ID Ensembl	Matern et al. (2018)		Erickson et al. (2015)		Steiner et al. (2014)		Lush et al. (2019)	
		Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj	Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj	Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj	Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj
Chrna9 (+)	ENSDARG00000054680	3.655976	8.05513E-13 <sup>(*)</sup>	2.08078	0.040471217 <sup>(*)</sup>	4.239971	4.78929E-11 <sup>(*)</sup>	0.892044	7.8278E-116 <sup>(*)</sup>
chrna10	ENSDARG00000011113	0.162382	1	-0.15769	1	0.03275	0.849872	-	-
Kcnn1a (+)	ENSDARG00000091306	1.34144	0.001182439 <sup>(*)</sup>	-0.46363	1	0.789479	0.0218807 <sup>(*)</sup>	-	-
Kcnn1b	ENSDARG00000023546	0.120795	1	0.2286	1	0.11828	0.565259	-	-
Kcnn2 (+)	ENSDARG00000014939	1.484557	0.000490792 <sup>(*)</sup>	0.151657	1	3.958601	5.91E-06 <sup>(*)</sup>	-	-
kcnn3	ENSDARG00000019753	-0.96006	0.413984684	-0.44232	1	0.096667	0.60571	-	-

Tabla 5 | La expresión de las subunidades de nAChRs  $\alpha 9$  (pero no  $\alpha 10$ ), SK1a y SK2 se encuentra enriquecida en las CC del pez cebra.

Niveles de expresión diferencial medidos en Log2 Fold Changes y valores p ajustados a FDR (Ver "Materiales y métodos) de los genes de interés. (+) gen que presenta enriquecimiento en las CCs en al menos uno de los estudios. (\*) valor p ajustado a FDR significativo.

Gen Ratón	ID Ensembl	Expresado diferencialmente en:	Gen pez	ID Ensembl
Otof	ENSMUSG00000062372	CCI	Otofa	ENSDARG00000030832
Otof	ENSMUSG00000062372	CCI	Otofb	ENSDARG00000020581
Atp2a3	ENSMUSG00000020788	CCI	Atp2a3	ENSDARG00000060978
Tpbgl	ENSMUSG00000096606	CCI	Tpbgl	ENSDARG00000114338
Ocm	ENSMUSG00000029618	CCE	Pvalb8 (Ocma)	ENSDARG00000037790
Ocm	ENSMUSG00000029618	CCE	Pvalb9 (Ocmb)	ENSDARG00000071601
Sri	ENSMUSG00000003161	CCE	Sri	ENSDARG00000058593
Slc26a5	ENSMUSG00000029015	CCE	Slc26a5	ENSDARG00000022424

Tabla 6 | Genes marcadores de CCI y CCE en ratones y sus ortólogos en pez cebra.

Gen	Ensembl ID	Matern et al. (2018)			Erickson et al. (2015)			Steiner et al. (2014)			Lush et al. (2019)		
		Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj	Log <sub>2</sub> FC	adj p-val	Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj	Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj	Log <sub>2</sub> FC	p-val. aj		
Otofa <sup>(+)</sup>	ENSDARG00000030832	0,88965148	3,7137E-10 <sup>(*)</sup>	0,62295658	0,89346956	-0,12409572	0,231049	1,21878049	9,6316E-85 <sup>(*)</sup>				
Otofb <sup>(+)</sup>	ENSDARG00000020581	2,20100105	2,598E-26 <sup>(*)</sup>	2,05068371	2,723E-09 <sup>(*)</sup>	6,42418141	9,908E-10 <sup>(*)</sup>	2,2582192	3,065E-126 <sup>(*)</sup>				
Atp2a3	ENSDARG00000060978	0,25528714	7,9957E-06 <sup>(*)</sup>	0,12840786	1	-0,48059095	0,182244	-	-				
Tpbgl <sup>(-)</sup>	ENSDARG00000114338	-1,61336777	1	-0,37109415	1	-1,66152424	0,00395269 <sup>(*)</sup>	-	-				
Pvalb8 (Ocra) <sup>(+)</sup>	ENSDARG00000037790	2,26047837	5,5933E-10 <sup>(*)</sup>	1,02734363	0,08295998	1,4739635	0,119131	3,43935536	1,6545E-64 <sup>(*)</sup>				
Pvalb9 (Ocmb)	ENSDARG00000071601	1,09322605	2,1455E-13 <sup>(*)</sup>	0,62890585	0,86056699	0,16135887	0,797271	-	-				
Sr <sup>(-)</sup>	ENSDARG00000058593	-2,5846003	0,00713216 <sup>(*)</sup>	0,10257108	1	-1,72621917	3,1061E-11 <sup>(*)</sup>	-	-				
Slc26a5	ENSDARG00000022424	-2,58589376	0,11666831	-0,06297186	1	0,36413536	0,157046	-	-				

Tabla 7 | Expresión de genes involucrados en la homeostasis del calcio.

Niveles de expresión diferencial medidos en Log2 Fold Changes y valores p ajustados a FDR de los genes de interés a lo largo de los diferentes estudios utilizados. (+) gen que presenta enriquecimiento en las CCs en al menos uno de los estudios. (-) gen que presenta una expresión relativa menor que los controles en las CCs en al menos uno de los estudios. (\*) indica un valor p ajustado significativo.

---

## Conclusión

En su conjunto, los resultados de expresión génica indican que tanto el gen que codifica para la subunidad de nAChRs  $\alpha 9$  como los que codifican para los canales SK1a y SK2 están enriquecidos en las células ciliadas de los neuromastos de pez cebra. Sin embargo, y a diferencia de lo reportado en el sistema eferente a las células ciliadas del oído interno (Elgoyhen et al., 2001; Sgard et al., 2002), los neuromastos de la línea lateral del pez cebra no muestran enriquecimiento en la expresión de chrna10. Estos resultados se condicen con experimentos de hibridación in situ, realizados en colaboración con el laboratorio de la Dra. Plazas y que, en su conjunto, fueron publicados en Carpaneto Freixas et al., 2021.

## Clonado de las subunidades de nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de pez cebra

Partiendo de ARN total, realizamos una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR, del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction), con primers diseñados específicamente para aislar el ADNc de los genes que codifican para los presuntos receptores colinérgicos nicotínicos  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra (chrna9 y chrna10, respectivamente). Una vez amplificados los ADNc, estos fueron insertados mediante el sistema de clonado TOPO-TA en un vector pCR™2.1-TOPO® utilizando un kit diseñado con este fin (ver “Materiales y métodos”). Los fragmentos clonados en los vectores pCR™2.1-TOPO® fueron secuenciados para confirmar su identidad y luego subclonados en el vector pSGEM (optimizado para la expresión en oocitos de *Xenopus laevis*), utilizando métodos de clonado tradicional.



Al inicio de esta tesis de Doctorado (abril 2015) la versión disponible del genoma de pez cebra era la GRCz10 ("Danio rerio - Ensembl genome browser 91"). En dicha versión estaban anotadas de manera predictiva dos secuencias codificantes para la subunidad  $\alpha 9$  del nAChR, una en el cromosoma 1 (ENSDARG00000054680) y otra en el cromosoma 14 (ENSDARG00000011029), y dos para la subunidad  $\alpha 10$ , una en el cromosoma 15 (ENSDARG00000011113) y otra en el cromosoma 21 (ENSDARG00000044353). La existencia de dichos ohnólogos se explica por una duplicación ancestral en el genoma de los peces, que en muchos casos resultaron en la duplicación de proteínas funcionales (Prince and Pickett, 2002; Seiler, 2005).

Teniendo esto en mente, utilizamos las secuencias de los 4 genes para diseñar primers específicos que fueran útiles para amplificar las regiones codificantes de cada uno. No tuvimos mayores dificultades para ampliar el chrna9 del cromosoma 1 (ENSDARG00000054680) y el chrna10 del cromosoma 15 (ENSDARG00000011113), pero a pesar de haber realizado múltiples ensayos de RT-PCR con diferentes condiciones e incluso cambiando el diseño de los primers, no logramos amplificar las dos potenciales "copias" presentes en el cromosoma 14 (ENSDARG00000011029) y el cromosoma 21 (ENSDARG00000044353). Posteriormente, con la publicación del genoma de referencia GRCz11 en donde dichas secuencias fueron removidas y, sumado al hecho de que no se reporta su expresión en ninguno de los estudios anteriormente mencionados en este trabajo, consideramos que a pesar de que las secuencias existan a nivel genómico, estas probablemente no sean funcionales y por lo tanto fueron descartadas. Sumado a esto, en los trabajos previos del laboratorio, donde se realizaron hibridaciones *in situ* en larvas enteras utilizando sondas específicas diseñadas para unirse a regiones no conservadas de cada uno de estos potenciales genes, no se logró detectar la expresión de ninguno de estos genes bajo ninguna condición experimental testada (Castagnola.,2017).

Realizamos un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de las subunidades de nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra con las de otras especies de vertebrados previamente descritas (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Lipovsek et al.,

2012; Marcovich et al., 2020). La subunidad  $\alpha 9$  de pez cebra presentó un porcentaje de identidad promedio (% IDseq) de 69.8% con respecto a subunidades  $\alpha 9$  del resto de las especies y la subunidad  $\alpha 10$  un % IDseq de 62.6% con respecto a las subunidades  $\alpha 10$  del resto de las especies. El % IDseq global fue de 62.3%. De acuerdo a lo reportado para la familia de subunidades de receptores colinérgicos nicotínicos, las regiones más conservadas son, el Cys-loop (marcado con una línea roja en la Figura 15) y las regiones transmembrana. Por otro lado, la mayor variabilidad de secuencia se observa hacia el extremo N-Terminal, y en las regiones intracelulares, principalmente en el loop que se forma entre los pasos transmembrana 3 y 4 (TM3-TM4, región de baja identidad en la Figura 15).

---

Figura 15 | Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las subunidades de nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  del pez cebra, rana, pollo y ratón.

Con recuadro punteado rojo se remarcan las secuencias de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra. La línea roja indica el Cys-loop. El esquema de colores indica el % de identidad de secuencia, un tono más oscuro representa una mayor conservación.



## Caracterización funcional de receptores mediante la expresión heteróloga de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de pez cebra

### Expresión de ARNc en oocitos de *X. laevis*

Con el objetivo de analizar las posibles combinaciones de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  que resultan en nAChRs funcionales, y analizar sus propiedades farmacológicas y biofísicas, se realizó una transcripción *in vitro* de los ARNc previamente clonados y se los inyectó en oocitos de *X. laevis*. Las respuestas a la aplicación de acetilcolina fueron registradas utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC, por sus siglas en inglés).

Trabajos previos han reportado que las subunidades  $\alpha 9$  de *Rattus norvegicus* (rata), *Xenopus tropicalis* (rana) y *Gallus gallus* (pollo) pueden formar receptores homoméricos funcionales. Más aún, los receptores  $\alpha 10$  homoméricos sólo son funcionales en el caso de las subunidades de pollo y rana, pero no de rata (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020). En el caso del pez cebra, oocitos inyectados con ARNc codificante para la subunidad  $\alpha 9$  presentaron corrientes entrantes en respuesta a ACh (10  $\mu$ M), a un voltaje de sostén de -70 mV, indicando que, al igual que en el resto de las especies mencionadas, esta subunidad puede formar receptores homoméricos funcionales ( $I_{ACh10} 425.52 \pm 55.00$  nA,  $n= 28$ , Figura 16-A). Por otro lado, y a diferencia de lo observado con la subunidad  $\alpha 9$ , la inyección de ARNc de  $\alpha 10$  de pez cebra no resultó en la expresión de receptores homoméricos funcionales, dado que no se observó respuesta a ACh 1 mM (Figura 16-C).

Cuando se co-inyectó ARNc codificante para ambas subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ , se observaron corrientes entrantes en respuesta a ACh (10  $\mu$ M) a un voltaje de sostén de -70 mV (Figura 16-B). Es interesante remarcar que, en contraste a lo reportado para los receptores de rata (Elgoyhen et al., 2001), la presencia de  $\alpha 10$  no generó un incremento en la amplitud de las corrientes del receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  ( $I_{ACh300} 292.05 \pm 52.13$  nA,  $n= 30$ ), cuando se las compara con aquellas del receptor homomérico  $\alpha 9$ . Las respuestas observadas al co-

inyectar ARNc de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  pueden ser la consecuencia del ensamblado y la expresión funcional de receptores homoméricos  $\alpha 9$  y/o heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$ .

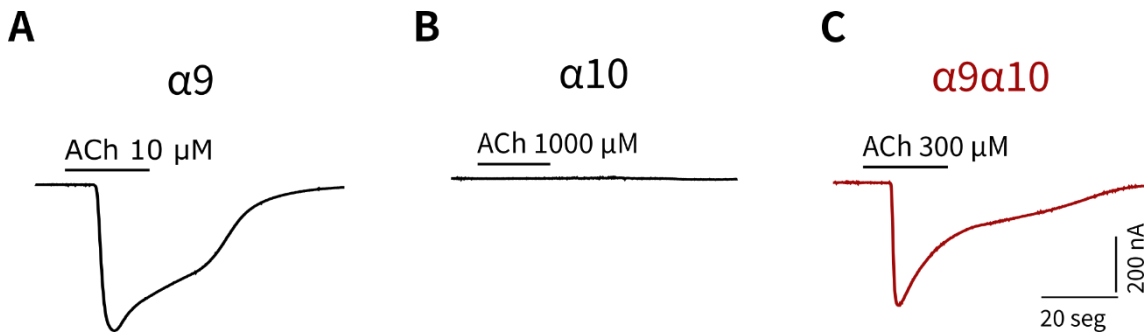


Figura 16 | La subunidad de nAChRs  $\alpha 9$  de pez cebra forma receptores homoméricos y heteroméricos junto con la subunidad  $\alpha 10$ .

A. Respuesta representativa a la aplicación de ACh de un oocito inyectado únicamente con el ARNc de la subunidad  $\alpha 9$  de pez cebra. B. Respuesta representativa a la aplicación de ACh de un oocito inyectado únicamente con el ARNc de la subunidad  $\alpha 10$  de pez cebra. C. Respuesta representativa a la aplicación de ACh de un oocito inyectado tanto con el ARNc de la subunidad  $\alpha 9$  como con el de la subunidad  $\alpha 10$  (en una proporción 1:2) de pez cebra.

### Sensibilidad al agonista ACh

Con el objetivo de estimar la afinidad aparente de la ACh por el receptor homomérico  $\alpha 9$  y heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , se realizaron curvas concentración-respuesta para este agonista. Los valores de amplitud de corriente normalizada a la respuesta máxima, para las distintas concentraciones de ACh, fueron ajustados a la ecuación empírica de Hill, obteniéndose los valores de la  $\text{CE}_{50}$  para cada uno de los receptores (ver “Materiales y métodos”).

Como se muestra en la Figura 17, la aplicación de ACh en oocitos inyectados con el ARNc de la subunidad  $\alpha 9$  generó una respuesta dependiente de la concentración del agonista con una  $\text{CE}_{50}$  de  $11.71 \mu\text{M}$  ( $n=10$ ; 95% IC 9.48 a 14.46). Por otro lado, la co-inyección de ARNc codificante para las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en una proporción equimolar (1:1) generó una curva concentración-respuesta bifásica (Figura 17 – rojo claro), indicando la presencia de una población mixta de receptores: una de mayor potencia con una  $\text{CE}_{50}$  de  $2.73 \mu\text{M}$  ( $n=9$ ; 95% IC 1.01 a 7.44) y otra de menor potencia con una  $\text{CE}_{50}$  de  $518.8 \mu\text{M}$  ( $n=9$ ; 95% IC 253.51 a 1064.14). La existencia de dos poblaciones de receptores

podría deberse a la presencia de receptores homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  o al ensamblado de receptores  $\alpha 9\alpha 10$  con dos estequiometrias con diferentes afinidades aparentes por el agonista. La  $CE_{50}$  del componente de mayor afinidad está en el mismo orden de magnitud que la del receptor homomérico  $\alpha 9$ , sugiriendo que este componente de la curva bifásica está gobernado por la presencia de receptores  $\alpha 9$  homoméricos. Con el objetivo de obtener una población compuesta únicamente por el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , fue necesario realizar la inyección de ARNc en una relación  $\alpha 10: \alpha 9 \rightarrow 2:1$ . En estas condiciones experimentales la curva concentración-respuesta a ACh obtenida resultó ser monofásica (Figura 17 – rojo oscuro), sugiriendo la presencia de una única población de receptores heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$ , con una  $CE_{50}$  de  $437 \mu M$  ( $n=7$ ; 95% IC 357.2 a 534.6). Este valor es similar a la CE de la segunda población de receptores ( $518.8 \mu M$ ) obtenida al inyectar concentraciones equimolares de ARNc  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Figura 17), indicando que esta segunda población es la del receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ .

Receptor	$CE_{50}$	n
$\alpha 9$	$11.71 \mu M$ 95% IC 9.48 a 14.46	10
$\alpha 9\alpha 10$ (1:1) (I)	$2.73 \mu M$ 95% IC 1.01 a 7.44	9
$\alpha 9\alpha 10$ (1:1) (II)	$518.8 \mu M$ 95% IC 253.51 a 1064.14	9
$\alpha 9\alpha 10$ (1:2)	$437 \mu M$ 95% IC 357.2 a 534.6	7

Tabla 8 |  $CE_{50}$  para el receptor homomérico  $\alpha 9$  de pez cebra y los receptores heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  que se forman inyectando diferentes proporciones de ARNc.

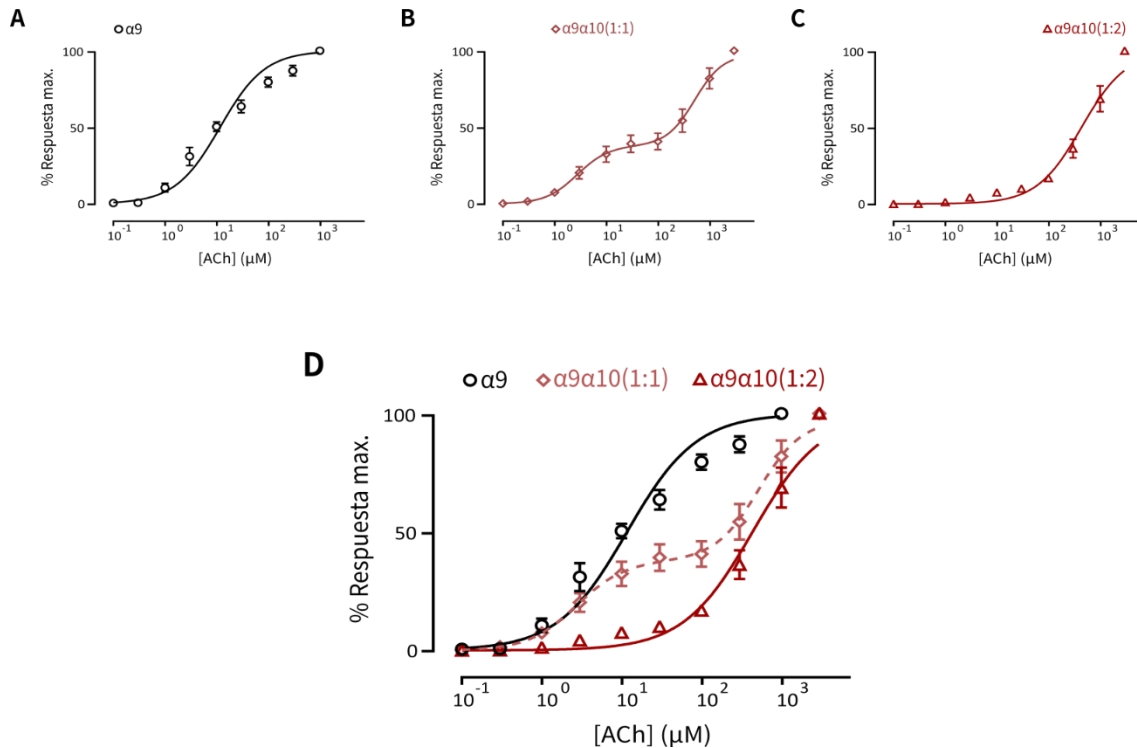


Figura 17 | La afinidad aparente por la ACh varía entre los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  del pez cebra.

A.B.C. Curvas de concentración-respuesta para los receptores  $\alpha 9$ ,  $\alpha 9\alpha 10$  (1:1) y  $\alpha 9\alpha 10$  (1:2) de pez cebra. Medias  $\pm$  S.E.M de las amplitudes de respuesta normalizadas a la respuesta máxima de cada oocito. D. Superposición de las tres curvas representadas en A, B y C.

## Desensibilización

Una característica saliente de los receptores nicotínicos es su patrón de desensibilización frente a exposiciones prolongadas de ACh a altas concentraciones. Esto se debe al pasaje del receptor a un estado desensibilizado, de alta afinidad por el agonista, pero no conductor (Papke et al., 2012; Quick and Lester, 2002). La consecuencia funcional de este proceso implica la disminución de la amplitud de las corrientes evocadas ante una aplicación constante de agonista. Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de distintas especies estudiados hasta el momento difieren en su patrón de desensibilización (Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020). Mientras que los receptores homoméricos  $\alpha 9$  de rata y pollo presentan un bajo grado de desensibilización, manteniendo una amplitud de respuesta casi constante ante aplicaciones prolongadas del agonista, el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de ambas especies

presenta una marcada desensibilización. A su vez, tanto el receptor homomérico  $\alpha 9$  como el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  de rana, presentan grados elevados de desensibilización, aunque el receptor heteromérico en menor medida que el homomérico (Marcovich et al., 2020). Con el fin de estudiar los patrones de desensibilización de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra, realizamos aplicaciones prolongadas de ACh durante 1 minuto a concentraciones saturantes (1 mM en el caso del receptor homomérico  $\alpha 9$  y 3 mM en el caso de  $\alpha 9\alpha 10$ ). Se evaluó el porcentaje de corriente remanente a los 20 segundos luego del pico máximo de respuesta a la ACh (Figura 18 A).

Ambos receptores presentaron una marcada desensibilización (Figura 18 B), siendo esta mayor en el caso del receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (mediana de 14.29% Rango Inter cuartil (RIC): 7.91-17.15 % de la corriente remanente 20 segundos luego del pico de corriente evocado por la aplicación de ACh 3 mM), comparada con la del homomérico  $\alpha 9$  (mediana de 44% RIC: 40.36-50.75 %, diferencia entre las medianas: 29.71, \* $p= 7.09e-06$ ,  $U = 0.0$ , test de Mann-Whitney). Estos resultados indican que los receptores del pez cebra difieren marcadamente en su patrón de desensibilización con respecto a los nAChRs  $\alpha 9$  homoméricos de rata o pollo (receptores con una tasa de desensibilización baja (Elgoyhen et al., 1994; Lipovsek et al., 2012), y son similares a los receptores de rana (Marcovich et al., 2020).

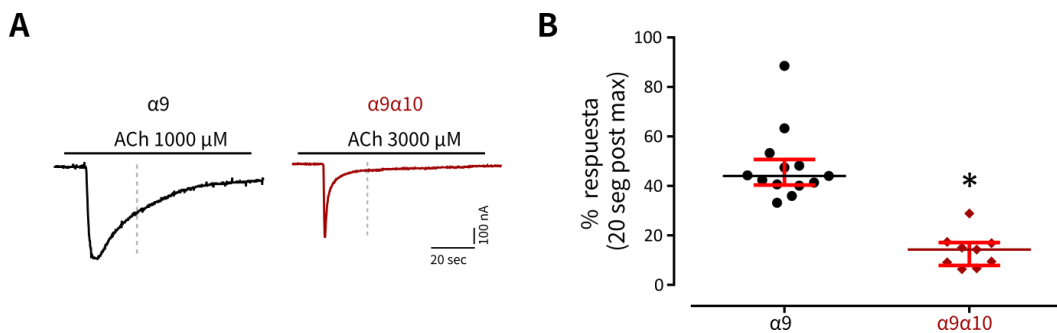


Figura 18 | Tanto el receptor  $\alpha 9$  como el  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra presentan una marcada desensibilización.

A. Registros representativos obtenidos en respuesta a aplicaciones de ACh 1 mM para el caso del nAChRs  $\alpha 9$  homomérico y 3 mM para el caso del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  heteromérico, durante 60 segundos.  $V_s = -70$  mV. B. Porcentaje de respuesta remanente 20 segundos después del pico de la respuesta a ACh (línea punteada gris en A). Las líneas indican la mediana y el RIC. Los símbolos representan oocitos individuales ( $n= 13$  y  $9$  respectivamente). Test de Mann-Whitney, \* $p= 7.09e-06$ .



## Estimación de la contribución de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ a la corriente iónica total

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs es importante para la activación de corrientes secundarias dependientes de este catión y para activar vías de transducción de señales intracelulares (Albuquerque et al., 2009). En el caso de las células ciliadas de los epitelios mecanosensoriales de vertebrados, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  está acoplada a la activación de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo SK2 y a la hiperpolarización de las células sensoriales (Castellano-Muñoz et al., 2010; Fuchs and Murrow, 1992; Gómez-Casati et al., 2005). Por lo tanto, la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental en la fisiología de las células ciliadas de los vertebrados. Sin embargo, la permeabilidad relativa al  $\text{Ca}^{2+}$  de los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 910$  varía entre las distintas especies. Esto indicaría una especialización funcional del sistema eferente a lo largo de la evolución (Lipovsek et al., 2014, 2012; Marcovich et al., 2020).

