



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Neurobiología

Actividad de calcio en la glía radial del cerebelo y su asociación a cambios morfológicos durante el desarrollo del pez cebra

Tesis

Para optar por el grado de:

Doctor en Ciencias

Presenta:

Q.F.B. Elizabeth Pereida Jaramillo

Director de tesis:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Instituto de Neurobiología

Comité tutor:

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Instituto de Neurobiología

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar

Instituto de Fisiología Celular

Campus Juriquilla, Querétaro, Qro. Noviembre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**

Tutor

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Comité Tutor

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar

Jurado de examen

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dr. Ernesto Maldonado Olvera

Dr. José Fernando Peña Ortega

Dra. Denhi Schnabel Peraza

Personal de apoyo del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular

Técnico Académico Dra. Ángeles Edith Espino Saldaña

Auxiliar de laboratorio Marina Ramírez Romero

El proyecto financiado por:

CONACYT Ciencia Básica No. A1S7659

PAPIIT-DGAPA UNAM No. IN204520

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Número de becario 446622

Unidad de enseñanza

Dra. Nuri Aranda López
Ma. Carmen Mendoza López

Unidad de Microscopia

Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

Bioterio

M. V. Z. José Martín García Servín
Dra. María A. Carbajo Mata
Dra. G. Alejandra Castilla León

Unidad de Proteogenómica

M. en C. Adriana González Gallardo
Dr. Michael Conrad Jeziorski

Biblioteca

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela
Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz
Lic. Soledad Medina Malagón

Soporte técnico

L.c.E. Carlos Sair Flores Bautista

Video Conferencia

Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala

Compañeros del laboratorio D-15

Abstract

Radial glial cells are a distinct non-neuronal cell type that, during development, span the entire width of the brain walls of the ventricular system. They play a central role in the origin and placement of neurons since their processes form structural scaffolds that guide and facilitate neuronal migration. Furthermore, glutamatergic signalling in the radial glia of the adult cerebellum (i.e., Bergmann glia), is crucial for precise motor coordination. Radial glia cells exhibit spontaneous calcium activity and functional coupling spread calcium waves. However, the origin of calcium activity in relation to the ontogeny of cerebellar radial glia has not been widely explored, and many questions remain unanswered regarding the role of radial glia in brain development in health and disease. In this study we used a combination of whole mount immunofluorescence and calcium imaging in transgenic (gfap-GCaMP6s) zebrafish to determine how development of calcium activity is related to morphological changes of the cerebellum.

We found that the morphological changes in cerebellar radial glia are quite dynamic; the cells are remarkably larger and more elaborate in their soma size, process length and numbers after 7 days post fertilization. Spontaneous calcium events were scarce during the first 3 days of development and calcium waves appeared on day 5, which is associated with the onset of more complex morphologies of radial glia. Blockage of gap junction coupling inhibited the propagation of calcium waves, but no basal local calcium activity. This work establishes crucial clues in radial glia organization, morphology and calcium signalling during development and provides insight into its role in complex behavioural paradigms.

Resumen

La glía radial es un tipo de célula no neuronal que durante el desarrollo da estructura y forma las paredes del cerebro desde la zona ventricular hasta la superficie pial. Desempeña un rol central en el origen y ubicación de las neuronas, sus procesos forman andamios estructurales que guían y facilitan la migración neuronal. Además, la señalización glutamatérgica en la glía radial del cerebelo adulto (glía de Bergmann), es crucial para una coordinación motora precisa. La glía radial exhibe actividad espontánea de eventos de calcio y acoplamiento funcional para la propagación de ondas de calcio. Sin embargo, el origen de la actividad de calcio en relación con la ontogenia cerebelar de la glía radial no se ha explorado, y muchas preguntas permanecen sin respuesta con respecto al papel de la glía radial en el desarrollo del cerebro.