A fin de estudiar de forma cualitativa la contribución de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a la corriente iónica total en el caso de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra, utilizamos como una medida indirecta la activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{ICl}_{\text{Ca}}$ ) que poseen los oocitos de *X. laevis* (Miledi and Parker, 1984; Oh et al., 2008). Esta corriente secundaria está dada por la salida de iones  $\text{Cl}^-$  a través de canales endógenos de los oocitos y se activa por el incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Si el receptor bajo estudio presenta una alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , su activación producirá la apertura de estos canales de  $\text{Cl}^-$  y, por lo tanto, la corriente total registrada corresponderá a aquella que pasa por el receptor nicotínico sumada a la  $\text{ICl}_{\text{Ca}}$ . En cambio, si el receptor expresado en forma heteróloga tiene baja permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , la corriente entrante no será suficiente para producir la activación de la  $\text{ICl}_{\text{Ca}}$  y por lo tanto la corriente total registrada corresponderá únicamente a aquellos iones que pasan a través del receptor nicotínico.

La activación de la  $\text{ICl}_{\text{Ca}}$  puede ser prevenida mediante la incubación de los oocitos con el quelante rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM. En el interior de los oocitos, el quelante es capaz de secuestrar los iones  $\text{Ca}^{2+}$  antes de que lleguen a los

sitios de acción sobre los canales de  $\text{Cl}^-$  y, por lo tanto, impide la activación de la corriente secundaria. Si luego de la incubación con BAPTA-AM, las corrientes evocadas son (significativamente) menores que aquellas registradas antes de la incubación, se puede inferir que la incubación con el quelante rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  logró prevenir la activación de la  $\text{ICl}_{\text{Ca}}$  y que por lo tanto una gran parte de la corriente entrante que se registra con la aplicación de ACh se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un nAChR permeable a este catión.

En la Figura 19-A se muestran registros representativos de oocitos inyectados con ARNc de  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra, obtenidos en respuesta a una concentración de ACh cercana a la  $\text{CE}_{50}$  de cada receptor (10  $\mu\text{M}$  en el caso de  $\alpha 9$  y 300  $\mu\text{M}$  para  $\alpha 9\alpha 10$ ), antes y después del tratamiento durante 3 horas con BAPTA-AM 100  $\mu\text{M}$ . La Figura 19-B muestra la cuantificación del pico de la respuesta remanente luego de esta incubación. En el caso de ambos receptores, la incubación con el quelante rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  logró prevenir la activación de la  $\text{ICl}_{\text{Ca}}$  y, por lo tanto, se registró una reducción significativa del porcentaje de corriente remanente luego del tratamiento con BAPTA-AM ( $\alpha 9$ :  $42.20 \pm 5.51$  % de corriente remanente,  $n = 15$ ;  $\alpha 9\alpha 10$ :  $24.23 \pm 4.97$  % de corriente remanente,  $n = 8$ ), lo que indica una contribución significativa de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a las respuestas evocadas por ACh. Los valores porcentuales de reducción de la corriente luego del tratamiento con BAPTA-AM para los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  resultaron significativamente diferentes entre sí (diferencia entre las medias: 17.97 95% IC 2.41-33.49,  $t = 2.42$ ,  $*p = 0.0128$ , Test de t no pareado con corrección de Welch) sugiriendo la posibilidad de que el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  posea una mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que el receptor homomérico  $\alpha 9$ . Sin embargo, para determinar esto de manera fehaciente sería necesario realizar estudios destinados a medir la permeabilidad relativa del  $\text{Ca}^{2+}$ , con respecto a cationes monovalentes.

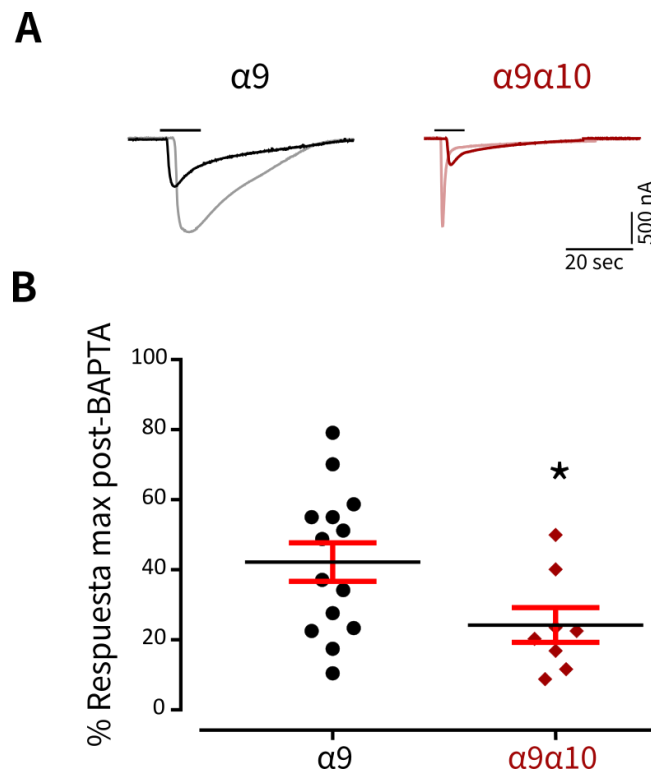


Figura 19 | Tanto el nAChR  $\alpha 9$  como el  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra poseen una alta contribución del  $\text{Ca}^{2+}$  a la corriente entrante total.

El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs fue evaluado mediante la activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  (ICiCa) endógena de los oocitos. A. Trazos representativos obtenidos en respuesta a una concentración cercana a la  $\text{CE}_{50}$  de ACh de cada receptor, antes (trazos claros) y después (trazos oscuros) de 3 horas de incubación en BAPTA-AM.  $V_s = -70$  mV. B. Porcentaje de respuesta remanente luego de la incubación en BAPTA-AM. Las líneas indican la mediana y el RIC. Los símbolos representan oocitos individuales ( $n = 14$  y  $8$  respectivamente). Test de  $t$  no pareado con corrección de Welch,  $*p = 0.0128$ .

### Modulación por calcio extracelular

La respuesta a ACh de los receptores nicotínicos  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  es modulada por cationes divalentes extracelulares. En el caso de los receptores homoméricos  $\alpha 9$  de rata y de pollo, pero no de rana, el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como un bloqueante de las respuestas a ACh (Elgoyhen et al., 2001; Katz et al., 2000; Lipovsek et al., 2014; Marcovich et al., 2020). A diferencia del receptor homomérico  $\alpha 9$  de rata, la actividad del receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  de esta especie es modulada de manera bifásica por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular: la potenciación ocurre a

concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y es voltaje-independiente, mientras que el bloqueo se evidencia a concentraciones milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y es voltaje-dependiente (Weisstaub et al., 2002). Por otro lado, el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  de pollo presenta potenciación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a concentraciones micromolares de este catión, pero no se evidencia bloqueo ni potenciación a concentraciones mayores a 0.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lipovsek et al., 2012). En el caso del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de rana, éste presenta potenciación de la respuesta evocada a todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango de 0.5 – 3 mM.

Teniendo en cuenta estos resultados previos, evaluamos la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en los receptores del pez cebra. Para esto, estudiamos la respuesta evocada por una concentración fija de ACh cercana al  $\text{CE}_{50}$  de cada receptor, variando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución salina extracelular (0 nominal hasta 3 mM), a un voltaje de sostén de -90 mV. Las respuestas fueron relativizadas a aquellas evocadas por ACh en presencia de 1.8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Como se muestra en la Figura 20 ni el nAChR  $\alpha 9$  homomérico ni el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , fueron modulados por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

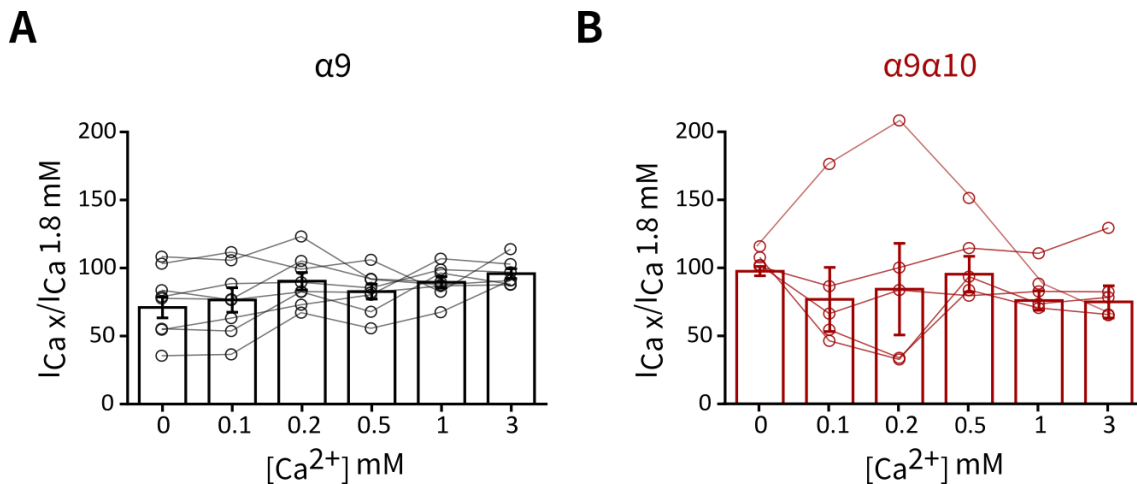


Figura 20 | El calcio extracelular no modula a los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra en concentraciones dentro del rango fisiológico.

Amplitudes de respuestas normalizadas a la respuesta en  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM de cada oocito, para los nAChRs  $\alpha 9$  (A) y  $\alpha 9\alpha 10$  (B).  $V_s = -90$  mV. Las barras representan las medias  $\pm$  E.S.M. Los símbolos representan oocitos individuales ( $n = 8$  y  $5$  respectivamente). ANOVA de una vía  $p = 0.0699$  y  $p = 0.4782$ , respectivamente.

## Relación corriente - potencial

La relación corriente en función del voltaje (IV) de los nAChR  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  varía al comparar entre distintas especies de vertebrados (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020). Para realizar un análisis de las curvas IV de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra se aplicaron rampas de voltaje de 2 segundos de duración desde -120 mV a +50 mV a oocitos inyectados con los respectivos ARNc. Las rampas fueron aplicadas durante la meseta de la respuesta a concentraciones bajas de ACh (1 o 30  $\mu$ M para  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , respectivamente) para evitar enmascarar los resultados con efectos de desensibilización de los receptores por exposición prolongada al agonista.

Como se muestra en la Figura 21 el perfil de la curva IV tanto de  $\alpha 9$  como de  $\alpha 9\alpha 10$  es similar, mostrando tanto una rectificación saliente a voltajes despolarizados (similar a lo que ocurre en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  de pollo y en  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de rata (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020), como una rectificación entrante a voltajes hiperpolarizados (similar a los receptores de rana (Marcovich et al., 2020). No existen diferencias significativas entre la rectificación de los dos tipos de receptores medida como la relación de las corrientes a +40 y -90 mV (mediana  $\alpha 9$ : 0.45 RIC 0.28-0.67, mediana  $\alpha 9\alpha 10$ : 0.5 RIC 0.16-0.76, diferencia entre las medianas: 0.064,  $p=0.6839$ ,  $U= 14$ , test de Mann-Whitney).

Dado el marcado patrón de desensibilización que presenta el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (ver subsección “Desensibilización”), también estudiamos la dependencia de la corriente con el potencial de membrana, variando el voltaje de sostén con incrementos puntuales de voltaje y realizando aplicaciones de ACh 300  $\mu$ M en cada uno, con un intervalo de 2 minutos entre cada aplicación. De esta manera comprobamos que la curva I-V obtenida de las dos maneras posee un perfil similar (Figura 22).

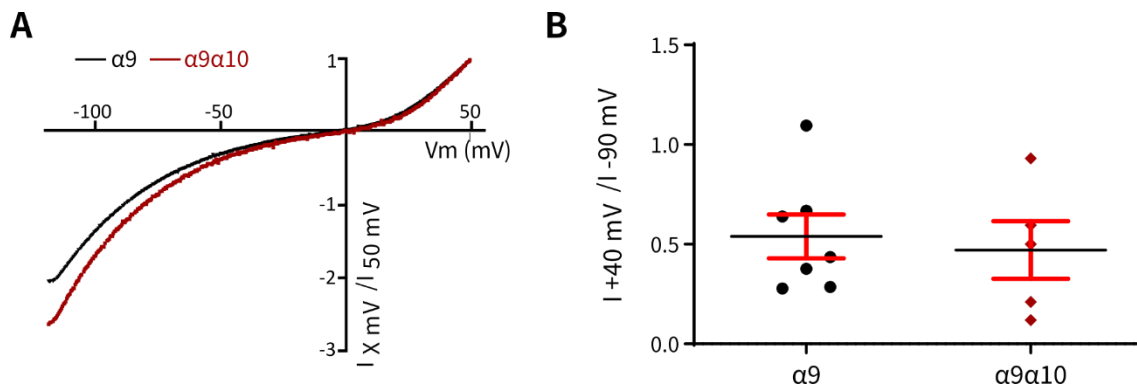


Figura 21 | Relación corriente – potencial de los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra.

A. Curvas IV representativas para los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra relativizadas a la corriente a +40 mV obtenidas mediante la aplicación de una rampa de voltaje de -120 a +50 mV en la fase de meseta de una respuesta a ACh (al menos un orden de magnitud por debajo de la  $CE_{50}$  de cada receptor). B. Cuantificación de la rectificación en los receptores. Relación entre la amplitud de la corriente a +40 y -90 mV. Medias  $\pm$  E.S.M. ( $n = 7 - 5$ ). Test de Mann-Whitney,  $p = 0.6389$ .

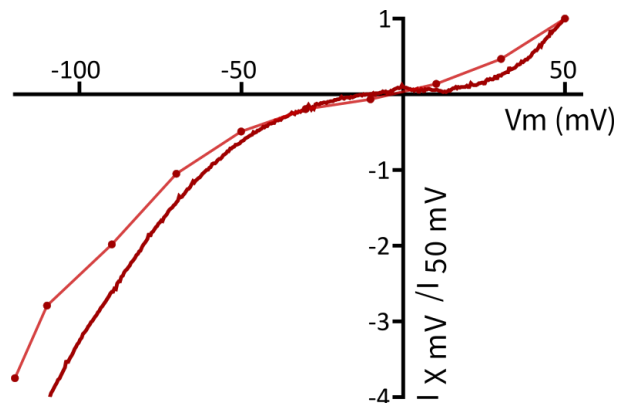


Figura 22 | Relación corriente – potencial del nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra obtenida utilizando una rampa continua de voltaje vs la obtenida por fijación de los ovocitos a los distintos voltajes.

## Caracterización farmacológica de los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de pez cebra

### Nicotina

La nicotina es un agonista clásico de los receptores nicotínicos, a excepción de los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , en los cuales actúa como antagonista (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Verbitsky et al., 2000). Con el objetivo de determinar el comportamiento farmacológico de este compuesto en los receptores de pez

cebra, analizamos la respuesta de los receptores homomérico  $\alpha 9$  y heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  a la nicotina. Al igual que lo descrito para los receptores de mamíferos, pollo y rana, la nicotina no evocó respuestas en oocitos microinyectados con ARNc de las subunidades  $\alpha 9$ , o  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra (Figura 23).

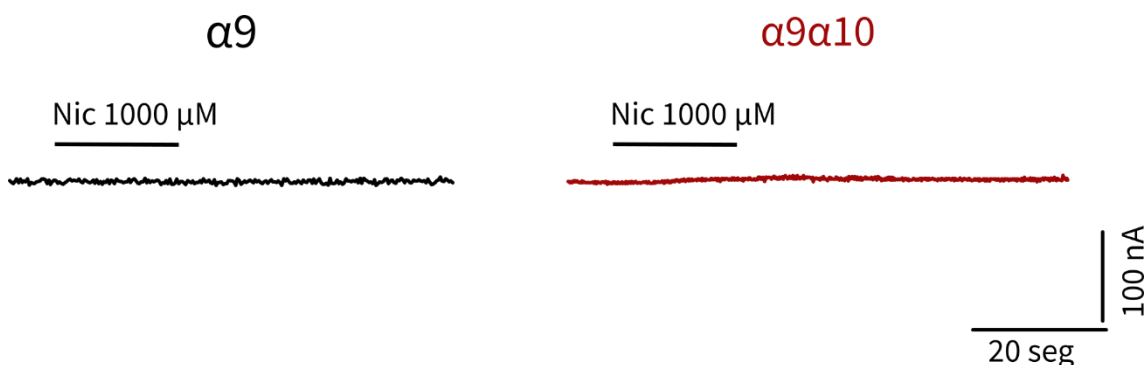


Figura 23 | La nicotina no es un agonista de los receptores  $\alpha 9$  o  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra.

Respuesta representativa a la aplicación de nicotina 1 mM de un oocito que expresa el nAChR  $\alpha 9$  (izquierda) o  $\alpha 9\alpha 10$  (derecha) de pez cebra.

### Estricnina

Se ha descrito que la estricnina (Str), un antagonista clásico de receptores de glicina, actúa también como un antagonista en los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001; Rothlin et al., 1999). Por este motivo estudiamos el efecto de la estricnina sobre los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra. Los oocitos fueron pre-incubados con 1  $\mu\text{M}$  Str durante 1 min y luego esta droga fue co-aplicada con ACh (esta última en concentraciones cercanas a la  $\text{CE}_{50}$  de cada receptor, 10  $\mu\text{M}$  en el caso de los receptores  $\alpha 9$  y 300  $\mu\text{M}$  en el caso de  $\alpha 9\alpha 10$ ). La Str redujo las respuestas evocadas por la ACh en un  $95.44 \pm 1.19\%$  ( $n = 4$ ) en el caso de  $\alpha 9$  y en un  $57.59 \pm 5.1\%$  ( $n = 3$ ) en el caso de  $\alpha 9\alpha 10$  (Figura 24). En ambos casos el efecto fue completamente reversible mediante el lavado de los oocitos con solución de Ringer durante 5 minutos.

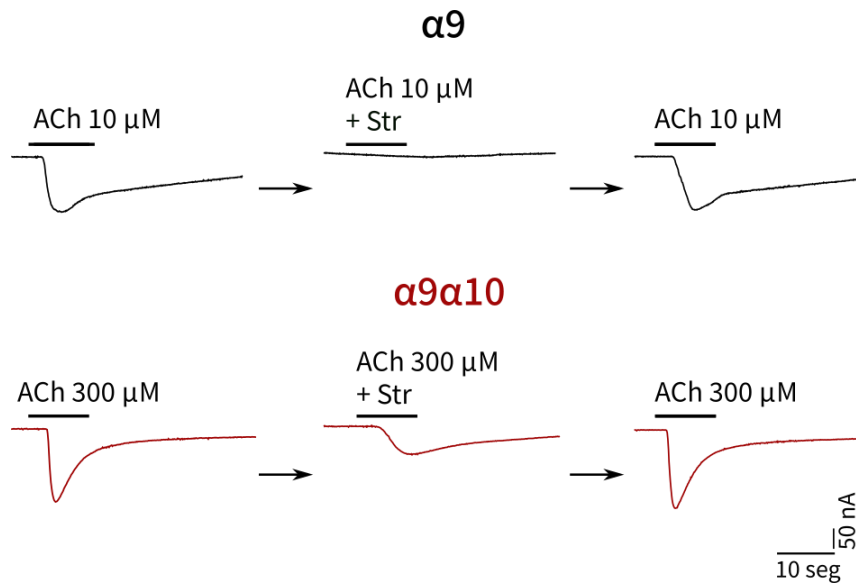


Figura 24 | Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra son bloqueados de manera reversible por estriquina.

Respuestas representativas a la aplicación de soluciones de concentración  $10 \mu\text{M}$  ( $\alpha 9$ , negro, arriba) o  $300 \mu\text{M}$  ( $\alpha 9\alpha 10$ , rojo, abajo) de ACh (izquierda), ACh en presencia de estriquina (centro), o luego del lavado por 5 minutos con solución de Ringer (derecha). Los oocitos fueron preincubados durante 1 minuto con Str  $1 \mu\text{M}$  antes de la aplicación de ACh.

Con el fin de estimar la potencia de la Str, se realizaron curvas de inhibición aplicando concentraciones crecientes de Str en presencia de una concentración fija de ACh cercana a la  $CE_{50}$  de cada receptor ( $10 \mu\text{M}$  en el caso de  $\alpha 9$  y  $300 \mu\text{M}$  para  $\alpha 9\alpha 10$ ). Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación empírica de Hill y graficados en función de la concentración de estriquina (Figura 25). A partir de este ajuste pudimos estimar la  $CI_{50}$  de cada receptor que se encuentra detallada en la Tabla 9. La  $CI_{50}$  de la estriquina fue mayor para el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  que para el receptor homomérico  $\alpha 9$ . Estos valores de  $CI_{50}$  fueron dos órdenes de magnitud mayor que aquellos reportados previamente para otras especies (Elgoyhen et al., 2001).



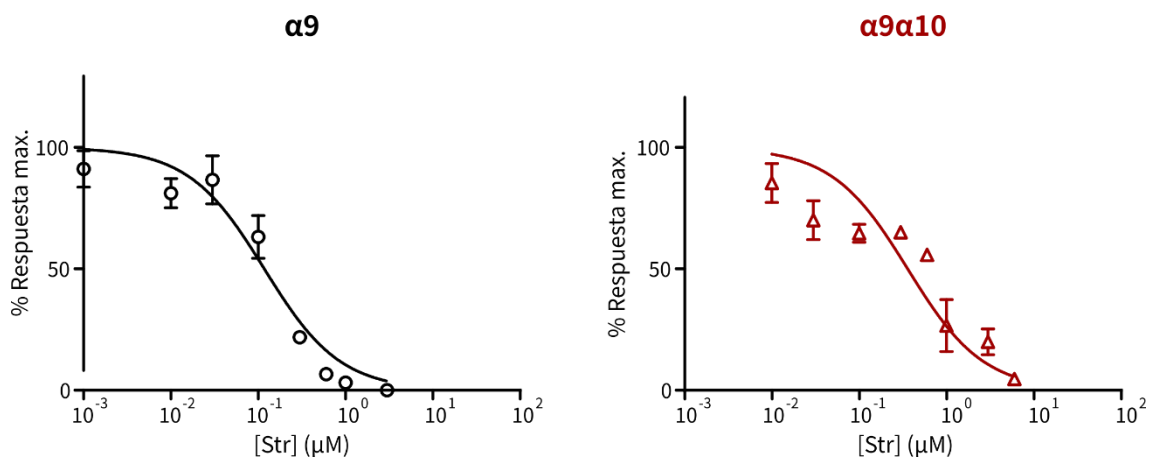


Figura 25 | Curvas de inhibición mediada por estricnina en los receptores  $\alpha 9$  (negro, izquierda) y  $\alpha 9\alpha 10$  (rojo, derecha) de pez cebra. Medias  $\pm$  E.S.M. de las amplitudes de respuesta normalizadas a la respuesta de ACh para cada oocito en ausencia de estricnina.

Receptor	CI <sub>50</sub>	n
$\alpha 9$	0.1776 $\mu$ M 95% IC 0.0835 a 0.1656	7
$\alpha 9\alpha 10$	0.3618 $\mu$ M 95% IC 0.2010 a 0.6512	4

Tabla 9 | CI<sub>50</sub> para los nAChR de pez cebra

### $\alpha$ -bungarotoxina

La  $\alpha$ -Bungarotoxina ( $\alpha$ -Btx) es otro antagonista de los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 1994; ErosteGUI et al., 1994). Por este motivo estudiamos el efecto de la  $\alpha$ -Btx sobre los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra. Para ello evaluamos la co-aplicación de esta toxina con ACh en concentraciones cercanas a la CE<sub>50</sub> de cada receptor. La preexposición de los oocitos durante 1 minuto a 100 nM de  $\alpha$ -Btx antes de la co-aplicación con ACh 10  $\mu$ M ( $\alpha 9$ ) o 300  $\mu$ M ( $\alpha 9\alpha 10$ ), redujo la respuesta de los receptores al agonista en un  $94.59 \pm 2.17\%$  (n = 3) y  $83.66 \pm 5.50\%$  (n= 3), respectivamente (Figura 26). En ambos casos el efecto de la  $\alpha$ -Btx fue completamente revertido mediante el lavado de los oocitos con solución de Ringer durante 5 minutos.

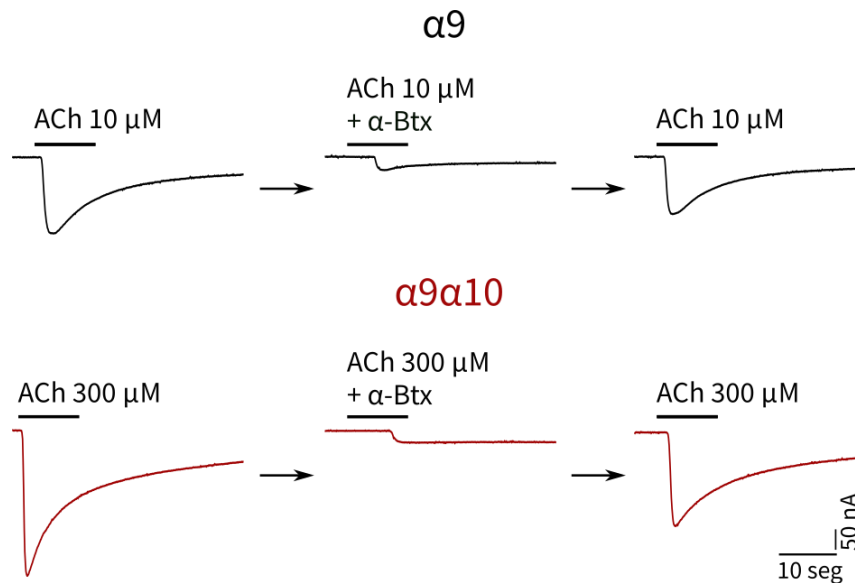


Figura 26 | Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra son bloqueados de manera reversible por  $\alpha$ -Bungarotoxina.

Respuestas representativas a la aplicación de soluciones de concentración  $10 \mu\text{M}$  ( $\alpha 9$ , negro, arriba) o  $300 \mu\text{M}$  ( $\alpha 9\alpha 10$ , rojo, abajo) de ACh (izquierda), ACh más  $\alpha$ -Bungarotoxina (centro), o luego del lavado por 5 minutos con solución de Ringer (derecha). Los oocitos fueron preincubados durante 1 minuto con  $\alpha$ -Bungarotoxina  $100 \text{ nM}$  antes de la aplicación de ACh.

### $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1

Se ha demostrado que la  $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1 ( $\alpha$ -Ctx) es un antagonista potente de los nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  en mamíferos (Vincler et al., 2006; Vincler and McIntosh, 2007). Por este motivo también estudiamos el efecto de la  $\alpha$ -Ctx sobre los receptores de pez cebra. Para ello, en primer lugar, evaluamos la co-aplicación de la toxina con ACh (esta última en concentraciones cercanas a la  $CE_{50}$  de cada receptor:  $10 \mu\text{M}$  en el caso de los receptores  $\alpha 9$  y  $300 \mu\text{M}$  en el caso de  $\alpha 9\alpha 10$ ). La preexposición de los oocitos durante 1 minuto a  $\alpha$ -Ctx  $100 \text{ nM}$  antes de su co-aplicación con ACh, redujo la respuesta de los receptores al agonista en un  $28.48 \pm 8.3\%$  ( $n = 3$ ) y  $49.84 \pm 13.7\%$  ( $n = 3$ ), respectivamente (Figura 27). En ambos casos el efecto de la  $\alpha$ -Ctx fue reversible mediante el lavado de los oocitos con solución de Ringer durante 5 minutos.

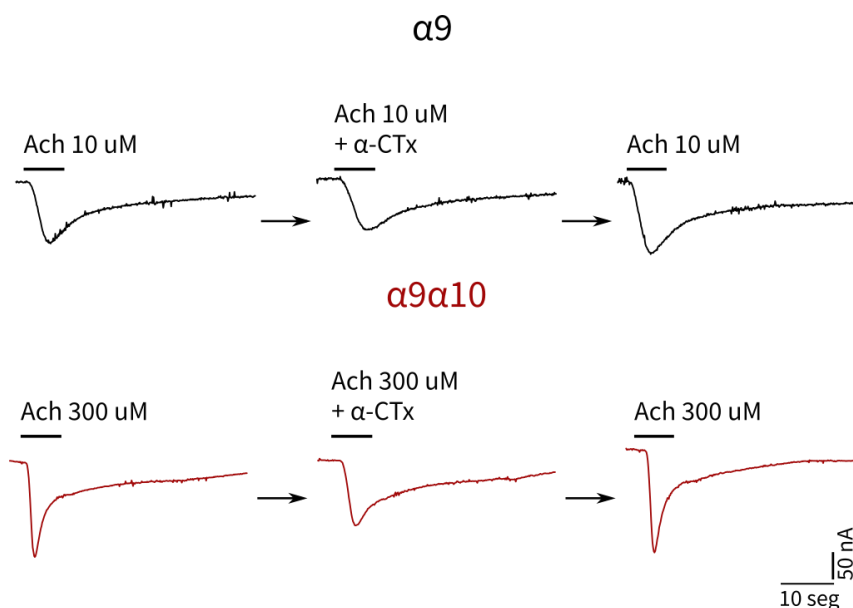


Figura 27 | Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra son bloqueados de manera reversible por la  $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1.

Respuestas representativas a la aplicación de soluciones de concentración 10  $\mu$ M ( $\alpha 9$ , negro, arriba) o 300  $\mu$ M ( $\alpha 9\alpha 10$ , rojo, abajo) de ACh (izquierda), ACh más  $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1. (centro), o luego del lavado por 5 minutos con solución extracelular de Ringer (derecha). Los oocitos fueron pre-incubados durante 1 minuto con  $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1. 100 nM, antes de la aplicación de ACh.

Realizamos luego una curva de inhibición aplicando concentraciones crecientes de  $\alpha$ -Ctx en presencia de una concentración fija de ACh 10  $\mu$ M, cercana a la  $CE_{50}$  para el receptor homomérico  $\alpha 9$ . Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación empírica de Hill y graficados en función de la concentración de  $\alpha$ -Ctx (Figura 28). A partir de este ajuste estimamos una  $CI_{50}$  de 89.23  $\mu$ M (CI 95% 42.01 a 189.5,  $n=5$ ) para la toxina. Este resultado indica que, a diferencia de lo reportado para los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de mamíferos (Vincler et al., 2006; Vincler and McIntosh, 2007), la  $\alpha$ -Ctx Vc1.1 tiene una potencia baja en el caso del receptor  $\alpha 9$  de pez cebra.

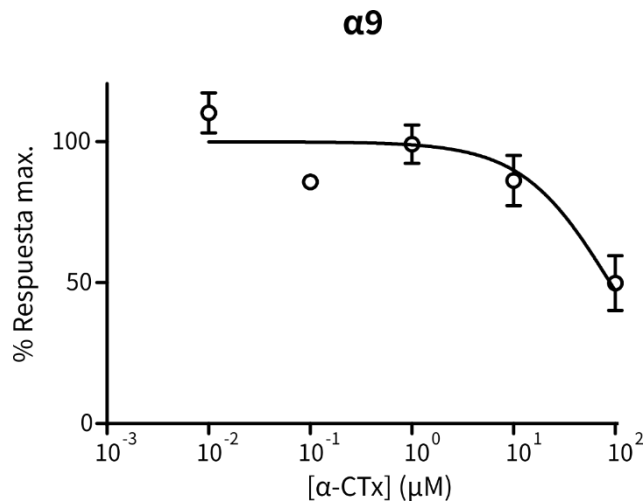


Figura 28 | Curva de inhibición mediada por la  $\alpha$ -Conotoxina Vc1.1 en el receptor  $\alpha$ 9 de pez cebra.

Medias  $\pm$  E.S.M de las amplitudes de respuesta normalizadas a la respuesta de ACh para cada oocito en ausencia de  $\alpha$ -Ctx.

### Tricaína

El metasulfonato de tricaína o MS-222, es un anestésico utilizado en peces y el cual usamos en este trabajo para realizar los estudios *in vivo* que se detallan en el apartado “Caracterización *in vivo* del receptor nativo de la sinapsis eferente de la línea lateral posterior” (ver sección “Materiales y métodos”). Por este motivo estudiamos el efecto de esta droga sobre los receptores  $\alpha$ 9 y  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10. Para esto evaluamos la co-aplicación de tricaína y ACh en una concentración similar a la CE<sub>50</sub> correspondiente para cada receptor. La preexposición de los oocitos durante 1 minuto con tricaína 100  $\mu$ M antes de su co-aplicación con ACh 10  $\mu$ M ( $\alpha$ 9) o 300  $\mu$ M ( $\alpha$ 9 $\alpha$ 10), bloqueó completamente la respuesta de los receptores al agonista (Figura 29). En ambos casos el efecto de la tricaína fue completamente revertido mediante el lavado de los oocitos con solución de Ringer durante 5 minutos.

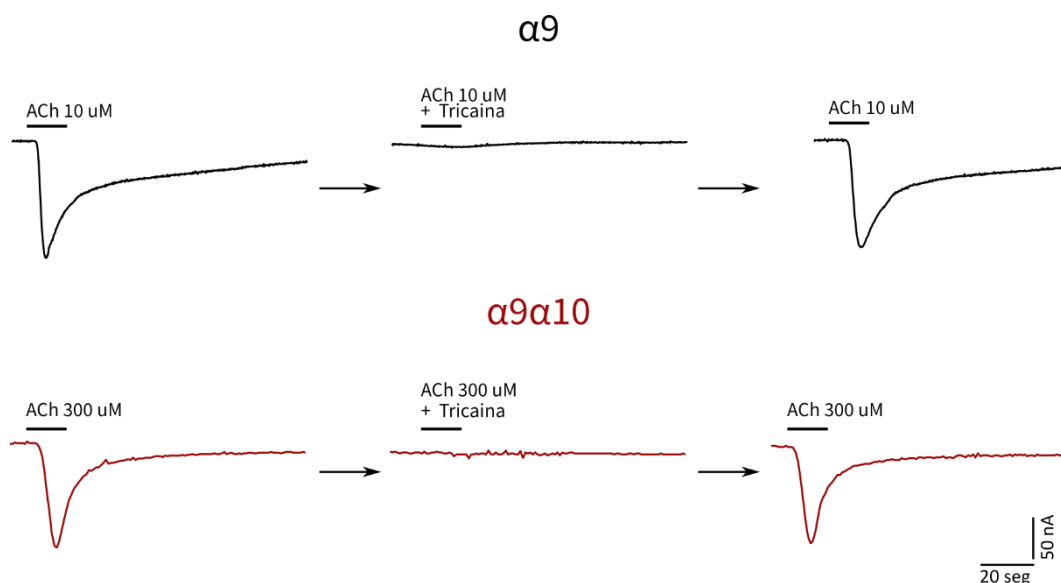


Figura 29 | Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra son bloqueados de manera reversible por la tricaina.

Respuestas representativas a la aplicación de soluciones de concentración  $10 \mu\text{M}$  ( $\alpha 9$ , negro, arriba) o  $300 \mu\text{M}$  ( $\alpha 9\alpha 10$ , rojo, abajo) de ACh (izquierda), ACh más tricaina (centro), o luego del lavado por 5 minutos con solución extracelular de Ringer (derecha). Los oocitos fueron preincubados durante 1 minuto con tricaina  $100 \mu\text{M}$  antes de la aplicación de ACh.

## Conclusión

Los resultados de expresión funcional de receptores en un sistema heterólogo indican que la subunidad  $\alpha 9$  puede formar tanto receptores homoméricos como heteroméricos con la subunidad  $\alpha 10$ . Por otro lado, la subunidad  $\alpha 10$  no se ensambla en receptores homoméricos funcionales. Los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra presentan propiedades biofísicas y farmacológicas similares a los de otras especies estudiadas hasta el momento, a excepción de la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Dado que la subunidad  $\alpha 10$  no se expresa de manera diferencial en células ciliadas de los neuromastos (ver sección “Expresión génica” y Carpaneto Freixas et al., 2021), y que la subunidad  $\alpha 9$  se ensambla en receptores funcionales en ausencia de  $\alpha 10$ , proponemos que el nAChR que media la transmisión sináptica entre el sistema eferente colinérgico de la línea lateral del pez cebra y las CCs de los neuromastos es del tipo  $\alpha 9$  homomérico.

## Caracterización *in vivo* del receptor nativo de la sinapsis eferente de la línea lateral posterior.

### Imaging de calcio

Una vez obtenido el perfil farmacológico y biofísico de los receptores recombinantes conformados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra, buscamos analizar las propiedades del receptor nativo presente en la sinapsis eferente de la llp.

Si bien se han realizado registros electrofisiológicos de *patch clamp* en la modalidad *whole-cell* en las CCs de los neuromastos (Olt et al., 2016, 2014; Ricci et al., 2013), esta técnica no puede ser reproducida de manera rutinaria y robusta. Debido a ello, para estudiar las propiedades del receptor nativo de la sinapsis eferente de la llp, realizamos estudios de imágenes de calcio *in vivo* utilizando la línea transgénica de pez cebra Tg[(Brn3c:Gal4;UAS:GcAMP7a)] que expresa GcAMP7a, un sensor fluorescente de calcio, en forma específica en las células ciliadas. Estimulamos mecánicamente las células ciliadas de los neuromastos de la llp mientras registramos la señal de fluorescencia. La base lógica que impulsa estos experimentos es la de utilizar las señales de calcio derivadas de la despolarización de las CC en respuesta a la activación de los canales mecanotransductores y la consecuente entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales Cav1.3a, como una aproximación al estado eléctrico de las CC. De acuerdo con lo descrito para el sistema eferente de las células ciliadas del oído interno, si la aplicación de ACh deriva en la apertura de un receptor nicotínico acoplado funcionalmente a la activación de un canal de potasio (Figura 6 en “Introducción”), esto debería traducirse en una hiperpolarización de la CC y consecuentemente en una menor entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales Cav1.3 y, por lo tanto, en un descenso en la intensidad del pico de fluorescencia generada por el GcAMP7a cuando las CC son estimuladas mecánicamente. Para lograr dicha estimulación mecánica de las CCs, utilizamos una pipeta de vidrio estirada y cargada con solución de registro extracelular a través de la cual se aplicó presión positiva o negativa para lograr la deflexión de los cilios en sentido anteroposterior o viceversa (Figura 30).

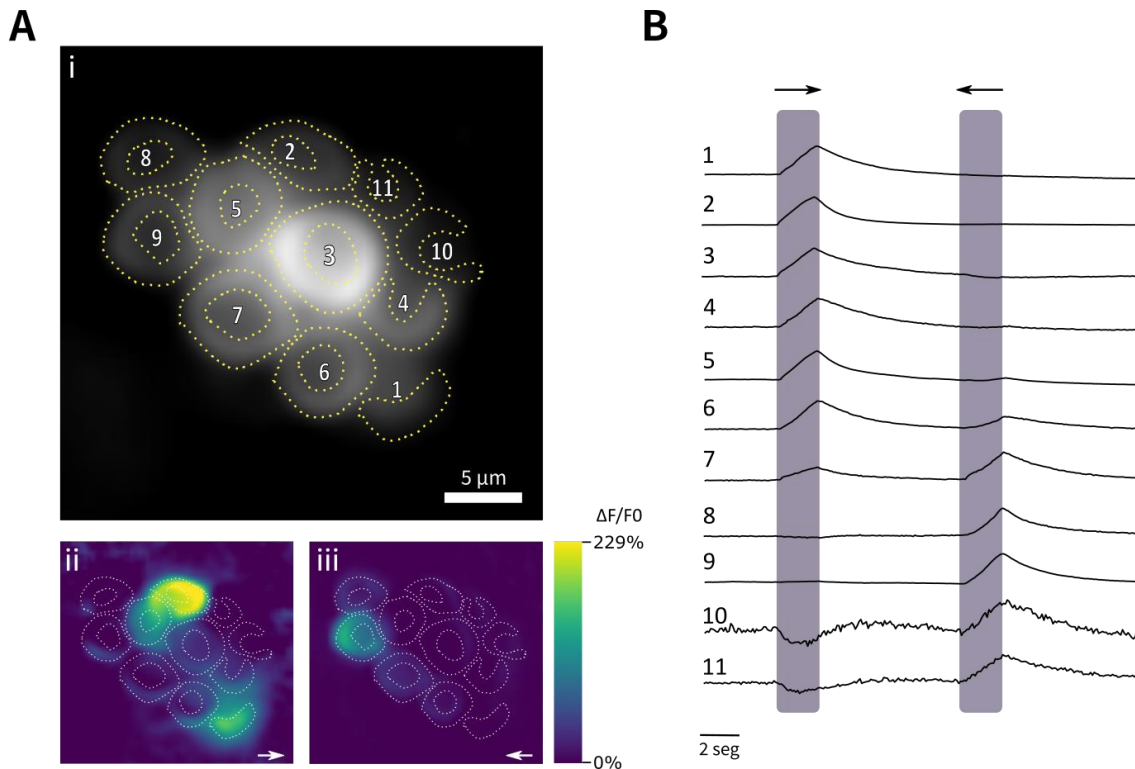


Figura 30 | La estimulación mecánica genera una señal robusta de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células ciliadas.

A. Imágenes representativas de un neuromasto perteneciente a un pez transgénico que expresa el sensor de calcio GcAMP7a en las CCs: i. imagen basal previa al estímulo en escala de grises (se dibujaron ROIs alrededor de cada CC visible), ii. y iii. patrones espaciales de las señales de GcAMP7a durante un estímulo mecánico de 2 segundos de duración en la dirección anterior-posterior ( $\rightarrow$ ) o posterior-anterior ( $\leftarrow$ ). La escala de colores está dada por el ratio  $\Delta F/F_0$ . B. Curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta F/F_0$ ) representativas de las CCs numeradas en A. Para cada célula se normalizó la respuesta en cada punto al pico de la misma. Las regiones sombreadas indican el momento en el cual el neuromasto fue estimulado mecánicamente.

Al igual que lo reportado en un estudio previo (Wong et al., 2019), las células ciliadas de la IIP presentan niveles variables de calcio basal ( $655.9 \pm 544.05$  Unidades Arbitrarias (U.A.),  $n=45$ ) (Figura 33, "Extra"). Ha sido reportado que las CCs varían en función y en sus propiedades de transducción de señales (Pichler and Lagnado, 2019, 2018; Zhang et al., 2018). Por lo tanto, decidimos utilizar como unidad experimental células ciliadas individuales que fueran selectivas únicamente para una polaridad, es decir, aquellas células claramente activadas por deflexiones en una sola orientación y que no se activan cuando reciben un estímulo en la dirección contraria (ej., células 1,2,3,4,5,8 y 9 en Figura 30-B).

Con el fin de determinar si nuestro sistema de estimulación era capaz de generar un estímulo robusto de manera reproducible, en primer lugar realizamos dos estimulaciones sucesivas en presencia de la solución de registro extracelular, sin la aplicación de droga alguna, con un minuto de separación entre ambas. Como se puede observar en la Figura 31, bajo estas condiciones control, el pico en la intensidad de fluorescencia ( $\Delta F/F_0$ ) provocado por el estímulo mecánico no cambió significativamente entre los estímulos sucesivos (1° est: Mdn  $\Delta F/F_0$ = 0.858 RIC: 0.472-1.504 Vs. 2° est: Mdn  $\Delta F/F_0$ = 0.876 RIC: 0.475-1.503, n= 113, W= -835, p= 0.2317, Correlación Biserial de Rangos Pareados (CBRP)= 0.129; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas).

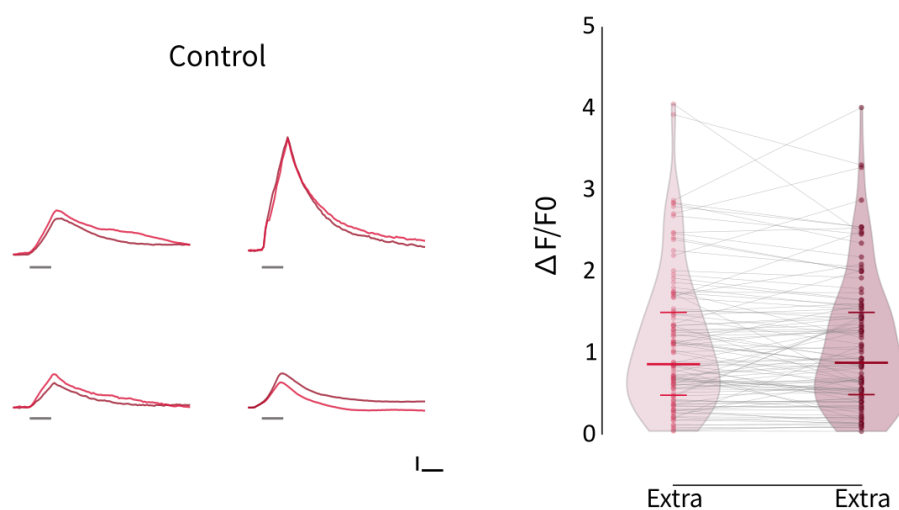


Figura 31 | La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  no difiere entre estimulaciones mecánicas sucesivas.

Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas a lo largo de dos ensayos sucesivos con la misma estimulación, separados por un minuto (1° estímulo rojo claro, 2° estímulo rojo oscuro). Las curvas están alineadas al inicio del estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta F/F_0$  para CCs individuales (n = 113, cada una en su orientación de preferencia) a lo largo de dos ensayos sucesivos con la misma estimulación separados por un minuto. Escala horizontal: 1.5 seg, escala vertical: 25%  $\Delta F/F_0$ . La duración del estímulo se indica con líneas grises debajo de cada curva temporal.

Al igual que en resultados previos de otros grupos (Sheets et al., 2012; Zhang et al., 2018), bajo nuestras condiciones experimentales, la aplicación de isradipina



10  $\mu\text{M}$  (un bloqueante de los canales Cav1.3) redujo significativamente la intensidad del pico de fluorescencia con respecto a una situación control (Figura 32, Ctrl: Mdn  $\Delta F/F_0 = 0.743$  RIC: 0.249-1.086 Vs. Isr: Mdn  $\Delta F/F_0 = 0.209$  RIC: 0.079-0.433,  $n = 23$ ,  $W = -258$ ,  $p = 8.726 \times 10^{-5}$ , CBRP = 0.935; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas), indicando que una gran proporción del cambio en la intensidad de fluorescencia luego de la estimulación mecánica de las CCs, se debe al flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje activados del tipo Cav1.3. Debido a que la microscopía utilizada es de campo amplio, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  restante luego del bloqueo de los canales Cav1.3, muy probablemente se deba a la entrada de calcio a través del canal mecanotransductor localizado en el ápex de las CCs (Zhang et al., 2018).

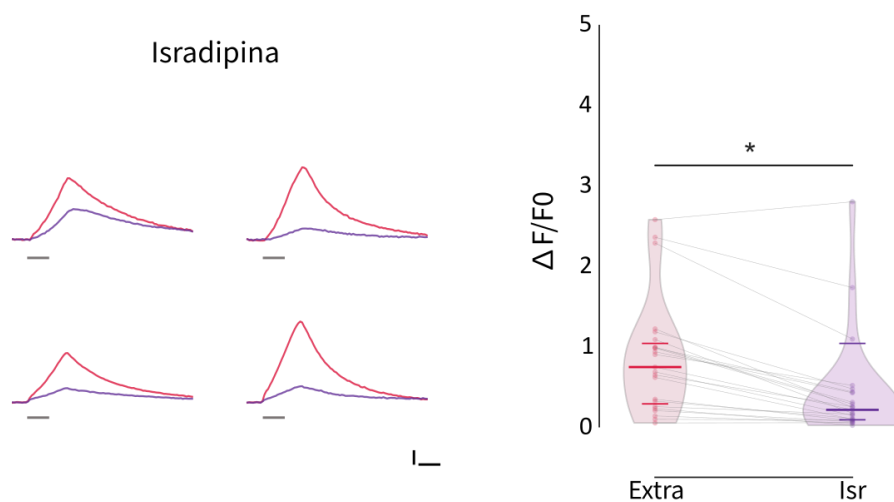


Figura 32 | La isradipina inhibe las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas mecánicamente.

Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica, antes (rojo) y después (violeta) de una pre-incubación con isradipina 10  $\mu\text{M}$ . Las curvas están alineadas al inicio del estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta F/F_0$  antes y después de la pre-incubación con isradipina 10  $\mu\text{M}$ , que redujo drásticamente la intensidad de fluorescencia de las respuestas mecanosensoriales ( $n = 23$ ,  $W = -258$ ,  $*p = 8.726 \times 10^{-5}$ , CBRP = 0.935; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas) Extra: solución extracelular de imaging, Isr: isradipina. Escala horizontal: 1.5 seg, escala vertical: 25%  $\Delta F/F_0$ . La duración del estímulo se indica con líneas grises debajo de cada curva temporal.

En ausencia de estimulación mecánica de los cilios, la aplicación de ACh, no produjo cambio en los niveles basales de fluorescencia de las CCs (Figura 33, ctrl:  $655.9 \pm 81.1$  U.A. vs. ACh:  $652.2 \pm 78.55$  U.A.,  $n = 45$ ,  $t = 0.7816$ ,  $df = 44$ ,  $p = 0.4386$ , prueba  $t$  de dos colas para muestras pareadas).

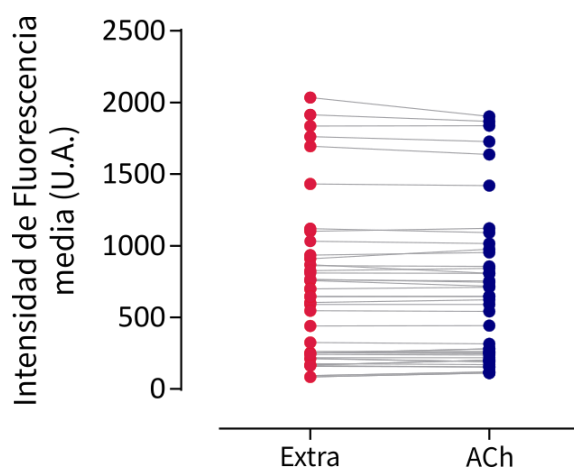


Figura 33 | Los niveles basales de fluorescencia de las CCs no muestran diferencias significativas antes y después de la aplicación de ACh.

Intensidad de fluorescencia media para cada célula en condiciones basales antes (rojo) y luego (azul) de la aplicación de ACh 1 mM ( $n = 45$  células,  $t = 0.7816$ ,  $df = 44$ ,  $p = 0.4386$ , prueba  $t$  de dos colas para muestras pareadas).

La aplicación exógena de ACh (1 mM) durante la estimulación mecánica de las CC, generó una reducción estadísticamente significativa en la cantidad de  $Ca^{2+}$  que entra a las células con respecto al control (Figura 34-A, Ctrl:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.818 RIC: 0.341-1.479 Vs. ACh:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.573 RIC: 0.315-1.101,  $n = 114$ ,  $W = -3493$ ,  $p = 7.89e-07$ , CBRP = 0.532; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Este efecto fue revertido mediante el lavado con solución de registro extracelular durante un minuto (Figura 34-B,  $n = 37$ ,  $Q = 18.54$ ,  $p = 9.418e-05$ . Test de Friedman. Extra Vs. ACh:  $p = 0.000705$ , Extra Vs. Lavado:  $p = 0.608054$ . Procedimiento de comparación múltiple de Dunn). Este resultado indica que la acetilcolina disminuye la entrada de calcio a través de los canales  $CaV1.3$  que se produce en respuesta a la estimulación. Este resultado puede ser explicado por la hiperpolarización de las CCs que se produce tras la activación de un receptor colinérgico nicotínico acoplado a un canal de potasio activado por calcio.

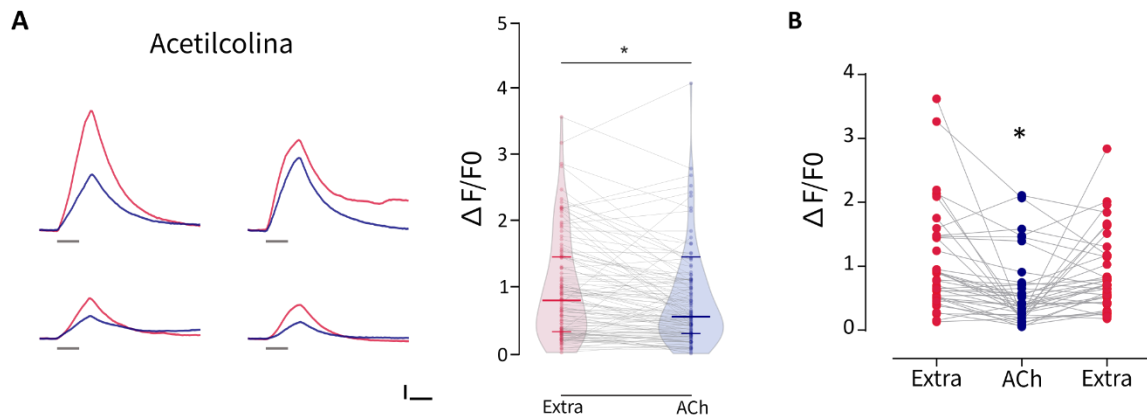


Figura 34 | La ACh inhibe las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas mecánicamente.

A. Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica, antes (rojo) y después (azul) de la aplicación de ACh 1 mM. Las curvas están alineadas al inicio del estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  en respuesta a la estimulación mecánica, antes y después de la aplicación de ACh 1 mM. Se observa una reducción en la intensidad de fluorescencia de las respuestas mecanosensoriales ( $n = 114$ ,  $W=3493$ ,  $*p = 7.89\text{e-}07$ ,  $\text{CBRP}= 0.532$ ; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Extra: solución extracelular de imaging, ACh: Acetilcolina. Escala horizontal: 1.5 seg, escala vertical: 25%  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ . La duración del estímulo se indica con líneas grises debajo de cada curva temporal. B Intensidad de fluorescencia de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas mecánicamente antes y durante la aplicación de ACh y luego de un lavado de un minuto con solución extracelular de imaging ( $n=37$ ,  $Q= 18.54$ ,  $p=9.418\text{e-}05$ . Test de Friedman. Extra Vs. ACh:  $p=0.000705$ , Extra Vs. Lavado:  $p=0.608054$ . Procedimiento de comparación múltiple de Dunn).

Estudios recientes sugieren que en la IIp la modulación de la actividad de las neuronas aferentes por parte del sistema eferente depende de la polaridad de las células ciliadas que éstas inervan (Pichler and Lagnado, 2020). En particular, la inhibición sólo se observa en la actividad de las fibras aferentes que contactan CCs con orientación anterior-posterior. Con el objetivo de evaluar si esta selectividad también se observa a nivel de las CCs, analizamos el efecto inhibitorio de la ACh dividiendo a las células por su orientación de preferencia. La aplicación de acetilcolina generó una disminución estadísticamente significativa del pico de fluorescencia tanto en las células con selectividad anterior-posterior como en aquellas con selectividad posterior-anterior (Figura 35-A, Ant-Post, Extra  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  Mdn= 0.783 - ACh  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  Mdn= 0.559,  $n= 62$ ,  $W= -1227$ ,  $p= 1.698\text{e-}05$ ,  $\text{CBRP}= 0.628$ ; Post-Ant, Extra  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  Mdn= 0.831 - ACh

$\Delta F/F_0$  Mdn= 0.653, n= 52, W= -582, p=0.008, CBRP= 0.422; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Además, no encontramos diferencias significativas en la magnitud del efecto mediado por la ACh sobre células con polaridades opuestas (Figura 35-B, Ant-Post Dif  $\Delta F/F_0$  rel. Mdn = -0.2003 RIC: -0.424-0.051 Vs. Post-Ant Dif  $\Delta F/F_0$  rel. Mdn = -0.241 RIC: -0.497-0.118, U= 1560, p = 0.7687; test de Mann-Whitney). Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que, al menos a nivel de las células ciliadas, el efecto inhibitorio del sistema eferente colinérgico no afecta de manera diferencial a las células según su orientación de preferencia.

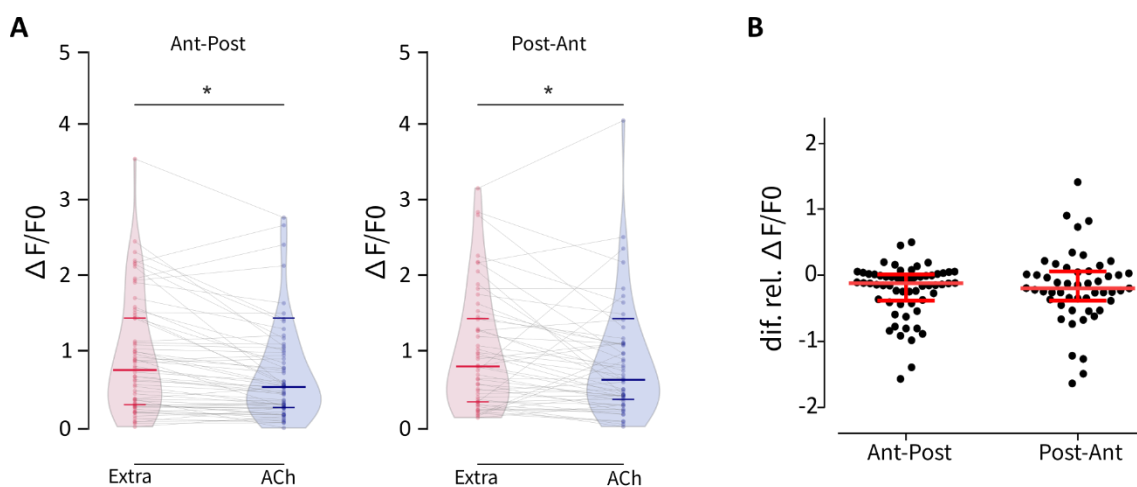


Figura 35 | El efecto inhibitorio de la ACh no presenta diferencias según la orientación de preferencia de las CC.

A. Distribución de los picos de  $\Delta F/F_0$  antes y después de la aplicación de ACh 1 mM para células con orientación de preferencia Anterior-posterior (izquierda) y posterior-anterior (derecha). La aplicación de ACh genera una reducción en los picos de fluorescencia en ambos tipos de célula (Ant-Post, n= 62, W= -1227, p= 1.698e-05, CBRP= 0.628; Post-Ant, n= 52, W= -582, p=0.008, CBRP= 0.422; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). B. Diferencias relativas de  $\Delta F/F_0$  entra la estimulación en condiciones control y en presencia de ACh 1 mM para células con preferencia de orientación anterior-posterior (Ant-Post) y posterior-anterior (Post-Ant) (U= 1560, p = 0.7687; test de Mann-Whitney).

Es interesante observar que, si bien el efecto global de la ACh es el de disminuir la entrada de  $Ca^{2+}$  en las CCs evocada por una estimulación mecánica de los cilios, este efecto no es homogéneo. Como se observa en la Figura 34, algunas células no presentaron cambios en la intensidad de fluorescencia al ser estimuladas, e incluso en algunos pocos casos se observó un aumento de la

misma. Por lo tanto, podemos concluir que el efecto de la ACh en las señales de  $Ca^{2+}$  en respuesta a la estimulación mecánica es heterogéneo. Para cuantificar el grado de inhibición provocado por la ACh, utilizamos una métrica *ad-hoc*, el índice de inhibición (II). Si  $\Delta F/F_{0Extra}$  es el pico del cambio en la intensidad de fluorescencia para un estímulo mecánico bajo condiciones control y  $\Delta F/F_{0ACh}$  es el pico del cambio en la intensidad de fluorescencia para un segundo estímulo mecánico en presencia de ACh, definimos el II como:

$$II = \frac{\frac{\Delta F}{F_{0Extra}} - \frac{\Delta F}{F_{0ACh}}}{\frac{\Delta F}{F_{0Extra}}}$$

De esta manera, un II con un valor de 0 indica ausencia de inhibición, II=1 indica una inhibición total y un índice con un valor entre 0 y 1 indica una inhibición parcial. En la Figura 36-B se muestra la distribución del II para las células ciliadas tratadas con ACh. Como era de esperarse, en la mayoría de los casos, los valores del II fueron mayores a 0. Sin embargo, una subpoblación de CC presentaron un II cercano a 0, lo que implica la ausencia de inhibición mediada por acetilcolina. La ausencia de células con II=1 es una consecuencia de nuestro criterio de selección, que implica la utilización de células con señales de calcio evocadas mecánicamente que puedan ser medidas tanto en condiciones control, como durante la aplicación de ACh. Por este mismo motivo es posible que el efecto inhibitorio de la acetilcolina esté siendo subestimado.

De manera similar, para las condiciones control, calculamos un índice de cambio (IC) definido como:

$$IC = \frac{\frac{\Delta F}{F_0E_1} - \frac{\Delta F}{F_0E_2}}{\frac{\Delta F}{F_0E_1}}$$

Donde  $\Delta F/F_{0_{E1}}$  es el pico del cambio en la intensidad de fluorescencia para un estímulo mecánico en condiciones control (únicamente en presencia de solución extracelular) y  $\Delta F/F_{0_{E2}}$  es el pico del cambio en la intensidad de fluorescencia para un estímulo subsiguiente bajo las mismas condiciones. Se puede observar que, de acuerdo con lo esperado, la distribución del IC está alrededor del 0 (es decir los dos pulsos generan un pico de fluorescencia de intensidad similar). Sin embargo, un pequeño número de células (~10%) presenta valores negativos considerables, lo que indica que el segundo estímulo generó una señal de fluorescencia mucho mayor que el primero (Figura 36-A). Este fenómeno nos permite descartar la posibilidad de que los valores negativos observados al calcular el II se deban a un efecto de la ACh, y sugiere que es debido a la heterogeneidad funcional de las células ciliadas de la línea lateral posterior del pez cebra.

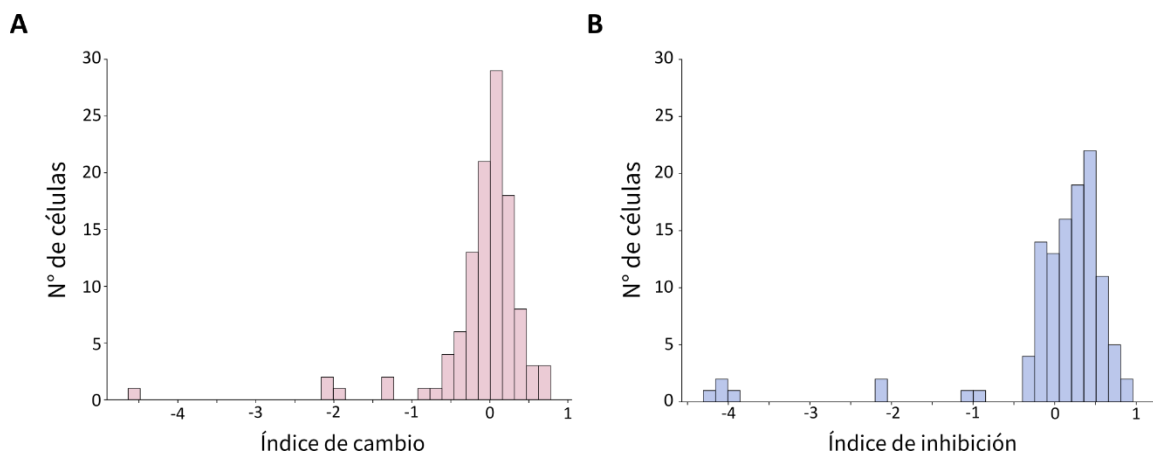


Figura 36 | El efecto inhibitorio mediado por la ACh es heterogéneo.

A. Distribución del índice de cambio (IC, calculado como  $(\Delta F/F_{0_{estim1}} - \Delta F/F_{0_{estim2}}) / \Delta F/F_{0_{estim1}}$ ) para dos estímulos mecánicos sucesivos en condiciones control (solución extracelular de imaging). Se puede observar que, si bien la distribución se centra en 0, un número reducido de células (<10%) exhiben valores negativos que ocurren cuando la señal de fluorescencia es mayor durante el segundo estímulo. B. Distribución del índice de inhibición (II, calculado como  $(\Delta F/F_{0_{extra}} - \Delta F/F_{0_{ACh}}) / \Delta F/F_{0_{extra}}$ ) para un estímulo en presencia de ACh 1 mM luego de un estímulo en condiciones control (solución extracelular de imaging). Nuevamente se puede observar la presencia de los mismos puntos experimentales con valores negativos.

Para poder determinar si el efecto inhibitorio provocado por la acetilcolina está efectivamente mediado por un receptor compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y/o

$\alpha 10$  utilizamos un antagonista de estos receptores, la  $\alpha$ -bungarotoxina. En primer lugar, controlamos que esta toxina no tuviera un efecto *per se* en el cambio de la intensidad de fluorescencia generado por la estimulación mecánica. Para esto realizamos dos estimulaciones sucesivas: sin aplicación de la toxina en la primera (solo en presencia de solución de registro extracelular) y con la preincubación y aplicación de la  $\alpha$ -Btx en la subsiguiente. Pudimos comprobar que la toxina por sí sola no tiene ningún efecto sobre la intensidad de fluorescencia (Figura 37-A, Extra:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.509 RIC: 0.252-1.134 Vs.  $\alpha$ -Btx:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.534 RIC: 0.331-1.325, n = 25, W= -45, p= 0.5449, CBRP= 0.138; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). En la Figura 37-B se puede observar que al realizar una preincubación con  $\alpha$ -Btx 10  $\mu$ M y co-aplicarla con ACh, la toxina bloquea el efecto inhibitorio de este agonista ( $\alpha$ -Btx:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.534 RIC: 0.3308-1.325 Vs. ACh- $\alpha$ -Btx:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.4015 RIC: 0.203-0.816, n = 25, W= -87, p= 0.2541, CBRP = 0.268, Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Este resultado apoya la hipótesis de la presencia de un receptor colinérgico nicotínico funcional conformado por, al menos, la subunidad  $\alpha 9$  en la sinapsis eferente de la IIp del pez cebra.

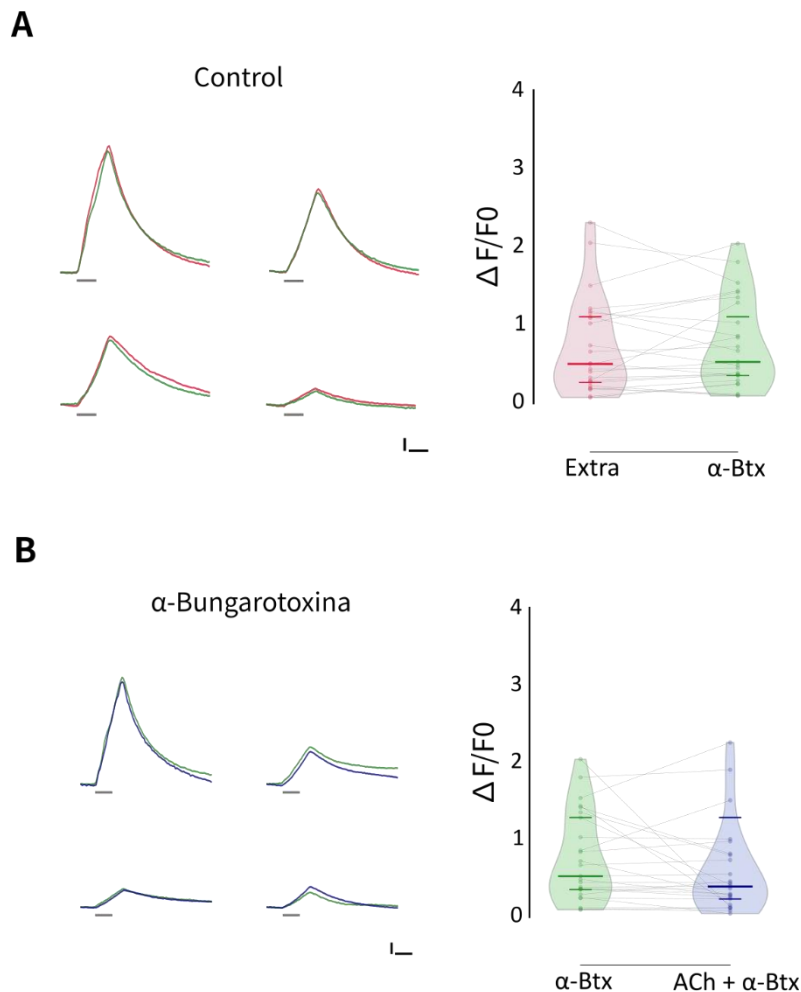


Figura 37 | La inhibición de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por ACh es bloqueada por  $\alpha$ -bungarotoxina.

A. Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica, antes (rojo) y después (verde) de la aplicación de  $\alpha$ -Btx 10  $\mu\text{M}$ . Las curvas están alineadas al inicio del estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta F/F_0$  antes y después de la aplicación de  $\alpha$ -Btx 10  $\mu\text{M}$ , que no mostraron diferencias significativas. Esto indica que la  $\alpha$ -Btx no tiene un efecto per se sobre las señales evocadas de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n = 25$ ,  $W = -45$ ,  $p = 0.5449$ ,  $\text{CBRP} = 0.138$ ; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). B. Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica, durante la aplicación de  $\alpha$ -Btx 10  $\mu\text{M}$  (verde) y durante la co-aplicación de ACh 1 mM y  $\alpha$ -Btx 10  $\mu\text{M}$  (azul). Las curvas están alineadas al inicio del estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta F/F_0$  en presencia únicamente de  $\alpha$ -Btx 10  $\mu\text{M}$  y durante la co-aplicación de ACh 1 mM y  $\alpha$ -Btx 10  $\mu\text{M}$ , que no mostraron diferencias significativas. Esto implica que la inhibición mediada por ACh es bloqueada por  $\alpha$ -Btx ( $n = 25$ ,  $W = -87$ ,  $p = 0.2541$ ,  $\text{CBRP} = 0.268$ , Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Extra: Solución extracelular de imaging,  $\alpha$ -Btx:  $\alpha$ -bungarotoxina, ACh: Acetilcolina. Escala horizontal: 1.5 seg, escala vertical: 25%  $\Delta F/F_0$ . La duración del estímulo se indica con líneas grises debajo de cada curva temporal.



Se ha demostrado que, en aves y mamíferos, la sinapsis que se establece entre las células ciliadas y las fibras eferentes debe su naturaleza inhibitoria al acople funcional del receptor colinérgico nicotínico  $\alpha 9\alpha 10$  con el canal de potasio activado por calcio SK2 que al activarse genera la hiperpolarización de las CC (Elgoyhen and Katz, 2012; Gómez-Casati et al., 2005; Hiel et al., 2000; Matthews et al., 2005; Oliver et al., 2000). Para evaluar si el mismo acople funcional existe en las células ciliadas de la línea lateral posterior del pez cebra, utilizamos un bloqueante de los canales SK, la apamina. Para ello realizamos un esquema experimental similar al que utilizamos para evaluar el efecto de la  $\alpha$ -Btx. Como se muestra en la Figura 38-A la apamina por sí sola no modificó la intensidad de fluorescencia (Extra:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.599 RIC: 0.243-1.216 Vs. Apa:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.567 RIC: 0.191-1.040, n = 41, W= -91, p= 0.5554, CBRP = 0.106; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Sin embargo, en presencia de apamina, el efecto inhibitorio de la ACh fue bloqueado (Figura 38-B, Apa:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.470 RIC: 0.176-0.818 Vs. Apa-ACh:  $\Delta F/F_0$  Mdn= 0.508 RIC: 0.192-0.718, n = 60, W= -322, p= 0.2359, CBRP = 0.1759; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Este resultado sugiere que el nAChR nativo de la sinapsis eferente de la llp está acoplado funcionalmente a canales de potasio del tipo SK que al activarse e hiperpolarizar las CCs genera, en última instancia, una entrada menor de  $Ca^{2+}$  cuando las CC son estimuladas mecánicamente.

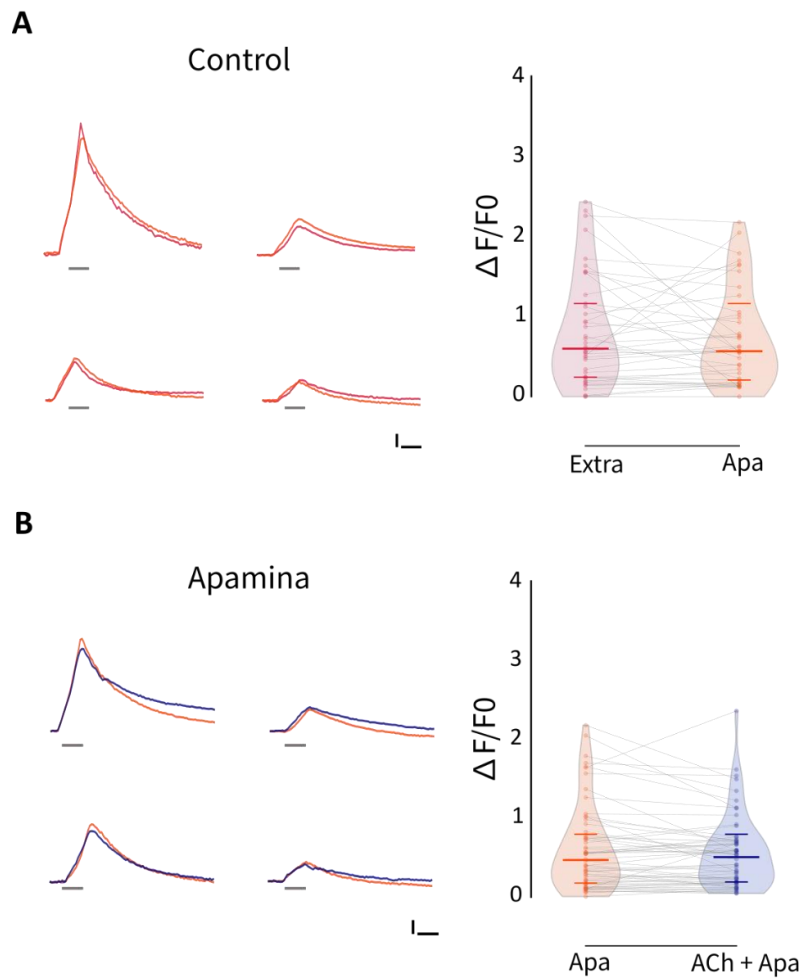


Figura 38 | La inhibición de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por ACh es bloqueada por Apamina.

A. Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica, antes (rojo) y después (naranja) de la aplicación de apamina  $10\ \mu\text{M}$ . Las curvas están alineadas al inicio del estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  antes y después de la aplicación de apamina  $10\ \mu\text{M}$ , que no mostraron diferencias significativas. Esto indica que la apamina no tiene un efecto per se sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por estímulo mecánico ( $n = 41$ ,  $W = -91$ ,  $p = 0.5554$ ,  $\text{CBRP} = 0.106$ ; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). B. Izquierda, curvas temporales de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  representativas de 4 células ciliadas en respuesta a la estimulación mecánica, durante la aplicación de apamina  $10\ \mu\text{M}$  (naranja) y durante la co-aplicación de ACh  $1\ \text{mM}$  y apamina  $10\ \mu\text{M}$  (azul). Las curvas están alineadas al inicio de estímulo mecánico. Derecha, distribución de los picos de  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$  en presencia únicamente de apamina  $10\ \mu\text{M}$  y durante la co-aplicación de ACh  $1\ \text{mM}$  y apamina  $10\ \mu\text{M}$ , que no mostraron diferencias significativas. Esto implica que la inhibición mediada por ACh es bloqueada por apamina ( $n = 60$ ,  $W = -322$ ,  $p = 0.2359$ ,  $\text{CBRP} = 0.1759$ ; Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas). Extra: Solución extracelular de imaging, Apa: apamina. ACh: Acetilcolina. Escala horizontal: 1.5 seg, escala vertical: 25%  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ . La duración del estímulo se indica con líneas grises debajo de cada curva temporal.

## Conclusión

Del conjunto de los experimentos *in vivo* podemos concluir que un receptor conformado por subunidades  $\alpha 9$  ( $\alpha 9^*$  según la nomenclatura establecida en (Lukas et al., 1999) media la transmisión sináptica entre las fibras eferentes de la línea lateral posterior del pez cebra y las CCs de los neuromastos. Por otro lado, y al igual que en otros sistemas eferentes colinérgicos, el efecto inhibitorio proviene de un acople funcional entre el receptor nicotínico y un canal de baja conductancia de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  de tipo SK.

# DISCUSIÓN

Los sistemas sensoriales de vertebrados que contienen células ciliadas son inervados por fibras eferentes que modulan su respuesta a estímulos externos (Bricaud et al., 2001; Guinan and Stankovic, 1996; Metcalfe et al., 1985; Russell, 1971). En la línea lateral de anfibios y peces, la excitación de las fibras eferentes colinérgicas inhibe la actividad aferente a través de la generación de potenciales postsinápticos inhibitorios en las CC (Flock and Russell, 1976, 1973; Russell, 1971). Además, se ha demostrado la existencia de efectos excitatorios eferentes, mediados por dopamina actuando a través de receptores D1b (Toro et al., 2015), cuando la transmisión colinérgica es bloqueada (Flock and Russell, 1973). Hasta la realización del presente estudio los actores moleculares que median los efectos inhibitorios de la acetilcolina en la línea lateral del pez cebra eran desconocidos. Los resultados presentados en este trabajo de análisis de la expresión génica, clonado molecular, expresión de receptores en un sistema heterólogo y experimentos *in vivo* de imágenes de  $Ca^{2+}$ , indican que un receptor colinérgico conformado por subunidades  $\alpha 9$  ( $\alpha 9^*$  según la nomenclatura establecida en Lukas et al., 1999), está presente en la base de las CCs y opera en la sinapsis eferente de la línea lateral posterior del pez cebra (Figura 39). Más aún, la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de estos receptores activa canales cercanos del tipo SK2, lo cual finalmente lleva a una hiperpolarización de las células ciliadas. Si bien se ha descrito que potencialmente la subunidad  $\alpha 9$  forma receptores homoméricos funcionales en células tumorales epiteliales de mama humanas (Lee et al., 2010), nuestro trabajo es la primera evidencia de la existencia de un receptor nicotínico homomérico funcional formado únicamente por la subunidad  $\alpha 9$  que participa en una sinapsis eferente de un sistema sensorial.

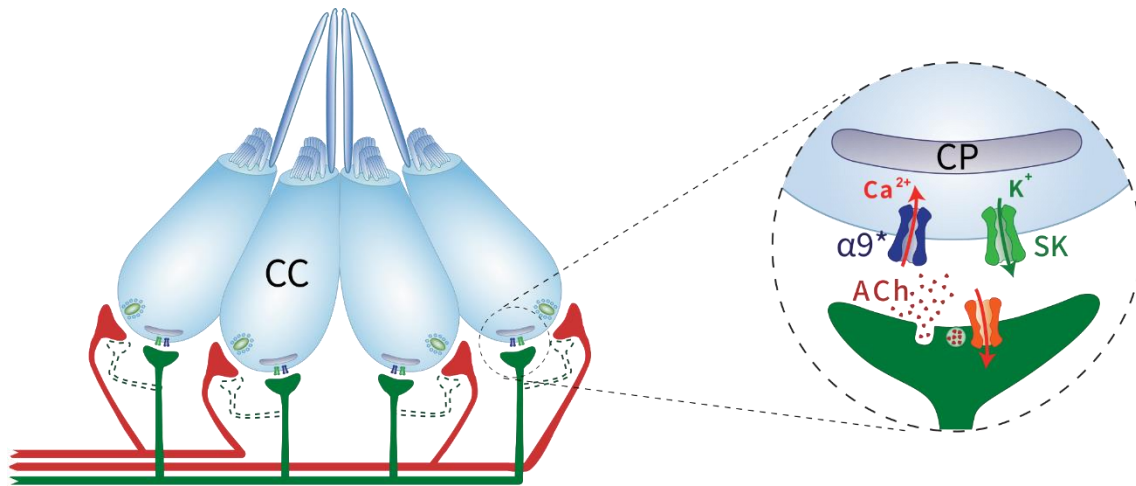


Figura 39 | Esquema de la sinapsis eferente colinérgica de la llp.

Las CCs de la línea lateral son invadas por fibras aferentes (rojas) y eferentes colinérgicas (verdes). Aún no existe evidencia contundente de la existencia de colaterales eferentes que contacten las fibras aferentes (verdes punteadas). El efecto neto de la actividad eferente colinérgica de la llp es el de hiperpolarizar las CCs. Este efecto está mediado por la activación de un nAChR  $\alpha 9^*$  con alta permeabilidad al  $Ca^{2+}$  y la subsecuente activación de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  del tipo SK que genera la hiperpolarización. Se ha propuesto que las cisternas postsinápticas (CP) que se oponen a los terminales eferentes (Dow et al., 2018) pueden participar en la compartimentalización del  $Ca^{2+}$  y/o en mecanismos de liberación de  $Ca^{2+}$  inducidos por  $Ca^{2+}$ .

## Estudio de la expresión génica y clonado de las subunidades nicotínicas recombinantes $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de pez cebra.

Luego de recolectar los datos de expresión de varios estudios y analizar el enriquecimiento de los genes de interés en las células ciliadas de neuromastos de la línea lateral, observamos que, independientemente del control utilizado en cada estudio, la expresión del gen que codifica para la subunidad  $\alpha 9$  se encuentra enriquecido.

La invasión eferente mediada por receptores colinérgicos  $\alpha 9^*$  es una característica en común de todas las células ciliadas de vertebrados estudiadas hasta el momento (Elgoyhen et al., 1994; Glowatzki and Fuchs, 2000; Hiel et al., 2000; Holt et al., 2003; Parks et al., 2017). En los mamíferos, la actividad medial-

olivococlear eferente está mediada por receptores  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001; Gómez-Casati et al., 2005; Lustig et al., 2001; Sgard et al., 2002). Más aún, la subunidad  $\alpha 10$  es estrictamente necesaria para la función eferente, ya que los receptores homoméricos  $\alpha 9$ , expresados en ratones  $\alpha 10^{-/-}$ , no son funcionales para ejercer el efecto inhibitorio del sistema eferente (Vetter et al., 2007). Teniendo en cuenta esto, es sorprendente que en las células ciliadas del pez cebra, la expresión del gen que codifica para la subunidad  $\alpha 10$  no esté enriquecida. Cabe destacar que, en la mayoría de los estudios utilizados para este análisis de expresión génica, debido a los métodos de obtención y aislamiento de las células ciliadas, no se diferenciaron las células provenientes de la línea lateral de aquellas provenientes del oído. Por este motivo, si bien suponemos funcionamientos similares entre las células ciliadas de la línea lateral y las del oído interno, no podemos asegurar que la expresión diferencial de los genes mencionados provenga de uno o ambos tipos de CC. Sin embargo, el estudio reciente de RNAseq donde se comparan los niveles de expresión entre diferentes tipos celulares del neuromasto, indica claramente que *chrna9*, pero no *chrna10*, se expresa de manera diferencial en las células ciliadas maduras con respecto a cualquier otro tipo celular de la llp (Lush et al., 2019). El grupo control de este estudio incluyó células ciliadas inmaduras, lo que indica que la expresión de  $\alpha 9$  es un marcador de maduración de células ciliadas.

Los resultados del análisis de expresión génica realizado en el presente trabajo están en concordancia con un estudio de hibridación *in situ* realizado en el laboratorio de la Dra. Paola Plazas (Castagnola., 2017), el cual hemos publicado en colaboración (Carpaneto Freixas et al., 2021). Utilizando sondas antisentido que detectan el ARNm de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ , se observó la expresión de *chrna9*, pero no de *chrna10*, tanto en neuromastos de la línea lateral como en la vesícula ótica. En su conjunto, el análisis de expresión génica y el estudio de hibridación *in situ*, indican que la subunidad  $\alpha 10$  no se expresa en las CC de la llp y que el nAChR de la sinapsis eferente de la ll resultaría del ensamblado de subunidades  $\alpha 9$  formando un receptor homomérico. Sin embargo, dado que los estudios de expresión génica fueron realizados en larvas de entre 4 y 5 dpf y las hibridaciones *in situ* en larvas de 5 dpf, no podemos descartar la expresión diferencial de *chrna10* en otros estadios del desarrollo del pez cebra.

Dado que toda la evidencia recolectada en este trabajo indica que el nAChR que participa en la sinapsis eferente de la IIP está compuesto únicamente por la subunidad  $\alpha 9$ , podría plantearse la posibilidad de que *chrna10* fuera un pseudogen. Sin embargo, este no es el caso, dado que hemos logrado amplificar su ADNc mediante RT-PCR utilizando primers poli-T, lo cual implica la existencia de ARNm transcrito a partir de este gen. Además, la inyección del ARNc, obtenido a partir de este ADNc, en un sistema heterólogo demostró que  $\alpha 10$  se co-ensambla con  $\alpha 9$  para formar receptores heteroméricos funcionales.

## Homeostasis del calcio y analogía con las células ciliadas de la cóclea

En la cóclea de los mamíferos, las células mecanosensoriales se ubican en el órgano de Corti y se dividen en dos tipos: las células ciliadas internas y las células ciliadas externas. En el sistema maduro, las CCI constituyen el fonoreceptor propiamente dicho mientras que las CCEs participan de mecanismos de amplificación coclear que producen un refinamiento en el grado de discriminación de las frecuencias sonoras (sintonización fina) y un incremento en la sensibilidad a estímulos sonoros de baja intensidad (Ashmore, 2008). El pez cebra es un modelo que permite realizar estudios de imágenes a nivel de célula única *in vivo* y en un organismo intacto gracias a la simpleza y fácil accesibilidad de su IIP en estados larvales y a la transparencia de sus embriones y larvas. Además, existe una amplia lista de líneas transgénicas con expresión de genes reporteros en distintos tejidos específicos disponible. Por lo tanto, surge la posibilidad de poder utilizar al pez cebra para evaluar la funcionalidad y propiedades mecánicas de las células ciliadas y extrapolar los resultados a las CCs de la cóclea que son de más difícil acceso. Para ello es importante evaluar cuál de los dos tipos de CCs de la cóclea es análogo a las células ciliadas de la IIP desde un punto de vista molecular. Con este objetivo, basándonos en una publicación reciente (Ranum et al., 2019), analizamos los niveles de expresión de un conjunto de genes involucrados en la señalización mediada por calcio y que tienen expresión enriquecida en CCI o CCE. Por ejemplo, mientras que en las CCE se expresan de manera diferencial *Ocm*, *Sri* y *Slc26a5*, en las CCI, se

expresan de manera diferencial *Otof* y *Atp2a3*. Cada uno de estos genes juega un rol fundamental para el funcionamiento de las células ciliadas. *Ocm* es el gen que codifica para la oncomodulina, una proteína con propiedades de “amortiguación” de  $Ca^{2+}$  que se localiza en la membrana celular lateral y es necesaria para la amplificación coclear (Simmons et al., 2010; Tong et al., 2016). *Sri* codifica para la sorcina, proteína que participa en la inhibición dependiente de calcio del fenómeno de liberación de calcio inducida por calcio a través de la inhibición de receptores de rianodina (Farrell et al., 2003; Lokuta et al., 1997). *Slc26a5*, codifica para la prestina, proteína fundamental para la electromotilidad característica de las CCE (Dallos, 2008). *Otof* codifica para la otoferlina, proteína fundamental para la audición, dado que participa en la fusión de las vesículas sinápticas para la liberación de glutamato hacia las fibras aferentes (Beurg et al., 2010, 2008) y *atp2a3*, codifica para una de las bombas SERCA encargadas del transporte de  $Ca^{2+}$  entre el retículo endoplasmático y el citoplasma de las CCI (Lioudyno et al., 2004).

Los resultados del presente trabajo muestran que las CCs del pez cebra presentan un patrón de expresión “mixto” entre CCI e CCE, con niveles altos de expresión diferencial tanto de *Ocma* y *Ocmb* como de *Otofa* y *Otofb*, los dos marcadores diferenciales más importantes de CCEs y CCIs, respectivamente. Este hecho comienza a configurar la noción de que las células ciliadas del pez cebra son particulares en cuanto a sus características y propiedades. Si bien pueden ser utilizadas como modelo de estudio de la mecánica de las CCs de mamíferos y de las sinapsis en las que estas participan, su funcionamiento no es siempre comparable de manera lineal.

## Caracterización de los receptores recombinantes formados por las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de pez cebra.

Tanto los receptores  $\alpha 9$  como los  $\alpha 9\alpha 10$  son nAChR peculiares, con características biofísicas y farmacológicas únicas que los distinguen del resto de los receptores de su tipo (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Lipovsek et al., 2014, 2012; Marcovich et al., 2020; Weisstaub et al., 2002). Las subunidades que los



conforman fueron las últimas en ser descubiertas, en parte, debido a su acotado patrón de expresión espacial y también, a su bajo porcentaje de homología de secuencia con las otras subunidades nicotínicas (Elgoyhen et al., 2001, 1994). Además, si bien estos receptores conforman un canal catiónico, están implicados en sinapsis inhibitorias por estar acoplados a un canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  (Fuchs and Murrow, 1992; Housley and Ashmore, 1991). Este es el único caso descrito hasta la actualidad en que la activación de un receptor nicotínico resulta en la hiperpolarización de la célula que lo expresa (Castellano-Muñoz et al., 2010; Dallos et al., 1997; Fuchs and Murrow, 1992; Glowatzki and Fuchs, 2000; Housley and Ashmore, 1991). Por otro lado, estos nAChR epiteliales presentan un perfil farmacológico particular ya que son bloqueados por nicotina y por antagonistas nicotínicos, muscarínicos, glicinérgicos, serotoninérgicos y gabaérgicos (Rothlin et al., 2003, 1999; Verbitsky et al., 2000). Los resultados del presente trabajo demuestran que los receptores  $\alpha 9^*$  del pez cebra, al igual que sus contrapartes en otras especies, poseen propiedades biofísicas y farmacológicas particulares y diferentes del resto de los nAChRs.

El hecho de que la subunidad  $\alpha 9$  de pez cebra pueda formar receptores homoméricos funcionales indica que, al igual que lo reportado para la subunidad  $\alpha 9$  de rata (Elgoyhen et al., 1994), esta subunidad puede aportar tanto componentes principales como complementarios al sitio de unión del agonista. Por otro lado, el hecho de que la subunidad  $\alpha 10$  no se ensambla en receptores funcionales activados por ACh, podría deberse al aporte deficiente de componentes complementarios por parte de esta subunidad, como ha sido descrito para su contraparte murina (Boffi et al., 2017; Marcovich et al., 2020). Sin embargo, son necesarios más estudios a nivel de secuencia para poder validar esta teoría.

A diferencia de lo reportado para el receptor homomérico  $\alpha 9$  de rata, el cual presenta corrientes muy pequeñas en respuesta a ACh que se potencian de manera significativa cuando la subunidad  $\alpha 9$  es co-expresada con la subunidad  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Sgard et al., 2002), en el caso del receptor  $\alpha 9$  homomérico del pez cebra las corrientes evocadas por el agonista son de una magnitud considerable. Más aún, estas corrientes no se potencian al co-expresar en el mismo oocito las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . Por otro lado, para el ensamblado

del receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  se requiere forzar la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  mediante la inyección de ARNc en una relación  $\alpha 10: \alpha 9/2:1$ . Estos resultados funcionales, en conjunto con los de expresión génica, indicarían que el ensamblado del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  heteromérico podría verse muy desfavorecido en la línea lateral del pez cebra. En otras palabras, de estas evidencias se puede concluir que el nAChR que media la transmisión sináptica entre fibras eferentes y las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral es un receptor  $\alpha 9$  homomérico.

La tasa de desensibilización del receptor  $\alpha 9$  homomérico del pez cebra (ver Figura 18 en “resultados”) es muy superior a la reportada para los receptores  $\alpha 9$  de rata (Elgoyhen et al., 1994; Katz et al., 2000) y de pollo (Lipovsek et al., 2012). Cabe destacar que, a pesar de que los receptores homoméricos formados por la subunidad  $\alpha 9$  del pez cebra presentan una tasa de desensibilización considerable, el co-ensamblado con la subunidad  $\alpha 10$  genera un aumento significativo en la desensibilización del receptor. Estas cinéticas diferenciales podrían cobrar importancia funcional si en alguna etapa del desarrollo del pez, el perfil de expresión del gen *chrna10* se viese alterado en las células del neuromasto o en otros órganos no estudiados en este trabajo. Si bien existen diferencias en la abundancia, localización y la distribución anatómica de los terminales eferentes que contactan a las CCs de la línea lateral del pez y la cóclea en los mamíferos, la homeostasis del  $Ca^{2+}$  es, probablemente, una de las características clave de este tipo de sinapsis. El hecho de que los receptores  $\alpha 9^*$  de pez cebra presentan una cinética de desensibilización tan marcada, probablemente resulta en una autolimitación en la entrada de calcio a través de este receptor (permeable para este catión) en su contexto fisiológico y, consecuentemente, en la auto-regulación de la activación del canal SK y la hiperpolarización de la célula. En las CCIs internas de la cóclea en desarrollo, se ha reportado que la limitación en la entrada de  $Ca^{2+}$  es clave para prevenir la interacción entre los sistemas eferente y aferente, que coexisten en la misma célula (Moglie et al., 2018). Lo mismo sucede en las CC de la IIP, donde coexisten ambos sistemas. Por lo tanto, la regulación de la apertura del receptor  $\alpha 9^*$  y, consecuentemente, de la entrada de calcio podría resultar importante para prevenir dicha interacción. De no limitarla, el  $Ca^{2+}$  que ingresa a través del

sistema eferente podría difundir y gatillar la liberación de glutamato con la consecuente activación de las fibras aferentes. En el caso de los receptores  $\alpha 9\alpha 10$  de rata, la desensibilización del receptor es aportada por la presencia de la subunidad  $\alpha 10$  (Elgoyhen et al., 2001). Dado que, según los resultados obtenidos, la respuesta eferente en la lIp del pez cebra depende de receptores  $\alpha 9$  homoméricos, se podría proponer que, de acuerdo al camino evolutivo descrito para los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (Franchini and Elgoyhen, 2006; Lipovsek et al., 2014, 2012; Marcovich et al., 2020), sustituciones no sinónimas en la secuencia codificante de la subunidad  $\alpha 9$  resultaron en un receptor adaptado para poder “auto-limitar” la entrada de  $Ca^{2+}$  a las CCs.

La afinidad aparente de la ACh por los receptores  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra tiene un comportamiento particular y diferente a lo descrito para sus contrapartes de otros vertebrados (Elgoyhen et al., 2001, 1994; Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020). Por un lado, si bien la  $CE_{50}$  del receptor homomérico  $\alpha 9$  es similar en magnitud a la que presentan sus contrapartes de pollo y rata, a diferencia de lo que sucede en estas dos especies o incluso en las ranas (donde la  $CE_{50}$  del receptor homomérico  $\alpha 9$  es un orden de magnitud mayor), en el caso del pez cebra la co-expresión con  $\alpha 10$  provoca un corrimiento de la curva dosis respuesta a la ACh hacia la derecha, disminuyendo marcadamente la afinidad aparente por el agonista. Estos resultados indican que la ACh posee una potencia 30 veces menor sobre el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  que sobre el  $\alpha 9$  de pez cebra. Lo cual podría sugerir que el nAChR de las CCs de los neuromastos es un homomérico  $\alpha 9$  ya que, en experimentos realizados sobre nAChRs nativos de CCs se ha demostrado que la  $CE_{50}$  de los mismos en varias especies es del orden de 10  $\mu M$  (Chen et al., 1996; Fuchs and Murrow, 1992). Una  $CE_{50}$  órdenes de magnitud más alta (como es el caso del receptor nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra) podría ubicarse en el rango de desensibilización de los receptores y por lo tanto posibilitaría un rango dinámico muy acotado de respuestas sinápticas.

Se ha propuesto que la evolución de las subunidades de receptores nicotínicos está determinada por el sitio de expresión de cada subunidad, así como también por su capacidad de co-ensamblarse con otras subunidades nicotínicas. Además se comprobó que las secuencias codificantes de los genes de las subunidades de receptores nicotínicos neuronales están muy conservadas, mientras que las

secuencia de subunidades epiteliales divergen entre especies de vertebrados, con un menor porcentaje de identidad de secuencia entre los ortólogos de no-mamíferos (Lipovsek et al., 2012; Marcovich et al., 2020). Al igual que estos trabajos previos, hemos demostrado que la identidad de secuencia de los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  del pez cebra es baja y, por lo tanto, proponemos que la poca conservación en la identidad de secuencia que presentan las proteínas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra podría explicar las diferencias en funcionalidad detectadas para los receptores de esta especie. Las diferencias observadas en los patrones de desensibilización y afinidad aparente por ACh entre los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  del pez cebra, sumado a las diferencias funcionales observadas entre los nAChRs  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  de las especies de vertebrados estudiadas hasta el momento, apoyan la teoría de que los receptores formados por subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  sufrieron un proceso de selección positiva durante la evolución, adquiriendo cambios no sinónimos en sus secuencia aminoacídicas (Franchini and Elgoyhen, 2006; Lipovsek et al., 2014, 2012; Marcovich et al., 2020).

Una de las características distintivas de los receptores homomérico  $\alpha 9$  y heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  de pez cebra es que, a diferencia de lo reportado para el mismo receptor en otras especies (Elgoyhen et al., 2001; Lipovsek et al., 2014, 2012; Marcovich et al., 2020; Weisstaub et al., 2002), la magnitud de las respuestas ante la aplicación de ACh es insensible a los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esto podría deberse a que, si bien estos receptores se encuentran en un microambiente con concentraciones controladas de iones, la línea lateral está directamente expuesta al medio líquido donde el pez se mueve y por lo tanto a merced de cambios en la composición del mismo. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de receptores de glutamato de alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , como los receptores NMDA, produce una disminución significativa de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Pumain et al., 1987). Dada la alta permeabilidad que parecen presentar los nAChR del pez cebra por el  $\text{Ca}^{2+}$  (extrapolada a partir de la contribución de la corriente de este ion a la corriente total), resulta lógico que estos receptores no sean modulados por este catión divalente, ya que un aumento en la actividad eferente conllevaría a una disminución en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y, por consiguiente, a un cambio en la funcionalidad del receptor.

La falta de modulación por calcio extracelular de las respuestas de los receptores homomérico  $\alpha 9$  de pez cebra difiere de lo reportado en la línea lateral de otras especies, ya que en experimentos realizados en *Xenopus laevis*, se ha demostrado que la inhibición de los impulsos aferentes generados por la estimulación eléctrica de las fibras eferentes desaparece al disminuir la concentración de calcio extracelular (Dawkins et al., 2005), lo que sugiere que las respuestas a ACh de los nAChR de esta especie sí son moduladas por la concentración extracelular de cationes divalentes.

## Caracterización del receptor nativo de la sinapsis eferente de la línea lateral del pez cebra.

Los sistemas eferentes colinérgicos poseen efectos modulatorios en la actividad de la línea lateral y en otros sistemas sensoriales, como ser el auditivo y el vestibular. Esto ha sido demostrado mediante la estimulación eléctrica de las fibras eferentes, la aplicación de agonistas en el baño en sistemas *ex vivo* y la manipulación genética. En todos los casos el efecto observado es el mismo: una disminución de la actividad aferente de neuronas que contactan las células ciliadas (Dawkins et al., 2005; Flock and Russell, 1973; Roberts and Russell, 1972; Russell, 1971; Sewell and Starr, 1991; Vetter et al., 2007). En este trabajo demostramos en un animal entero con su circuito neuronal intacto, compuesto por las células ciliadas y sus neuronas aferentes y eferentes, la inhibición que la ACh produce en la actividad de las células ciliadas. Las señales de calcio que detectamos en los experimentos presentados en este trabajo se deben a una despolarización de las CC dada por la activación de canales iónicos mecanosensitivos debido a la deflexión de los cilios (Corey and Hudspeth, 1979; Fettiplace, 2009; Zhang et al., 2018) y la subsecuente activación de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje dependientes (Moser and Beutner, 2000; Sheets, 2017; Zhang et al., 2018). El hecho de que la aplicación de ACh resulte en una reducción de estas señales indica muy probablemente una despolarización reducida de la membrana. Por este motivo, se podría proponer que la ACh inhibe la entrada de  $Ca^{2+}$  debido a una hiperpolarización neta de las células ciliadas de la llp (ver Figura 4 en “introducción”). Esta hiperpolarización se debe a la activación de

canales de K<sup>+</sup> de tipo SK, dado que el efecto es bloqueado por apamina, un antagonista selectivo de estos canales (Köhler et al., 1996; Shah and Haylett, 2000; Stocker, 2004; Strøbaek et al., 2000). Por lo tanto, los resultados del presente trabajo demuestran que el receptor presente en las células ciliadas de la línea lateral del pez es un receptor homomérico  $\alpha 9$ , con alta permeabilidad al calcio. Como ha sido descrito en otros sistemas eferentes, el Ca<sup>2+</sup> que entra a través de los nAChRs activa canales cercanos del tipo SK, lo que a su vez lleva a una hiperpolarización de la CC. (Blanchet et al., 1996; Dawkins et al., 2005; Doi and Ohmori, 1993; Glowatzki and Fuchs, 2000; Gómez-Casati et al., 2005; Holt et al., 2003; Katz, 2004; Nenov et al., 1996; Oliver et al., 2000; Parks et al., 2017; Yuhas and Fuchs, 1999) Tanto en aves (Matthews et al., 2005) como en mamíferos (Dulon et al., 1998; Oliver et al., 2000), los receptores  $\alpha 9^*$  están acoplados funcionalmente a canales de K<sup>+</sup> del tipo SK2. Sin embargo, nuestro estudio de expresión génica reveló que tanto los genes que codifican para el canal SK2 (*kcnn2*), como para el canal SK1b (*kcnn1b*), se expresan de manera enriquecida en las células ciliadas. Esto es consistente con un trabajo de Cabo y colegas (2013) que demuestra la expresión del receptor SK1 en CC de la llp del pez cebra. Es interesante remarcar que los canales SK1 y SK2 generalmente se co-expresan en el cerebro de peces (Ellis et al., 2008) y mamíferos (Stocker and Pedarzani, 2000). Además, la subunidad SK1 de rata forma canales heteroméricos con subunidades SK2 (Autuori et al., 2019; Benton et al., 2003). El hecho de que la apamina haya bloqueado los efectos mediados por la ACh sugiere que en particular los canales de tipo SK2 juegan un rol fundamental en la hiperpolarización de las CC de la llp del pez cebra, ya que, dentro de los canales del tipo SK, estos son los canales con mayor sensibilidad por este antagonista (Köhler et al., 1996; Shah and Haylett, 2000; Stocker, 2004; Strøbaek et al., 2000).

En el estudio de RNAseq analizado en este trabajo donde se observan los niveles de expresión génicos en las diferentes células del NM (Lush et al., 2019) se puede observar que, además de los genes que codifican para los canales SK, el gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  de los canales BK se expresa de manera diferencial en las CC maduras dentro de los neuromastos. Se ha demostrado que en el pez cebra, el *knockdown* de los genes que codifican para las

subunidades  $\alpha$  de los canales BK incrementa los umbrales de audición, sugiriendo que la expresión de este canal es esencial para la codificación de diferentes frecuencias en vertebrados no mamíferos (Rohmann et al., 2014). Estos canales son dependientes tanto de  $\text{Ca}^{2+}$  como de voltaje y se ha demostrado que se acoplan a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en las CCE de la cóclea de mamíferos en las regiones basales que codifican para frecuencias altas (Rohmann et al., 2015; Wersinger et al., 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que la subunidad  $\alpha 9$  presenta un gradiente longitudinal de expresión en la cóclea, con el máximo de expresión detectado en la región basal (Simmons and Morley, 2011). Sería interesante estudiar si este fenómeno se replica en las CC a lo largo de la línea lateral del pez cebra o en las diferentes células dentro de un mismo neuromasto. Los canales BK presentan mayor conductancia y menor afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que los SK2 (Fakler and Adelman, 2008). Por lo tanto, podría postularse que la alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que presentan los receptores  $\alpha 9^*$  de pez cebra, podría permitir también una efectiva activación de canales de tipo BK. Sin embargo, a diferencia de los canales SK, los canales BK no son bloqueados por apamina (Lingle et al., 1996; Vergara et al., 1998). Dado que nuestros resultados demuestran que la aplicación de apamina es capaz de bloquear la inhibición mediada por la ACh, podemos concluir que los canales BK no participan de la misma. Aun así, todos los registros de este trabajo fueron realizados sobre neuromastos de la zona medial del tronco del pez (neuromastos L2 a L4). Por lo tanto, no podemos descartar que, al igual que lo que sucede en la cóclea de mamíferos, el nivel de expresión del canal BK varíe a lo largo de los diferentes NM de la llp y/o entre las líneas laterales anterior y posterior. Por otro lado, es posible que el voltaje de reposo de las CC varíe entre los diferentes neuromastos o incluso entre células dentro de un mismo NM, y en consecuencia que los canales BK se encuentren inactivos debido a que no alcanzan su potencial de activación (Wersinger et al., 2010). Estudios con bloqueantes específicos de este tipo de canales serían necesarios para evaluar estas hipótesis.

Es interesante observar que aun cuando las CC fueron estimuladas mecánicamente en presencia de una concentración alta de isradipina, se detecta una señal de fluorescencia remanente. La isradipina, al bloquear la

entrada de calcio a través de los canales CaV1.3, ubicados en la zona basal de las CC, debería haber anulado toda señal de calcio. Sin embargo, debido a la técnica de microscopía que utilizamos, microscopía de fluorescencia de campo amplio, es muy probable que esta señal de fluorescencia remanente provenga del Ca<sup>2+</sup> que está entrando a través del canal mecanotransductor, ubicado en la zona apical de las CC. En un estudio publicado en el año 2018, Zhang y colegas demostraron utilizando microscopía confocal que, efectivamente, la isradipina bloquea la entrada de calcio a través de los CCDV ubicados en la base de las células ciliadas, pero no el ingreso de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales de mecanotransducción ubicados en el ápice de las CC.

Cabe mencionar que varios factores inherentes a nuestro modelo experimental podrían generar una subestimación del efecto inhibitorio de la ACh. Por un lado, la ACh y el resto de las drogas fueron aplicadas en larvas intactas y enteras. Aunque se siguieron las prácticas comunes en el campo al utilizar DMSO para favorecer la accesibilidad de las drogas (Sheets, 2017; Sheets et al., 2012; Toro et al., 2015; Trapani and Nicolson, 2011; Wong et al., 2019; Zhang et al., 2018), éstas tienen que atravesar distintas barreras antes de alcanzar su biofase. Además, estudios en la línea lateral de *Xenopus laevis* (Roberts and Russell, 1970) demostraron la necesidad del agregado de un inhibidor de la acetilcolinesterasa para demostrar el efecto de la ACh. Por lo tanto, es altamente probable que parte de la ACh agregada en forma exógena sea degradada antes de activar al receptor. Por otro lado, como se mencionó previamente estamos utilizando microscopía de campo amplio y no solo registramos el calcio que entra a través de los canales CaV1.3 cuando estimulamos mecánicamente las CC, sino también al Ca<sup>2+</sup> que entra a través del canal mecanotransductor. Dado que la hiperpolarización producida por la ACh sólo bloquea el calcio que entra a través de los VGCC y no aquel que lo hace a través del canal mecanotransductor, los registros presentan un “ruido de base” elevado que podría llevar a subestimar el efecto inhibitorio de la ACh. Asimismo, se ha demostrado que la expresión de transgenes bajo el promotor Brn3c (como es nuestro caso) afecta la mecanotransducción (Monroe et al., 2016). Esto tiene un efecto dual en nuestros experimentos. Por un lado, y para nuestra ventaja, si hay una menor cantidad de Ca<sup>2+</sup> entrando a través del canal mecanotransductor, el



mencionado “ruido de base” involucrado en la medición del calcio que entra a través de los CCVD se verá disminuido. Por otro lado, el hecho de que exista una mecanotransducción defectuosa genera una menor despolarización de las CC cuando éstas son estimuladas mecánicamente, consecuentemente una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV y, por lo tanto, una relación señal/ruido menor que puede llevar a una subestimación del efecto inhibitorio de la aplicación de la ACh.

Al igual que en las células ciliadas internas de la cóclea de ratones en desarrollo, en la base de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra el calcio cumple dos funciones. Por un lado, este ion juega un rol fundamental en la liberación de vesículas glutamatérgicas presentes en la sinapsis en cinta de las células ciliadas hacia la brecha sináptica con las neuronas aferentes (función sensorial). Por otro lado, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores nicotínicos  $\alpha 9^*$ , genera la activación de los canales SK que, finalmente, deriva en la hiperpolarización de las células ciliadas, la disminución de la activación de los CCVD (ver Figura 34 en “resultados”) y una consecuente menor liberación de glutamato. Por lo tanto, cabe preguntarse si el calcio que ingresa a la CC a través del nAChR  $\alpha 9$  podría difundir a la cercanía de las sinapsis en cinta y facilitar (en vez de inhibir por activación del SK y la consecuente hiperpolarización) la liberación de glutamato hacia las neuronas aferentes. Estudios previos de registros de imágenes de calcio en CCIs de la cóclea de mamíferos han demostrado que las señales de calcio aferentes y eferentes están compartimentalizadas gracias a mecanismos celulares de “amortiguación” del calcio y a las cisternas subsinápticas que se encuentran presentes en las inmediaciones de las sinapsis eferentes (Moglie et al., 2018). Un estudio ultraestructural reciente ha demostrado que, en las células ciliadas de la IIP del pez cebra, las cisternas subsinápticas también se encuentran presentes y estas podrían restringir la difusión del calcio (Dow et al., 2018).

Los resultados del presente trabajo indican la presencia de un nAChR  $\alpha 9^*$  permeable al calcio (y la subsecuente activación de canales SK) en la base de las CCs del pez cebra. Cabe preguntarse entonces por qué la aplicación de ACh no resultó en un aumento de los niveles de calcio basal de las células ciliadas. Este fenómeno puede deberse a la acción de los mecanismos de amortiguación

y compartimentalización del calcio mencionados previamente, que evitan la activación cruzada entre los sistemas eferente y aferente. Esta compartimentalización del calcio haría que esta fuente de entrada de calcio a través del nAChR no sea registrada efectivamente por el sensor de calcio genéticamente codificado GCaMP7. Otra evidencia en favor de la efectividad con la cual se encuentran compartimentalizadas las señales aferente y eferente en la base de las CCs es que durante la co-aplicación de apamina y ACh, al estar bloqueado el canal SK2, el  $\text{Ca}^{2+}$  entrante a través del nAChR podría contribuir a una despolarización de la CCs y, consecuentemente, generar una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV ante una estimulación mecánica. Sin embargo, esto no sucede. En su conjunto estos resultados indican la existencia de mecanismos de compartimentalización del ion calcio en la base de las CC de la línea lateral. Cabe destacar que, bajo nuestras condiciones experimentales, todos los sistemas de “amortiguación” de calcio internos de las CCs permanecen intactos.

Los neuromastos del pez cebra contienen dos poblaciones de células ciliadas que son activadas por deflexiones en el sentido anterior o en el sentido posterior (Flock and Wersall, 1962; Ghysen and Dambly-Chaudiere, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que solo una fibra eferente contacta a todas las CCs de un mismo neuromasto (Dow et al., 2018). Además, se demostró que durante un periodo de locomoción ficticia, la actividad presináptica a lo largo de todas las sinapsis eferentes de un neuromasto se activa de manera sincronizada (Pichler and Lagnado, 2020). De manera similar, en nuestros experimentos observamos que los efectos inhibitorios mediados por la ACh ocurren indistintamente sin importar la orientación de preferencia de la CCs. Más aún, la mediana de la magnitud de la inhibición no es significativamente diferente entre ambas poblaciones (ver Figura 35 en “resultados”). Sin embargo, recientemente Pichler y Lagnado (2020) reportaron que la modulación eferente tiene preponderancia sobre las neuronas aferentes que contactan aquellas CCs que se activan durante el movimiento del pez hacia adelante. La discrepancia entre estos resultados y los presentados en este trabajo puede deberse a que los experimentos del presente trabajo fueron realizados mediante la aplicación local de ACh y no mediante estimulación de los terminales eferentes como en Pichler y Lagnado

(2020). Otras posibles explicaciones a esta discrepancia podrían ser la existencia de diferencias en la eficiencia de la liberación presináptica de ACh en los terminales eferentes y/o en el número de terminales eferentes por CC de diferentes polaridades.

Una peculiaridad del sistema sensorial de la línea lateral es que las CCs dentro del mismo neuromasto poseen heterogeneidad funcional. Por ejemplo, los estímulos que son capaces de abrir los canales mecanosensitivos son insuficientes para evocar la fusión de vesículas a nivel basal en la mayoría de las células ciliadas (Zhang et al., 2018). Además, las CCs activas sinápticamente presentan niveles menores de  $K^+$  intracelular ( $K_{in}$ ) que aquellas que permanecen inactivas. En este trabajo, al igual que como fuera reportado por Wong y colegas (2019), encontramos niveles basales de  $Ca^{2+}$  intracelular heterogéneos entre distintas células ciliadas. Esta variabilidad podría deberse tanto a diferencias en los niveles de expresión de GCaMP7 como a la heterogeneidad intrínseca que poseen las células ciliadas. Células con un  $K_{in}$  menor podrían tener el potencial de membrana lo suficientemente despolarizado como para generar la activación de los canales CaV1.3 en respuesta a la apertura espontánea de los canales de mecanotransducción, lo que resultaría en niveles más altos de  $Ca^{2+}$  durante el reposo. De manera opuesta, aquellas CCs con niveles más altos de  $K_{in}$ , presentarían niveles de  $Ca^{2+}$  basal menores. Esta heterogeneidad funcional también se observa en la respuesta de las fibras aferentes de la llp ante la actividad eferente (Lunsford et al., 2019). En sintonía con estos hallazgos, en el presente trabajo demostramos que el efecto mediado por la ACh sobre las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular de las CCs es, también, heterogéneo. Más aún, no encontramos ninguna relación entre la posición relativa de una célula dentro del NM y la magnitud o cinética de sus respuestas ante un estímulo mecánico, como tampoco en los niveles de inhibición que cada una presenta ante la aplicación de ACh. Los resultados presentados en este trabajo agregan complejidad adicional al funcionamiento de las CCs de la llp *in vivo*. La explicación más simple detrás de este fenómeno de heterogeneidad en respuestas a la ACh podría ser la existencia de diferencias en la densidad de nAChRs  $\alpha 9^*$  o canales SK. De manera alternativa, la accesibilidad diferencial de la ACh a las CCs dentro de un neuromasto dependiendo de su ubicación, también podría contribuir a la

mencionada variabilidad. Los fundamentos fisiológicos de la heterogeneidad funcional de las distintas CCs de los NM todavía no son conocidos. Dado que una sola fibra eferente contacta a todas las CCs de un mismo neuromasto (Dow et al., 2018; Odstrcil, 2018), es probable que las diferencias entre las CCs les otorguen la capacidad de responder de manera diferencial ante una activación del sistema eferente.

A todo lo expuesto anteriormente, se le agrega otro nivel de complejidad a la fisiología de la línea lateral. Se ha demostrado que en larvas de pez cebra, las células ciliadas de los neuromastos maduros sufren un recambio continuo, proceso en el cual una subpoblación de CCs ubicada en el centro del neuromasto sufre apoptosis mientras que otra subpoblación de células ubicadas en la periferia se dividen y diferencian de manera continua (Williams and Holder, 2000). Este último conjunto de células está compuesto en su mayoría por células de soporte y del manto. Estos procesos de recambio se ven acelerados cuando un agente externo (como por ejemplo la aplicación del antibiótico neomicina) genera la muerte de algunas o todas las CCs de un neuromasto. (Williams and Holder, 2000). Si bien se sabe que la inervación aferente también se regenera y las fibras vuelven a contactar a las células de la polaridad adecuada (Pujol-Martí et al., 2014), se desconoce si esto mismo sucede con la re-inervación eferente. Por lo tanto, es posible que aun cuando todos los componentes moleculares necesarios para establecer una sinapsis eferente estén presentes, algunas CCs no posean una inervación eferente completamente funcional.

## Interacción entre los sistemas eferentes colinérgico y dopaminérgico.

Además de la inervación eferente colinérgica, los neuromastos de la llp reciben una inervación eferente dopaminérgica que actúa de manera paracrina a través de receptores D1b. Se ha descrito que, si bien tanto las neuronas eferentes que poseen sus núcleos en el NOE (colinérgicas) como aquellas que proyectan desde el DELL (dopaminérgicas) exhiben actividad correlacionada con la actividad motora, las neuronas del DELL también responden a movimientos de

flujo en el ambiente y a estímulos acústicos en ausencia de actividad motora (Odstrcil, 2018). Esto podría implicar que las neuronas dopaminérgicas provenientes del DELL cumplen una función de modulación positiva sobre la sensibilidad de las CCs durante los momentos de desplazamiento pasivo posteriores a la locomoción o luego de estímulos mecánicos muy fuertes independientemente del movimiento del pez.

No se puede descartar la posibilidad de que la dopamina liberada por las neuronas que provienen del DELL contrarreste en cierta medida los efectos inhibitorios de la ACh para prevenir una inhibición total. Esto podría explicar, en parte, la diferencia en los niveles de inhibición que genera la aplicación de ACh demostrados en este trabajo cuando las células son estimuladas mecánicamente (ver Figura 36 en “resultados”). Esta hipótesis cobra fuerza sobre todo cuando se tiene en cuenta el hecho de que los efectos excitatorios que genera el sistema dopaminérgico se dan a través de receptores metabotrópicos y, por lo tanto, en periodos temporales más extensos. Otra posibilidad que podría explorarse en el futuro es si la misma dopamina posee algún tipo de efecto modulador sobre los receptores  $\alpha 9^*$  o los canales SK.

## Funcionalidad del sistema eferente.

Cuando los peces se mueven, sus receptores sensoriales deberían, en teoría, responder a un estímulo si este proviene del entorno exterior e independizarse de aquellos generados por el propio movimiento del animal. Estos últimos pueden crear una sobrecarga sensitiva durante la locomoción y, potencialmente, enmascarar estímulos de importancia elemental para la supervivencia del pez, como aquellos generados por una presa o un depredador. Una posible solución sería que el pez ajuste la sensibilidad de sus propios receptores sensoriales con anticipación al movimiento del cuerpo (Crapse and Sommer, 2008; Sperry, 1950; von Holst and Mittelstaedt, 1950). Para permitir la mayoría de los comportamientos mencionados, la inhibición dada por el sistema eferente no debería ser total y de la misma magnitud en todas las células ciliadas. Este fenómeno puede observarse tanto en nuestro trabajo (ver “Resultados”), como en trabajos recientes en el área (Lunsford et al., 2019; Pichler and Lagnado,

2020). Las diferencias en la actividad del sistema eferente en las distintas CCs del neuromasto podría deberse por ejemplo a diferencias presinápticas en la eficiencia con la cual un potencial de acción gatilla la liberación de ACh, a fenómenos de plasticidad sináptica y/o a diferencias postsinápticas en la densidad de receptores  $\alpha 9^*$  que median la entrada de calcio o de canales SK. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder responder a estas preguntas.

Por otro lado, cuando se monitorea la actividad del nervio motor con el pez paralizado (movimiento “ficticio”), se evidencia que la reducción de las tasas de disparo aferentes persiste durante un “período refractario” aún después de la finalización del nado, lo cual implica que la influencia eferente no está confinada únicamente a periodos de comandos motores activos. Este “período refractario” correlaciona con la duración y frecuencia del nado (Lunsford et al., 2019). La existencia de dicho período puede explicarse dado que, luego de la activación del sistema eferente colinérgico que hiperpolariza a las CCs, las mismas deben volver a su estado eléctrico basal para que la actividad aferente pueda volver a darse con normalidad.

Holst y Mittelstaedt en 1950 propusieron por primera vez la existencia de una señal descendente desde áreas centrales, de igual duración que los comandos motores, que se transmitiría al aparato sensorial para dar cuenta de la información sensorial generada por el propio organismo (descarga corolaria). Al día de hoy los mecanismos neuronales responsables de este proceso siguen en constante estudio tanto en vertebrados como en invertebrados (Chagnaud et al., 2015; Kim et al., 2015). Las evidencias más recientes apuntan a que, en el caso de la línea lateral, el sistema eferente colinérgico sería el encargado de transmitir la descarga corolaria y generar un ajuste anticipatorio de la sensibilidad (Lunsford et al., 2019; Pichler and Lagnado, 2020; Straka et al., 2018). En particular, en el caso del pez cebra, las neuronas colinérgicas del NOE aumentan su actividad tanto durante el nado como durante las respuestas de escape. Se ha demostrado que para su activación se requiere no sólo la estimulación mecánica de las CCs, sino también que exista una respuesta motora asociada al mismo (Odstrcil, 2018; Pichler and Lagnado, 2020). Dado que estos núcleos son colinérgicos, proponemos que la activación de los mismos resulta en una

inhibición de las CCs a través del nAChR  $\alpha 9^*$  lo que, en última instancia, evita la autoestimulación de las CCs por el propio movimiento del pez.

# CONCLUSIONES

- El gen que codifica para la subunidad de nAChRs  $\alpha 9$ , pero no el que codifica para la subunidad  $\alpha 10$ , está enriquecido en las células ciliadas de los neuromastos de pez cebra. Además, los genes que codifican para los canales SK1a y SK2 también se encuentran enriquecidos en estas células.
- Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  de pez cebra muestran una identidad de secuencia promedio de 69.8% y 62.6%, respectivamente, con respecto a las de otras especies estudiadas. El clonado y expresión del ARNc de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en el sistema heterólogo de *Xenopus laevis* muestra que, estas subunidades se ensamblan formando receptores homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$ , pero no homoméricos  $\alpha 10$ . Estos nAChRs presentan propiedades biofísicas y farmacológicas similares (pero no idénticas) a los de otras especies estudiadas hasta el momento, a excepción de la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.
- Proponemos que el nAChR que media la transmisión sináptica entre el sistema eferente colinérgico de la línea lateral del pez cebra y las CCs de los neuromastos es del tipo  $\alpha 9^*$ .
- Al igual que en otros sistemas eferentes colinérgicos, en la línea lateral posterior del pez cebra, el efecto inhibitorio dado por la activación del nAChR proviene de un acople funcional entre este receptor y un canal de baja conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo SK.



# BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89, 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Alexandre, D., Ghysen, A., 1999. Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7558–7562. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7558>
- Art, J.J., Kroese, A.B.A., 1982. Effects of efferent activity during respiration on *Xenopus-laevis* lateral line afferent responses, in: *JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON*. CAMBRIDGE UNIV PRESS 40 WEST 20TH STREET, NEW YORK, NY 10011-4211, pp. P21–P22.
- Ashmore, J., 2008. Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88, 173–210. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2006>
- Assad, J.A., Corey, D.P., 1992. An active motor model for adaptation by vertebrate hair cells. *J Neurosci* 12, 3291–3309.
- Autuori, E., Sedlak, P., Xu, L., C Ridder, M., Tedoldi, A., Sah, P., 2019. rSK1 in Rat Neurons: A Controller of Membrane rSK2? *Front Neural Circuits* 13, 21. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00021>
- Bailey, G.P., Sewell, W.F., 2000. Calcitonin Gene-Related Peptide Suppresses Hair Cell Responses to Mechanical Stimulation in the *Xenopus* Lateral Line Organ. *J. Neurosci.* 20, 5163–5169. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-13-05163.2000>
- Benton, D.C.H., Monaghan, A.S., Hosseini, R., Bahia, P.K., Haylett, D.G., Moss, G.W.J., 2003. Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels formed by the expression of rat SK1 and SK2 genes in HEK 293 cells. *J. Physiol. (Lond.)* 553, 13–19. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.054551>
- Beurg, M., Evans, M.G., Hackney, C.M., Fettiplace, R., 2006. A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 26, 10992–11000. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2188-06.2006>
- Beurg, M., Fettiplace, R., Nam, J.-H., Ricci, A.J., 2009. Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nat Neurosci* 12, 553–558. <https://doi.org/10.1038/nn.2295>
- Beurg, M., Michalski, N., Safieddine, S., Bouleau, Y., Schneggenburger, R., Chapman, E.R., Petit, C., Dulon, D., 2010. Control of exocytosis by synaptotagmins and otoferlin in auditory hair cells. *J Neurosci* 30, 13281–13290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2528-10.2010>

- Beurg, M., Safieddine, S., Roux, I., Bouleau, Y., Petit, C., Dulon, D., 2008. Calcium- and otoferlin-dependent exocytosis by immature outer hair cells. *J Neurosci* 28, 1798–1803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4653-07.2008>
- Blanchet, C., Eróstegui, C., Sugawara, M., Dulon, D., 1996. Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J. Neurosci.* 16, 2574–2584.
- Bleckmann, H., Zelick, R., 2009. Lateral line system of fish. *Integrative Zoology* 4, 13–25. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2008.00131.x>
- Boffi, J.C., Marcovich, I., Gill-Thind, J.K., Corradi, J., Collins, T., Lipovsek, M.M., Moglie, M., Plazas, P.V., Craig, P.O., Millar, N.S., Bouzat, C., Elgoyhen, A.B., 2017. Differential Contribution of Subunit Interfaces to  $\alpha 9\alpha 10$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Function. *Mol Pharmacol* 91, 250–262. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107482>
- Boton, R., Dascal, N., Gillo, B., Lass, Y., 1989. Two calcium-activated chloride conductances in *Xenopus laevis* oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *J Physiol* 408, 511–534.
- Brantley, R.K., Bass, A.H., 1988. Cholinergic neurons in the brain of a teleost fish (*Porichthys notatus*) located with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 275, 87–105. <https://doi.org/10.1002/cne.902750108>
- Bricaud, O., Char, V., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A., 2001. Early efferent innervation of the zebrafish lateral line: Lateral Line Efference in Zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 434, 253–261. <https://doi.org/10.1002/cne.1175>
- Burighel, P., Caicci, F., Manni, L., 2011. Hair cells in non-vertebrate models: lower chordates and molluscs. *Hear Res* 273, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.03.087>
- Cabo, R., Zichichi, R., Viña, E., Guerrero, M.C., Vázquez, G., García-Suárez, O., Vega, J.A., Germanà, A., 2013. Calcium-activated potassium channel SK1 is widely expressed in the peripheral nervous system and sensory organs of adult zebrafish. *Neuroscience Letters* 555, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.026>
- Carpaneto Freixas, A.E., Moglie, M.J., Castagnola, T., Salatino, L., Domene, S., Marcovich, I., Gallino, S., Wedemeyer, C., Goutman, J.D., Plazas, P.V., Elgoyhen, A.B., 2021. Unraveling the Molecular Players at the Cholinergic Efferent Synapse of the Zebrafish Lateral Line. *J Neurosci* 41, 47–60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1772-20.2020>
- Castellano-Muñoz, M., Israel, S.H., Hudspeth, A.J., 2010. Efferent control of the electrical and mechanical properties of hair cells in the bullfrog's sacculus. *PLoS One* 5, e13777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013777>
- Chagnaud, B.P., Banchi, R., Simmers, J., Straka, H., 2015. Spinal corollary discharge modulates motion sensing during vertebrate locomotion. *Nat Commun* 6, 7982. <https://doi.org/10.1038/ncomms8982>

- Chen, C., LeBlanc, C., Bobbin, R.P., 1996. Differences in cholinergic responses from outer hair cells of rat and guinea pig. *Hearing Research* 98, 9–17. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(96\)00049-4](https://doi.org/10.1016/0378-5955(96)00049-4)
- Colquhoun, D., 1998. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125, 924–947. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702164>
- Corey, D.P., Holt, J.R., 2016. Are TMCs the Mechanotransduction Channels of Vertebrate Hair Cells? *J Neurosci* 36, 10921–10926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1148-16.2016>
- Corey, D.P., Hudspeth, A.J., 1983. Analysis of the microphonic potential of the bullfrog's sacculus. *J Neurosci* 3, 942–961.
- Corey, D.P., Hudspeth, A.J., 1979. Response latency of vertebrate hair cells. *Biophys. J.* 26, 499–506. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(79\)85267-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(79)85267-4)
- Corringer, P.J., Le Novère, N., Changeux, J.P., 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 431–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.431>
- Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.M., Hernandez, M.C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., Ballivet, M., 1990. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5, 847–856. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90344-f](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90344-f)
- Crapse, T.B., Sommer, M.A., 2008. Corollary discharge across the animal kingdom. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 587–600. <https://doi.org/10.1038/nrn2457>
- Crawford, A.C., Evans, M.G., Fettiplace, R., 1989. Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells. *J Physiol* 419, 405–434. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017878>
- Dallos, P., 2008. Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr Opin Neurobiol* 18, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.016>
- Dallos, P., He, D.Z., Lin, X., Sziklai, I., Mehta, S., Evans, B.N., 1997. Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J Neurosci* 17, 2212–2226.
- Danielson, P.D., Zottoli, S.J., Corrodi, J.G., Rhodes, K.J., Mufson, E.J., 1988. Localization of choline acetyltransferase to somata of posterior lateral line efferents in the goldfish. *Brain Res* 448, 158–161. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91112-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91112-2)
- Danio rerio - Ensembl genome browser 91 [WWW Document], n.d. URL [https://dec2017.archive.ensembl.org/Danio\\_rerio/Info/Annotation](https://dec2017.archive.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Annotation) (accessed 6.10.21).
- Dawkins, R., Keller, S.L., Sewell, W.F., 2005. Pharmacology of Acetylcholine-Mediated Cell Signaling in the Lateral Line Organ Following Efferent Stimulation. *Journal of Neurophysiology* 93, 2541–2551. <https://doi.org/10.1152/jn.01283.2004>

- Dick, O., Hack, I., Altrock, W.D., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D., Brandstätter, J.H., 2001. Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J Comp Neurol* 439, 224–234. <https://doi.org/10.1002/cne.1344>
- Doi, T., Ohmori, H., 1993. Acetylcholine increases intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and hyperpolarizes the guinea-pig outer hair cell. *Hear. Res.* 67, 179–188. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90245-v](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90245-v)
- Dow, E., Jacobo, A., Hossain, S., Siletti, K., Hudspeth, A.J., 2018. Connectomics of the zebrafish's lateral-line neuromast reveals wiring and miswiring in a simple microcircuit. *eLife* 7, e33988. <https://doi.org/10.7554/eLife.33988>
- Dow, E., Siletti, K., Hudspeth, A.J., 2015. Cellular projections from sensory hair cells form polarity-specific scaffolds during synaptogenesis. *Genes Dev* 29, 1087–1094. <https://doi.org/10.1101/gad.259838.115>
- Dulon, D., Luo, L., Zhang, C., Ryan, A.F., 1998. Expression of small-conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. *Eur. J. Neurosci.* 10, 907–915. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00098.x>
- Dulon, D., Safieddine, S., Jones, S.M., Petit, C., 2009. Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. *J Neurosci* 29, 10474–10487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1009-09.2009>
- Eatock, R.A., Corey, D.P., Hudspeth, A.J., 1987. Adaptation of mechano-electrical transduction in hair cells of the bullfrog's sacculus. *J Neurosci* 7, 2821–2836.
- Ebihara, L., 1996. Xenopus connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of Xenopus oocytes. *Biophys. J.* 71, 742–748. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79273-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79273-1)
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., Heinemann, S., 1994.  $\alpha 9$ : An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705–715. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90555-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90555-X)
- Elgoyhen, A.B., Katz, E., 2012. The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J. Physiol. Paris* 106, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.06.001>
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., Boulter, J., 2001.  $\alpha 10$ : A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *PNAS* 98, 3501–3506. <https://doi.org/10.1073/pnas.051622798>
- Ellis, L.D., Maler, L., Dunn, R.J., 2008. Differential distribution of SK channel subtypes in the brain of the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Comp. Neurol.* 507, 1964–1978. <https://doi.org/10.1002/cne.21597>

- Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M.E., Watkins, M., Elgoyhen, A.B., McIntosh, J.M., Olivera, B.M., 2006. Alpha-RglA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry* 45, 1511–1517. <https://doi.org/10.1021/bi0520129>
- Erickson, T., Nicolson, T., 2015. Identification of sensory hair-cell transcripts by thiouracil-tagging in zebrafish. *BMC Genomics* 16, 842. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2072-5>
- Erostegui, C., Norris, C.H., Bobbin, R.P., 1994. In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hearing Research* 74, 135–147. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90182-1)
- Eybalin, M., 1993. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73, 309–373. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.2.309>
- Fakler, B., Adelman, J.P., 2008. Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59, 873–881. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.001>
- Farrell, E.F., Antaramian, A., Rueda, A., Gómez, A.M., Valdivia, H.H., 2003. Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *J Biol Chem* 278, 34660–34666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305931200>
- Faucherre, A., Pujol-Martí, J., Kawakami, K., López-Schier, H., 2009. Afferent Neurons of the Zebrafish Lateral Line Are Strict Selectors of Hair-Cell Orientation. *PLoS ONE* 4, e4477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004477>
- Fettiplace, R., 2017. Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Compr Physiol* 7, 1197–1227. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>
- Fettiplace, R., 2009. Defining features of the hair cell mechano-electrical transducer channel. *Pflugers Arch*. 458, 1115–1123. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0683-x>
- Fettiplace, R., Kim, K.X., 2014. The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiol Rev* 94, 951–986. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2013>
- Flock, A., 1965. Transducing mechanisms in the lateral line canal organ receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 30, 133–145. <https://doi.org/10.1101/sqb.1965.030.01.016>
- Flock, A., Russell, I., 1976. Inhibition by efferent nerve fibres: action on hair cells and afferent synaptic transmission in the lateral line canal organ of the burbot *Lota lota*. *The Journal of Physiology* 257, 45–62. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011355>
- Flock, Å., Russell, I.J., 1973. The post-synaptic action of efferent fibres in the lateral line organ of the burbot *Lota lota*. *The Journal of Physiology* 235, 591–605. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010406>
- Flock, A., Wersall, J., 1962. A study of the orientation of the sensory hairs of the receptor cells in the lateral line organ of fish, with special reference to the function of the receptors. *J. Cell Biol*. 15, 19–27. <https://doi.org/10.1083/jcb.15.1.19>

- Forster, I., Bertrand, D., 1995. Inward rectification of neuronal nicotinic acetylcholine receptors investigated by using the homomeric alpha 7 receptor. *Proc Biol Sci* 260, 139–148. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0071>
- Franchini, L.F., Elgoyhen, A.B., 2006. Adaptive evolution in mammalian proteins involved in cochlear outer hair cell electromotility. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41, 622–635. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.042>
- Frolenkov, G.I., 2006. Regulation of electromotility in the cochlear outer hair cell. *J Physiol* 576, 43–48. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.114975>
- Fuchs, P.A., 2014. A “calcium capacitor” shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 3393–3401. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.267914>
- Fuchs, P.A., Murrow, B.W., 1992. Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 12, 800–809.
- Fucile, S., 2004. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.08.006>
- Furness, D.N., Hackney, C.M., 2006. The Structure and Composition of the Stereociliary Bundle of Vertebrate Hair Cells, in: Eatock, R.A., Fay, R.R., Popper, A.N. (Eds.), *Vertebrate Hair Cells*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer, New York, NY, pp. 95–153. [https://doi.org/10.1007/0-387-31706-6\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-31706-6_3)
- Gahring, L.C., Rogers, S.W., 2006. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 7, E885-894. <https://doi.org/10.1208/aapsj070486>
- Gale, J.E., Marcotti, W., Kennedy, H.J., Kros, C.J., Richardson, G.P., 2001. FM1-43 Dye Behaves as a Permeant Blocker of the Hair-Cell Mechanotransducer Channel. *J. Neurosci.* 21, 7013–7025. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07013.2001>
- Galzi, J.L., Bertrand, S., Corringer, P.J., Changeux, J.P., Bertrand, D., 1996. Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J.* 15, 5824–5832.
- Gerzanich, V., Anand, R., Lindstrom, J., 1994. Homomers of alpha 8 and alpha 7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol. Pharmacol.* 45, 212–220.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., 2007. The lateral line microcosmos. *Genes & Development* 21, 2118–2130. <https://doi.org/10.1101/gad.1568407>
- Giniatullin, R., Nistri, A., Yakel, J.L., 2005. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci* 28, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.009>
- Glowatzki, E., Fuchs, P.A., 2002. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5, 147–154. <https://doi.org/10.1038/nn796>

- Glowatzki, E., Fuchs, P.A., 2000. Cholinergic Synaptic Inhibition of Inner Hair Cells in the Neonatal Mammalian Cochlea. *Science* 288, 2366–2368. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2366>
- Gómez-Casati, M.E., Fuchs, P.A., Elgoyhen, A.B., Katz, E., 2005. Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells: Functional properties of the nAChR at the efferent-IHC synapse. *The Journal of Physiology* 566, 103–118. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087155>
- Goodyear, R.J., Marcotti, W., Kros, C.J., Richardson, G.P., 2005. Development and properties of stereociliary link types in hair cells of the mouse cochlea. *J Comp Neurol* 485, 75–85. <https://doi.org/10.1002/cne.20513>
- Goodyear, R.J., Richardson, G.P., 2003. A novel antigen sensitive to calcium chelation that is associated with the tip links and kinocilial links of sensory hair bundles. *J Neurosci* 23, 4878–4887.
- Goutman, J.D., Glowatzki, E., 2007. Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16341–16346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705756104>
- Grant, L., Yi, E., Glowatzki, E., 2010. Two modes of release shape the postsynaptic response at the inner hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 30, 4210–4220. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4439-09.2010>
- Guinan, J.J., Stankovic, K.M., 1996. Medial efferent inhibition produces the largest equivalent attenuations at moderate to high sound levels in cat auditory-nerve fibers. *The Journal of the Acoustical Society of America* 100, 1680–1690. <https://doi.org/10.1121/1.416066>
- Haehnel, M., Taguchi, M., Liao, J.C., 2012. Heterogeneity and dynamics of lateral line afferent innervation during development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 520, 1376–1386. <https://doi.org/10.1002/cne.22798>
- Haehnel-Taguchi, M., Akanyeti, O., Liao, J.C., 2014. Afferent and motoneuron activity in response to single neuromast stimulation in the posterior lateral line of larval zebrafish. *Journal of Neurophysiology* 112, 1329–1339. <https://doi.org/10.1152/jn.00274.2014>
- Hama, K., 1965. SOME OBSERVATIONS ON THE FINE STRUCTURE OF THE LATERAL LINE ORGAN OF THE JAPANESE SEA EEL *LYNCOZYMBA NYSTROMI*. *J Cell Biol* 24, 193–210. <https://doi.org/10.1083/jcb.24.2.193>
- Hiel, H., Luebke, A.E., Fuchs, P.A., 2000. Cloning and expression of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in cochlear hair cells of the chick. *Brain Res.* 858, 215–225. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01947-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01947-8)
- Holt, J.C., Jordan, P.M., Lysakowski, A., Shah, A., Barsz, K., Contini, D., 2017. Muscarinic Acetylcholine Receptors and M-Currents Underlie Efferent-Mediated Slow Excitation in Calyx-

- Bearing Vestibular Afferents. *J Neurosci* 37, 1873–1887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2322-16.2017>
- Holt, J.C., Kewin, K., Jordan, P.M., Cameron, P., Klapczynski, M., McIntosh, J.M., Crooks, P.A., Dwoskin, L.P., Lysakowski, A., 2015. Pharmacologically distinct nicotinic acetylcholine receptors drive efferent-mediated excitation in calyx-bearing vestibular afferents. *J Neurosci* 35, 3625–3643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3388-14.2015>
- Holt, J.C., Lioudyno, M., Guth, P.S., 2003. A pharmacologically distinct nicotinic ACh receptor is found in a subset of frog semicircular canal hair cells. *J. Neurophysiol.* 90, 1526–1536. <https://doi.org/10.1152/jn.00273.2002>
- Holt, J.C., Lysakowski, A., Goldberg, J.M., 2006. Mechanisms of efferent-mediated responses in the turtle posterior crista. *J Neurosci* 26, 13180–13193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3539-06.2006>
- Holt, J.R., Eatock, R.A., 1995. Inwardly rectifying currents of saccular hair cells from the leopard frog. *J Neurophysiol* 73, 1484–1502. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.4.1484>
- Holt, J.R., Gillespie, S.K.H., Provance, D.W., Shah, K., Shokat, K.M., Corey, D.P., Mercer, J.A., Gillespie, P.G., 2002. A chemical-genetic strategy implicates myosin-1c in adaptation by hair cells. *Cell* 108, 371–381. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00629-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00629-3)
- Housley, G.D., Ashmore, J.F., 1991. Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc Biol Sci* 244, 161–167. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0065>
- Howard, J., Hudspeth, A.J., 1987. Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechano-electrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3064–3068. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.3064>
- Howard, J., Hudspeth, A.J., Vale, R.D., 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342, 154–158. <https://doi.org/10.1038/342154a0>
- Hudspeth, A.J., 1982. Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells. *J Neurosci* 2, 1–10.
- Hunter, J.D., 2007. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science Engineering* 9, 90–95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- Jay, M., De Faveri, F., McDearmid, J.R., 2015. Firing dynamics and modulatory actions of supraspinal dopaminergic neurons during zebrafish locomotor behavior. *Curr Biol* 25, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.033>
- Johnson, S.L., Marcotti, W., 2008. Biophysical properties of CaV1.3 calcium channels in gerbil inner hair cells. *J Physiol* 586, 1029–1042. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145219>



- Johnson, S.L., Marcotti, W., Kros, C.J., 2005. Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* 563, 177–191. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074740>
- Jones, A.K., Elgar, G., Sattelle, D.B., 2003. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Genomics* 82, 441–451. [https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(03\)00153-8](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(03)00153-8)
- Jordan, P.M., Parks, X.X., Contini, D., Holt, J.C., 2013. A review of synaptic mechanisms of vestibular efferent signaling in turtles: extrapolation to efferent actions in mammals. *J Vestib Res* 23, 161–175. <https://doi.org/10.3233/VES-130492>
- Karavitaki, K.D., Corey, D.P., 2010. Sliding adhesion confers coherent motion to hair cell stereocilia and parallel gating to transduction channels. *J Neurosci* 30, 9051–9063. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4864-09.2010>
- Karlin, A., 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrn731>
- Katz, E., 2004. Developmental Regulation of Nicotinic Synapses on Cochlear Inner Hair Cells. *Journal of Neuroscience* 24, 7814–7820. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2102-04.2004>
- Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C.V., Vetter, D.E., Heinemann, S.F., Elgoyhen, A.B., 2000. High calcium permeability and calcium block of the K9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Research* 12.
- Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E.M., Milligan, R.A., Müller, U., Kachar, B., 2007. Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* 449, 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature06091>
- Keen, E.C., Hudspeth, A.J., 2006. Transfer characteristics of the hair cell's afferent synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5537–5542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601103103>
- Kennedy, H.J., Evans, M.G., Crawford, A.C., Fettiplace, R., 2003. Fast adaptation of mechano-electrical transducer channels in mammalian cochlear hair cells. *Nat Neurosci* 6, 832–836. <https://doi.org/10.1038/nn1089>
- Kerby, D.S., 2014. The Simple Difference Formula: An Approach to Teaching Nonparametric Correlation. *Comprehensive Psychology* 3, 11.IT.3.1. <https://doi.org/10.2466/11.IT.3.1>
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D., Moser, T., 2005. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434, 889–894. <https://doi.org/10.1038/nature03418>
- Kim, A.J., Fitzgerald, J.K., Maimon, G., 2015. Cellular evidence for efference copy in *Drosophila* visuomotor processing. *Nat Neurosci* 18, 1247–1255. <https://doi.org/10.1038/nn.4083>

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kindt, K.S., Finch, G., Nicolson, T., 2012. Kinocilia Mediate Mechanosensitivity in Developing Zebrafish Hair Cells. *Developmental Cell* 23, 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.05.022>
- Kitajiri, S., Sakamoto, T., Belyantseva, I.A., Goodyear, R.J., Stepanyan, R., Fujiwara, I., Bird, J.E., Riazuddin, Saima, Riazuddin, Sheikh, Ahmed, Z.M., Hinshaw, J.E., Sellers, J., Bartles, J.R., Hammer, J.A., Richardson, G.P., Griffith, A.J., Frolenkov, G.I., Friedman, T.B., 2010. Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. *Cell* 141, 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.049>
- Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., Adelman, J.P., 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709–1714. <https://doi.org/10.1126/science.273.5282.1709>
- Kong, J.-H., Adelman, J.P., Fuchs, P.A., 2008. Expression of the SK2 calcium-activated potassium channel is required for cholinergic function in mouse cochlear hair cells. *J Physiol* 586, 5471–5485. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160077>
- Köppl, C., 2011. Birds--same thing, but different? Convergent evolution in the avian and mammalian auditory systems provides informative comparative models. *Hear Res* 273, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.03.095>
- Korn, H., Faber, D.S., 2005. The Mauthner cell half a century later: a neurobiological model for decision-making? *Neuron* 47, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.019>
- Kozlov, A.S., Risler, T., Hudspeth, A.J., 2007. Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nat Neurosci* 10, 87–92. <https://doi.org/10.1038/nn1818>
- Kros, C.J., Marcotti, W., van Netten, S.M., Self, T.J., Libby, R.T., Brown, S.D.M., Richardson, G.P., Steel, K.P., 2002. Reduced climbing and increased slipping adaptation in cochlear hair cells of mice with *Myo7a* mutations. *Nat Neurosci* 5, 41–47. <https://doi.org/10.1038/nn784>
- Kumar, S., Stecher, Tamura, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Le Novère, N., Corringer, P.-J., Changeux, J.-P., 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53, 447–456. <https://doi.org/10.1002/neu.10153>
- Lee, C.-H., Huang, C.-S., Chen, C.-S., Tu, S.-H., Wang, Y.-J., Chang, Y.-J., Tam, K.-W., Wei, P.-L., Cheng, T.-C., Chu, J.-S., Chen, L.-C., Wu, C.-H., Ho, Y.-S., 2010. Overexpression and

- activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 102, 1322–1335. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq300>
- Léna, C., Changeux, J.P., 1993. Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci* 16, 181–186. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90150-k](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90150-k)
- Lester, R.A.J., 2004. Activation and desensitization of heteromeric neuronal nicotinic receptors: implications for non-synaptic transmission. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 1897–1900. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.02.081>
- Levi, R., Akanyeti, O., Ballo, A., Liao, J.C., 2014. Frequency response properties of primary afferent neurons in the posterior lateral line system of larval zebrafish. *Journal of Neurophysiology* 113, 657–668. <https://doi.org/10.1152/jn.00414.2014>
- Li, G.-L., Cho, S., von Gersdorff, H., 2014. Phase-locking precision is enhanced by multiquantal release at an auditory hair cell ribbon synapse. *Neuron* 83, 1404–1417. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.027>
- Li, G.-L., Keen, E., Andor-Ardó, D., Hudspeth, A.J., von Gersdorff, H., 2009. The unitary event underlying multiquantal EPSCs at a hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci* 29, 7558–7568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0514-09.2009>
- Liao, J.C., 2014. Functional Architecture of Lateral Line Afferent Neurons in Larval Zebrafish, in: Bleckmann, H., Mogdans, J., Coombs, S.L. (Eds.), *Flow Sensing in Air and Water*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 319–332. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-41446-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-41446-6_13)
- Liao, J.C., 2010. Organization and physiology of posterior lateral line afferent neurons in larval zebrafish. *Biol. Lett.* 6, 402–405. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0995>
- Lin, C.-H.J., Bozovic, D., 2020. Effects of Efferent Activity on Hair Bundle Mechanics. *J Neurosci* 40, 2390–2402. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1312-19.2020>
- Lindstrom, J., 2006. Potentiation of acetylcholine receptors by divalent cations. *Mol Pharmacol* 70, 5–7. <https://doi.org/10.1124/mol.106.025767>
- Lingle, C.J., Solaro, C.R., Prakriya, M., Ding, J.P., 1996. Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* 4, 261–301. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1_7)
- Lioudyno, M., Hiel, H., Kong, J.-H., Katz, E., Waldman, E., Parameshwaran-Iyer, S., Glowatzki, E., Fuchs, P.A., 2004. A “synaptoplasmic cistern” mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J. Neurosci.* 24, 11160–11164. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3674-04.2004>
- Lipovsek, M., Fierro, A., Pérez, E.G., Boffi, J.C., Millar, N.S., Fuchs, P.A., Katz, E., Elgoyhen, A.B., 2014. Tracking the molecular evolution of calcium permeability in a nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Biol. Evol.* 31, 3250–3265. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu258>
- Lipovsek, M., Im, G.J., Franchini, L.F., Pisciotto, F., Katz, E., Fuchs, P.A., Elgoyhen, A.B., 2012. Phylogenetic differences in calcium permeability of the auditory hair cell cholinergic

nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4308–4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115488109>

Lokuta, A.J., Meyers, M.B., Sander, P.R., Fishman, G.I., Valdivia, H.H., 1997. Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *J Biol Chem* 272, 25333–25338. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.25333>

López-Schier, H., Hudspeth, A.J., 2006. A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *PNAS* 103, 18615–18620. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608536103>

López-Schier, H., Starr, C.J., Kappler, J.A., Kollmar, R., Hudspeth, A.J., 2004. Directional Cell Migration Establishes the Axes of Planar Polarity in the Posterior Lateral-Line Organ of the Zebrafish. *Developmental Cell* 7, 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.018>

Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le Novère, N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., Dani, J.A., Grady, S.R., Kellar, K.J., Lindstrom, J.M., Marks, M.J., Quik, M., Taylor, P.W., Wonnacott, S., 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 51, 397–401.

Lumpkin, E.A., Hudspeth, A.J., 1995. Detection of Ca<sup>2+</sup> entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechano-electrical transduction in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10297–10301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10297>

Lunsford, E.T., Skandalis, D.A., Liao, J.C., 2019. Efferent modulation of spontaneous lateral line activity during and after zebrafish motor commands. *Journal of Neurophysiology* 122, 2438–2448. <https://doi.org/10.1152/jn.00594.2019>

Lush, M.E., Diaz, D.C., Koenecke, N., Baek, S., Boldt, H., St Peter, M.K., Gaitan-Escudero, T., Romero-Carvajal, A., Busch-Nentwich, E.M., Perera, A.G., Hall, K.E., Peak, A., Haug, J.S., Piotrowski, T., 2019. scRNA-Seq reveals distinct stem cell populations that drive hair cell regeneration after loss of Fgf and Notch signaling. *eLife* 8, e44431. <https://doi.org/10.7554/eLife.44431>

Lustig, L.R., Peng, H., Hiel, H., Yamamoto, T., Fuchs, P.A., 2001. Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics* 73, 272–283. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6503>

Lv, C., Stewart, W.J., Akanyeti, O., Frederick, C., Zhu, J., Santos-Sacchi, J., Sheets, L., Liao, J.C., Zenisek, D., 2016. Synaptic Ribbons Require Ribeye for Electron Density, Proper Synaptic Localization, and Recruitment of Calcium Channels. *Cell Reports* 15, 2784–2795. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.045>

Marcovich, I., Moglie, M.J., Carpaneto Freixas, A.E., Trigila, A.P., Franchini, L.F., Plazas, P.V., Lipovsek, M., Elgoyhen, A.B., 2020. Distinct Evolutionary Trajectories of Neuronal and Hair Cell

- Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1070–1089. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz290>
- Matern, M.S., Beirl, A., Ogawa, Y., Song, Y., Paladugu, N., Kindt, K.S., Hertzano, R., 2018. Transcriptomic Profiling of Zebrafish Hair Cells Using RiboTag. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 47. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00047>
- Mathews, M.A., Camp, A.J., Murray, A.J., 2017. Reviewing the Role of the Efferent Vestibular System in Motor and Vestibular Circuits. *Front Physiol* 8, 552. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00552>
- Matthews, G., Fuchs, P., 2010. The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11, 812–822. <https://doi.org/10.1038/nrn2924>
- Matthews, T.M., Duncan, R.K., Zidanic, M., Michael, T.H., Fuchs, P.A., 2005. Cloning and characterization of SK2 channel from chicken short hair cells. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 191, 491–503. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0601-4>
- McHenry, M. j., Feitl, K. e., Strother, J. a., Van Trump, W. j., 2009. Larval zebrafish rapidly sense the water flow of a predator's strike. *Biology Letters* 5, 477–479. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0048>
- McHenry, M.J., van Netten, S.M., 2007. The flexural stiffness of superficial neuromasts in the zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Journal of Experimental Biology* 210, 4244–4253. <https://doi.org/10.1242/jeb.009290>
- McIntosh, J.M., Plazas, P.V., Watkins, M., Gomez-Casati, M.E., Olivera, B.M., Elgoyhen, A.B., 2005. A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat alpha9alpha10 and alpha7 nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 280, 30107–30112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504102200>
- McKinney, W., 2010. Data Structures for Statistical Computing in Python. Presented at the Proceedings of the 9th Python in Science Conference, pp. 51–56.
- Meredith, G.E., Roberts, B.L., 1987. Distribution and morphological characteristics of efferent neurons innervating end organs in the ear and lateral line of the European eel. *J Comp Neurol* 265, 494–506. <https://doi.org/10.1002/cne.902650404>
- Metcalf, W.K., 1989. Organization and Development of the Zebrafish Posterior Lateral Line, in: Coombs, S., Görner, P., Münz, H. (Eds.), *The Mechanosensory Lateral Line*. Springer New York, New York, NY, pp. 147–159. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3560-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3560-6_7)
- Metcalf, W.K., Kimmel, C.B., Schabtach, E., 1985. Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 233, 377–389. <https://doi.org/10.1002/cne.902330307>
- Miledi, R., Parker, I., 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 357, 173–183. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015495>

- Millar, N.S., Gotti, C., 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.041>
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., Sakmann, B., 1986. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406–411. <https://doi.org/10.1038/321406a0>
- Moglie, M.J., Fuchs, P.A., Elgoyhen, A.B., Goutman, J.D., 2018. Compartmentalization of antagonistic Ca<sup>2+</sup> signals in developing cochlear hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E2095–E2104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719077115>
- Monesson-Olson, B.D., Browning-Kamins, J., Aziz-Bose, R., Kreines, F., Trapani, J.G., 2014. Optical Stimulation of Zebrafish Hair Cells Expressing Channelrhodopsin-2. *PLoS ONE* 9, e96641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096641>
- Monroe, J.D., Manning, D.P., Uribe, P.M., Bhandiwad, A., Sisneros, J.A., Smith, M.E., Coffin, A.B., 2016. Hearing sensitivity differs between zebrafish lines used in auditory research. *Hearing Research* 341, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.09.004>
- Montgomery, J.C., Bodznick, D., 1994. An adaptive filter that cancels self-induced noise in the electrosensory and lateral line mechanosensory systems of fish. *Neurosci Lett* 174, 145–148. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90007-8)
- Moser, T., Beutner, D., 2000. Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 883–888. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.883>
- Mulle, C., Léna, C., Changeux, J.-P., 1992. Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8, 937–945. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90208-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90208-U)
- Nagiel, A., Andor-Ardo, D., Hudspeth, A.J., 2008. Specificity of Afferent Synapses onto Plane-Polarized Hair Cells in the Posterior Lateral Line of the Zebrafish. *Journal of Neuroscience* 28, 8442–8453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2425-08.2008>
- Nayak, G.D., Ratnayaka, H.S.K., Goodyear, R.J., Richardson, G.P., 2007. Development of the hair bundle and mechanotransduction. *Int J Dev Biol* 51, 597–608. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072392gn>
- Nenov, A.P., Norris, C., Bobbin, R.P., 1996. Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel. *Hear. Res.* 101, 149–172. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(96\)00143-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(96)00143-8)
- Nicolson, T., 2015. Ribbon synapses in zebrafish hair cells. *Hearing Research* 330, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.04.003>
- Nouvian, R., Beutner, D., Parsons, T.D., Moser, T., 2006. Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol* 209, 153–165. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0854-4>

- Nouvian, R., Neef, J., Bulankina, A.V., Reisinger, E., Pangršič, T., Frank, T., Sikorra, S., Brose, N., Binz, T., Moser, T., 2011. Exocytosis at the hair cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins. *Nat Neurosci* 14, 411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2774>
- Odstrcil, I., 2018. Sensing flow when it matters: a behavioral and circuit analysis of mechanosensation in the larval zebrafish.
- Oh, S.-J., Park, J.H., Han, S., Lee, J.K., Roh, E.J., Lee, C.J., 2008. Development of selective blockers for Ca<sup>2+</sup>-activated Cl channel using *Xenopus laevis* oocytes with an improved drug screening strategy. *Mol Brain* 1, 14. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-14>
- Ohmori, H., 1985. Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J Physiol* 359, 189–217. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015581>
- Oliver, D., Klöcker, N., Schuck, J., Baukowitz, T., Ruppertsberg, J.P., Fakler, B., 2000. Gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26, 595–601. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81197-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81197-6)
- Olt, J., Allen, C.E., Marcotti, W., 2016. *In vivo* physiological recording from the lateral line of juvenile zebrafish: *In vivo* juvenile zebrafish recordings. *J Physiol* 594, 5427–5438. <https://doi.org/10.1113/JP271794>
- Olt, J., Johnson, S.L., Marcotti, W., 2014. *In vivo* and *in vitro* biophysical properties of hair cells from the lateral line and inner ear of developing and adult zebrafish: Electrical properties of hair cells in zebrafish. *The Journal of Physiology* 592, 2041–2058. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.265108>
- Oteiza, P., Odstrcil, I., Lauder, G., Portugues, R., Engert, F., 2017. A novel mechanism for mechanosensory-based rheotaxis in larval zebrafish. *Nature* 547, 445–448. <https://doi.org/10.1038/nature23014>
- Pan, B., Akyuz, N., Liu, X.-P., Asai, Y., Nist-Lund, C., Kurima, K., Derfler, B.H., György, B., Limapichat, W., Walujkar, S., Wimalasena, L.N., Sotomayor, M., Corey, D.P., Holt, J.R., 2018. TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron* 99, 736-753.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.033>
- Pangrsic, T., Lasarow, L., Reuter, K., Takago, H., Schwander, M., Riedel, D., Frank, T., Tarantino, L.M., Bailey, J.S., Strenzke, N., Brose, N., Müller, U., Reisinger, E., Moser, T., 2010. Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat Neurosci* 13, 869–876. <https://doi.org/10.1038/nn.2578>
- Papke, R.L., Ono, F., Stokes, C., Urban, J.M., Boyd, R.T., 2012. The nicotinic acetylcholine receptors of zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study. *Biochemical Pharmacology* 84, 352–365. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.04.022>
- Papke, R.L., Porter Papke, J.K., 2002. Comparative pharmacology of rat and human alpha7 nAChR conducted with net charge analysis. *Br J Pharmacol* 137, 49–61. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704833>

- Parks, X.X., Contini, D., Jordan, P.M., Holt, J.C., 2017. Confirming a Role for  $\alpha 9$ nAChRs and SK Potassium Channels in Type II Hair Cells of the Turtle Posterior Crista. *Front Cell Neurosci* 11, 356. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00356>
- Partridge, B.L., Pitcher, T.J., 1980. The sensory basis of fish schools: Relative roles of lateral line and vision. *J. Comp. Physiol.* 135, 315–325. <https://doi.org/10.1007/BF00657647>
- Paul, D.H., Roberts, B.L., 1977. The location and properties of the efferent neurons of the head lateral-line organs of dogfish. *J. Comp. Physiol.* 116, 117–127. <https://doi.org/10.1007/BF00605520>
- Peng, A.W., Salles, F.T., Pan, B., Ricci, A.J., 2011. Integrating the biophysical and molecular mechanisms of auditory hair cell mechanotransduction. *Nat Commun* 2, 523. <https://doi.org/10.1038/ncomms1533>
- Pérez, F., Granger, B.E., 2007. IPython: A System for Interactive Scientific Computing. *Computing in Science & Engineering* 9, 21–29. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.53>
- Pichler, P., Lagnado, L., 2020. Motor Behavior Selectively Inhibits Hair Cells Activated by Forward Motion in the Lateral Line of Zebrafish. *Current Biology* 30, 150-157.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.020>
- Pichler, P., Lagnado, L., 2019. The Transfer Characteristics of Hair Cells Encoding Mechanical Stimuli in the Lateral Line of Zebrafish. *J. Neurosci.* 39, 112–124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1472-18.2018>
- Pichler, P., Lagnado, L., 2018. Hair cells with heterogeneous transfer characteristics encode mechanical stimuli in the lateral line of zebrafish (preprint). *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/261669>
- Pickles, J.O., Comis, S.D., Osborne, M.P., 1984. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res* 15, 103–112. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(84\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0378-5955(84)90041-8)
- Pinto-Teixeira, F., Viader-Llargues, O., Torres-Mejia, E., Turan, M., Gonzalez-Gualda, E., Pola-Morell, L., Lopez-Schier, H., 2015. Inexhaustible hair-cell regeneration in young and aged zebrafish. *Biology Open* 4, 903–909. <https://doi.org/10.1242/bio.012112>
- Pisciottano, F., Cinalli, A.R., Stopiello, J.M., Castagna, V.C., Elgoyhen, A.B., Rubinstein, M., Gómez-Casati, M.E., Franchini, L.F., 2019. Inner Ear Genes Underwent Positive Selection and Adaptation in the Mammalian Lineage. *Mol Biol Evol* 36, 1653–1670. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz077>
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J., 2000. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* 102, 89–97. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00013-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00013-1)



- Prince, V.E., Pickett, F.B., 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet* 3, 827–837. <https://doi.org/10.1038/nrg928>
- Pujol-Martí, J., Baudoin, J.-P., Faucherre, A., Kawakami, K., López-Schier, H., 2010. Progressive neurogenesis defines lateralis somatotopy. *Dev Dyn* 239, 1919–1930. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22320>
- Pujol-Martí, J., Faucherre, A., Aziz-Bose, R., Asgharsharghi, A., Colombelli, J., Trapani, J.G., López-Schier, H., 2014. Converging Axons Collectively Initiate and Maintain Synaptic Selectivity in a Constantly Remodeling Sensory Organ. *Current Biology* 24, 2968–2974. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.012>
- Pujol-Martí, J., López-Schier, H., 2013. Developmental and architectural principles of the lateral-line neural map. *Front. Neural Circuits* 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00047>
- Pujol-Martí, J., Zecca, A., Baudoin, J.-P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., López-Schier, H., 2012. Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. *J Neurosci* 32, 2976–2987. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5157-11.2012>
- Pumain, R., Kurcewicz, I., Louvel, J., 1987. Ionic changes induced by excitatory amino acids in the rat cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 1067–1077. <https://doi.org/10.1139/y87-168>
- Quick, M.W., Lester, R.A.J., 2002. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* 53, 457–478. <https://doi.org/10.1002/neu.10109>
- Ragozzino, D., Barabino, B., Fucile, S., Eusebi, F., 1998. Ca<sup>2+</sup> permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells. *J Physiol* 507 ( Pt 3), 749–757. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.749bs.x>
- Raible, D.W., Kruse, G.J., 2000. Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 421, 189–198.
- Rajendra, S., Vandenberg, R.J., Pierce, K.D., Cunningham, A.M., French, P.W., Barry, P.H., Schofield, P.R., 1995. The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO J* 14, 2987–2998.
- Ranum, P.T., Goodwin, A.T., Yoshimura, H., Kolbe, D.L., Walls, W.D., Koh, J.-Y., He, D.Z.Z., Smith, R.J.H., 2019. Insights into the Biology of Hearing and Deafness Revealed by Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Reports* 26, 3160-3171.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.053>
- Ricci, A.J., Bai, J.-P., Song, L., Lv, C., Zenisek, D., Santos-Sacchi, J., 2013. Patch-Clamp Recordings from Lateral Line Neuromast Hair Cells of the Living Zebrafish. *Journal of Neuroscience* 33, 3131–3134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4265-12.2013>
- Roberts, B.L., Russell, I.J., 1972. The activity of lateral-line efferent neurones in stationary and swimming dogfish. *J. Exp. Biol.* 57, 435–448.
- Roberts, B.L., Russell, I.J., 1970. Efferent activity in the lateral line nerve of dogfish. *J Physiol* 208, 37P.

- Rohmann, K.N., Tripp, J.A., Genova, R.M., Bass, A.H., 2014. Manipulation of BK channel expression is sufficient to alter auditory hair cell thresholds in larval zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 217, 2531–2539. <https://doi.org/10.1242/jeb.103093>
- Rohmann, K.N., Wersinger, E., Braude, J.P., Pyott, S.J., Fuchs, P.A., 2015. Activation of BK and SK channels by efferent synapses on outer hair cells in high-frequency regions of the rodent cochlea. *J Neurosci* 35, 1821–1830. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2790-14.2015>
- Rothlin, C.V., Katz, E., Verbitsky, M., Elgoyhen, A.B., 1999. The  $\alpha 9$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Shares Pharmacological Properties with Type A  $\gamma$ -Aminobutyric Acid, Glycine, and Type 3 Serotonin Receptors. *Mol Pharmacol* 55, 248–254. <https://doi.org/10.1124/mol.55.2.248>
- Rothlin, C.V., Lioudyno, M.I., Silbering, A.F., Plazas, P.V., Casati, M.E.G., Katz, E., Guth, P.S., Elgoyhen, A.B., 2003. Direct Interaction of Serotonin Type 3 Receptor Ligands with Recombinant and Native  $\alpha 9\alpha 10$ -Containing Nicotinic Cholinergic Receptors. *Mol Pharmacol* 63, 1067–1074. <https://doi.org/10.1124/mol.63.5.1067>
- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., Triller, A., Avan, P., Moser, T., Petit, C., 2006. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127, 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.040>
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Russell, I.J., 1974. Central and peripheral inhibition of lateral line input during the startle response in goldfish. *Brain Res* 80, 517–522. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)91036-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)91036-1)
- Russell Ij, 1971. The role of the lateral-line efferent system in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 54, 621–641.
- Russell, I.J., 1971. The Pharmacology of Efferent Synapses in the Lateral-Line System of *Xenopus Laevis*. *Journal of Experimental Biology* 54, 643–659.
- Ryugo, D.K., 2011. Introduction to Efferent Systems, in: Ryugo, D.K., Fay, R.R. (Eds.), *Auditory and Vestibular Efferents*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer, New York, NY, pp. 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7070-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7070-1_1)
- Saito, K., 1983. Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tissue Res* 229, 467–481. <https://doi.org/10.1007/BF00207692>
- Sarrazin, A.F., Nuñez, V.A., Sapède, D., Tassin, V., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A., 2010. Origin and early development of the posterior lateral line system of zebrafish. *J Neurosci* 30, 8234–8244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5137-09.2010>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmitz, F., Königstorfer, A., Südhof, T.C., 2000. RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28, 857–872. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00159-8)
- Schnee, M.E., Lawton, D.M., Furness, D.N., Benke, T.A., Ricci, A.J., 2005. Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.004>
- Schnee, M.E., Santos-Sacchi, J., Castellano-Muñoz, M., Kong, J.-H., Ricci, A.J., 2011. Calcium-dependent synaptic vesicle trafficking underlies indefatigable release at the hair cell afferent fiber synapse. *Neuron* 70, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.031>
- Schoepfer, R., Whiting, P., Esch, F., Blacher, R., Shimasaki, S., Lindstrom, J., 1988. cDNA clones coding for the structural subunit of a chicken brain nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 1, 241–248. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90145-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90145-6)
- Seiler, C., 2005. Duplicated genes with split functions: independent roles of protocadherin15 orthologues in zebrafish hearing and vision. *Development* 132, 615–623. <https://doi.org/10.1242/dev.01591>
- Sewell, W.F., Starr, P.A., 1991. Effects of calcitonin gene-related peptide and efferent nerve stimulation on afferent transmission in the lateral line organ. *Journal of Neurophysiology* 65, 1158–1169. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.5.1158>
- Sgard, F., Charpentier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., Bertrand, D., Besnard, F., 2002. A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol. Pharmacol.* 61, 150–159. <https://doi.org/10.1124/mol.61.1.150>
- Shah, M., Haylett, D.G., 2000. The pharmacology of hSK1 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels expressed in mammalian cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 129, 627–630. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703111>
- Sheets, L., 2017. Excessive activation of ionotropic glutamate receptors induces apoptotic hair-cell death independent of afferent and efferent innervation. *Sci Rep* 7, 41102. <https://doi.org/10.1038/srep41102>
- Sheets, L., Kindt, K.S., Nicolson, T., 2012. Presynaptic CaV1.3 channels regulate synaptic ribbon size and are required for synaptic maintenance in sensory hair cells. *J. Neurosci.* 32, 17273–17286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3005-12.2012>
- Sheets, L., Trapani, J.G., Mo, W., Obholzer, N., Nicolson, T., 2011. Ribeye is required for presynaptic Ca(V)1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells. *Development* 138, 1309–1319. <https://doi.org/10.1242/dev.059451>

Shepherd, G.M., Corey, D.P., 1994. The extent of adaptation in bullfrog saccular hair cells. *J Neurosci* 14, 6217–6229.

Sidi, S., 2004. *gemin1* Encodes a Zebrafish L-Type Calcium Channel That Localizes at Sensory Hair Cell Ribbon Synapses. *Journal of Neuroscience* 24, 4213–4223. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0223-04.2004>

Simmons, D.D., Morley, B.J., 2011. Spatial and temporal expression patterns of nicotinic acetylcholine  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits in the embryonic and early postnatal inner ear. *Neuroscience* 194, 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.005>

Simmons, D.D., Tong, B., Schrader, A.D., Hornak, A.J., 2010. Oncomodulin identifies different hair cell types in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 518, 3785–3802. <https://doi.org/10.1002/cne.22424>

Spassova, M., Eisen, M.D., Saunders, J.C., Parsons, T.D., 2001. Chick cochlear hair cell exocytosis mediated by dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J Physiol* 535, 689–696. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00689.x>

Sperry, R.W., 1950. Neural basis of the spontaneous optokinetic response produced by visual inversion. *J Comp Physiol Psychol* 43, 482–489. <https://doi.org/10.1037/h0055479>

Spoon, C., Grant, W., 2011. Biomechanics of hair cell kinocilia: experimental measurement of kinocilium shaft stiffness and base rotational stiffness with Euler-Bernoulli and Timoshenko beam analysis. *J Exp Biol* 214, 862–870. <https://doi.org/10.1242/jeb.051151>

Spurny, R., Ramerstorfer, J., Price, K., Brams, M., Ernst, M., Nury, H., Verheij, M., Legrand, P., Bertrand, D., Bertrand, S., Dougherty, D.A., de Esch, I.J.P., Corringier, P.-J., Sieghart, W., Lummis, S.C.R., Ulens, C., 2012. Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3028-3034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208208109>

Steiner, A.B., Kim, T., Cabot, V., Hudspeth, A.J., 2014. Dynamic gene expression by putative hair-cell progenitors during regeneration in the zebrafish lateral line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E1393-1401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318692111>

Stocker, M., 2004.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 758–770. <https://doi.org/10.1038/nrn1516>

Stocker, M., Pedarzani, P., 2000. Differential distribution of three  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 476–493. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0842>

Straka, H., Simmers, J., Chagnaud, B.P., 2018. A New Perspective on Predictive Motor Signaling. *Curr Biol* 28, R232–R243. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.033>

Strøbaek, D., Jørgensen, T.D., Christophersen, P., Ahring, P.K., Olesen, S.P., 2000. Pharmacological characterization of small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels stably

expressed in HEK 293 cells. *Br. J. Pharmacol.* 129, 991–999. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703120>

Suli, A., Watson, G.M., Rubel, E.W., Raible, D.W., 2012. Rheotaxis in Larval Zebrafish Is Mediated by Lateral Line Mechanosensory Hair Cells. *PLOS ONE* 7, e29727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029727>

Taranda, J., Maison, S.F., Ballesteros, J.A., Katz, E., Savino, J., Vetter, D.E., Boulter, J., Liberman, M.C., Fuchs, P.A., Elgoyhen, A.B., 2009. A Point Mutation in the Hair Cell Nicotinic Cholinergic Receptor Prolongs Cochlear Inhibition and Enhances Noise Protection. *PLoS Biol* 7, e1000018. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000018>

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. *Nat Commun* 2, 171. <https://doi.org/10.1038/ncomms1171>

Thévenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M., 1998. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process* 7, 27–41. <https://doi.org/10.1109/83.650848>

Tong, B., Hornak, A.J., Maison, S.F., Ohlemiller, K.K., Liberman, M.C., Simmons, D.D., 2016. Oncomodulin, an EF-Hand Ca<sup>2+</sup> Buffer, Is Critical for Maintaining Cochlear Function in Mice. *J Neurosci* 36, 1631–1635. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3311-15.2016>

Toro, C., Trapani, J.G., Pacentine, I., Maeda, R., Sheets, L., Mo, W., Nicolson, T., 2015. Dopamine Modulates the Activity of Sensory Hair Cells. *Journal of Neuroscience* 35, 16494–16503. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1691-15.2015>

Toyoshima, K., Shimamura, A., 1982. Comparative study of ultrastructures of the lateral-line organs and the palatal taste organs in the African clawed toad, *Xenopus laevis*. *Anat Rec* 204, 371–381. <https://doi.org/10.1002/ar.1092040411>

Trapani, J.G., Nicolson, T., 2011. Mechanism of Spontaneous Activity in Afferent Neurons of the Zebrafish Lateral-Line Organ. *Journal of Neuroscience* 31, 1614–1623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3369-10.2011>

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. *J Physiol* 595, 265–282. <https://doi.org/10.1113/JP272466>

Unwin, N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346, 967–989. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.031>

van Netten, S.M., 2006. Hydrodynamic detection by cupulae in a lateral line canal: functional relations between physics and physiology. *Biol Cybern* 94, 67–85. <https://doi.org/10.1007/s00422-005-0032-x>

- Van Trump, W.J., McHenry, M.J., 2008. The morphology and mechanical sensitivity of lateral line receptors in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *J Exp Biol* 211, 2105–2115. <https://doi.org/10.1242/jeb.016204>
- Verbitsky, M., Rothlin, C.V., Katz, E., Belén Elgoyhen, A., 2000. Mixed nicotinic–muscarinic properties of the  $\alpha 9$  nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* 39, 2515–2524. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00124-6)
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., Adelman, J.P., 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8, 321–329. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(98\)80056-1](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(98)80056-1)
- Vernino, S., Amador, M., Luetje, C.W., Patrick, J., Dani, J.A., 1992. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8, 127–134. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90114-s](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90114-s)
- Vetter, D.E., Katz, E., Maison, S.F., Taranda, J., Turcan, S., Ballesteros, J., Liberman, M.C., Elgoyhen, A.B., Boulter, J., 2007. The  $\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20594–20599. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708545105>
- Vincler, M., McIntosh, J.M., 2007. Targeting the  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor to treat severe pain. *Expert Opin Ther Targets* 11, 891–897. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.7.891>
- Vincler, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., 2006. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 17880–17884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608715103>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S.J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K.J., Mayorov, N., Nelson, A.R.J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C.J., Polat, İ., Feng, Y., Moore, E.W., VanderPlas, J., Laxalde, D., Perktold, J., Cimrman, R., Henriksen, I., Quintero, E.A., Harris, C.R., Archibald, A.M., Ribeiro, A.H., Pedregosa, F., van Mulbregt, P., SciPy 1.0 Contributors, 2020. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* 17, 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Vollrath, M.A., Eatock, R.A., 2003. Time course and extent of mechanotransducer adaptation in mouse utricular hair cells: comparison with frog saccular hair cells. *J Neurophysiol* 90, 2676–2689. <https://doi.org/10.1152/jn.00893.2002>
- von Holst, E., Mittelstaedt, H., 1950. Das Reafferenzprinzip. *Naturwissenschaften* 37, 464–476. <https://doi.org/10.1007/BF00622503>
- Walt, S. van der, Colbert, S.C., Varoquaux, G., 2011. The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. *Computing in Science & Engineering* 13, 22–30. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2011.37>

- Wang, Y., Sanghvi, M., Gribizis, A., Zhang, Y., Song, L., Morley, B., Barson, D.G., Santos-Sacchi, J., Navaratnam, D., Crair, M., 2021. Efferent feedback controls bilateral auditory spontaneous activity. *Nat Commun* 12, 2449. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22796-8>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Weisstaub, N., Vetter, D.E., Belén Elgoyhen, A., Katz, E., 2002. The  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hearing Research* 167, 122–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00380-5)
- Wersinger, E., McLean, W.J., Fuchs, P.A., Pyott, S.J., 2010. BK Channels Mediate Cholinergic Inhibition of High Frequency Cochlear Hair Cells. *PLOS ONE* 5, e13836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013836>
- Westerfield, M., 2000. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*. University of Oregon Press.
- Williams, J.A., Holder, N., 2000. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hearing Research* 143, 171–181. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(00\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(00)00039-3)
- Windsor, S.P., McHenry, M.J., 2009. The influence of viscous hydrodynamics on the fish lateral-line system. *Integr Comp Biol* 49, 691–701. <https://doi.org/10.1093/icb/icp084>
- Wong, A.B., Rutherford, M.A., Gabrielaitis, M., Pangrsic, T., Göttfert, F., Frank, T., Michanski, S., Hell, S., Wolf, F., Wichmann, C., Moser, T., 2014. Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of  $Ca^{2+}$  influx to exocytosis. *EMBO J* 33, 247–264. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387110>
- Wong, H.-T.C., Zhang, Q., Beirl, A.J., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Kindt, K., 2019. Synaptic mitochondria regulate hair-cell synapse size and function. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48914>
- Wonnacott, S., Barik, J., 2007. Nicotinic ACh Receptors. *Tocris Reviews* 28.
- Wu, Y.C., Ricci, A.J., Fettiplace, R., 1999. Two components of transducer adaptation in auditory hair cells. *J Neurophysiol* 82, 2171–2181. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.5.2171>
- Wu, Z., Müller, U., 2016. Molecular Identity of the Mechanotransduction Channel in Hair Cells: Not Quiet There Yet. *J Neurosci* 36, 10927–10934. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1149-16.2016>
- Yamada, Y., 1973. Fine structure of the ordinary lateral line organ. I. The neuromast of lamprey, *Entosphenus japonicus*. *J Ultrastruct Res* 43, 1–17. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(73\)90067-1](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(73)90067-1)
- Yamada, Y., Hama, K., 1972. Fine structure of the lateral-line organ of the common eel, *Anguilla japonica*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124, 454–464. <https://doi.org/10.1007/BF00335251>

- Yuhas, W.A., Fuchs, P.A., 1999. Apamin-sensitive, small-conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells. *J. Comp. Physiol. A* 185, 455–462. <https://doi.org/10.1007/s003590050406>
- Zenisek, D., Horst, N.K., Merrifield, C., Sterling, P., Matthews, G., 2004. Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J Neurosci* 24, 9752–9759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2886-04.2004>
- Zhang, Q., Li, S., Wong, H.-T.C., He, X.J., Beirl, A., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Kindt, K.S., 2018. Synaptically silent sensory hair cells in zebrafish are recruited after damage. *Nat Commun* 9, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03806-8>
- Zhao, B., Müller, U., 2015. The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 34, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.08.006>
- Zheng, X.Y., Henderson, D., Hu, B.H., Ding, D.L., McFadden, S.L., 1997. The influence of the cochlear efferent system on chronic acoustic trauma. *Hear Res* 107, 147–159. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(97\)00031-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(97)00031-2)
- Zoli, M., Pistillo, F., Gotti, C., 2015. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>
- Zorrilla de San Martín, J., Pyott, S., Ballesteros, J., Katz, E., 2010. Ca(2+) and Ca(2+)-activated K(+) channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *J Neurosci* 30, 12157–12167. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2541-10.2010>
- Zottoli, S.J., Van Horne, C., 1983. Posterior lateral line afferent and efferent pathways within the central nervous system of the goldfish with special reference to the Mauthner cell. *J. Comp. Neurol.* 219, 100–111. <https://doi.org/10.1002/cne.902190110>