En este estudio utilizamos una combinación de inmunofluorescencia en pez cebra y registros de imagen de calcio en una línea transgénica (gfap-GCaMP6s) para determinar el proceso del desarrollo de la actividad de calcio y su relación con los cambios morfológicos del cerebelo. Encontramos que los cambios morfológicos en la glía radial cerebelar son muy dinámicos; el tamaño de los somas, la longitud y el número de los procesos aumenta después de los 5 días postfertilización. Mientras que la actividad espontánea de los eventos de calcio fue escasa durante los primeros 3 días del desarrollo; las ondas de calcio aparecen en el día 5, lo cual está asociado con la aparición de morfologías complejas en la glía radial. El bloqueo de las uniones comunicantes inhibió la propagación de las ondas de calcio, pero no la actividad de calcio basal. Este estudio revela los cambios en la organización de la glía radial, a nivel morfológico y de señalización de calcio durante el desarrollo y provee de conocimiento para establecer puntos de partida clave para explorar paradigmas de conducta complejos.

Índice General

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
El cerebelo	4
Organización topográfica y funcional del cerebelo.....	5
Desarrollo del cerebelo	6
La evolución de las células gliales	8
Glía radial del cerebelo	9
Señales de calcio	9
Ondas de calcio	10
El modelo experimental: Pez cebra.....	12
Sistema Tol2	14
Sensores de calcio genéticamente codificados	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
6. Materiales y métodos	19
Cuidado y mantenimiento del pez cebra	19
Inmunofluorescencia en pez completo.....	19
Imágenes por confocal.....	20
Análisis morfológico	21
Análisis estadístico de la morfología celular de la glía radial	22
Biología molecular.....	22
Generación del transgénico (Tg Tol2-gfap-GCaMP6s).....	24
Imagen de calcio <i>in vivo</i>	25
Bloqueo farmacológico de uniones comunicantes <i>in vivo</i>	25
Análisis y estadística de la imagen de calcio	26
7. Resultados	27

Distribución de la glía radial en el cerebelo durante el desarrollo	27
Análisis morfométrico de la glía radial durante el desarrollo	30
Obtención del pez transgénico.....	33
Actividad de calcio en la glía radial durante el desarrollo.....	35
Ondas de calcio en la glía radial durante el desarrollo	42
Efecto en las señales de calcio durante el bloqueo de uniones comunicantes..	45
8. Discusión	50
9. Conclusiones	55
10. Perspectivas	57
11. Referencias	58
12. Apéndice	75

Índice de Figuras

Figura	Página
1. Estructura anatómica del cerebelo del pez cebra.....	5
2. Desarrollo del cerebelo del pez cebra	7
3. Propagación de las ondas de calcio en la glía radial.....	11
4. Sistema Tol2	15
5. Estrategia de clonación	23
6. Glía radial durante el desarrollo del pez cebra	29
7. Características morfométricas de la glía radial durante el desarrollo	32
8. Obtención del transgénico.....	34
9. Zonas anatómicas de los registros.....	36
10. Señales de calcio durante el desarrollo.....	40
12. Eventos de calcio campo 1 vs campo 2	41
12. Ondas de calcio en la glía radial	44
13. Disrupción de las ondas de calcio en la glía radial.....	48
A1. Glía radial y núcleos del cerebelo en pez cebra	81
A2. Mapa pTol2-gfap-GCaMP6s	82
A3. Promotores gliales	83

Índice de Tablas

Tabla	Página
1. Características morfométricas de la glía radial.....	31
2. Características morfométricas de la glía radial por regiones.....	33
3. Señales de calcio de la glía radial durante el desarrollo	39
4. Señales de calcio en la glía radial después del bloqueo de uniones comunicantes	49
A1. Comparación de la morfología celular de la glía radial en las regiones del cerebelo a diferentes edades	75
A2. Comparación de las señales de calcio de la glía radial por edad	77
A3. Comparación de las señales de calcio de la glía radial entre campos.....	78
A4. Comparación de las señales de calcio normoxia vs heptanol.....	80

Abreviaturas

Ca²⁺	Ión calcio
CCe	Cuerpo del cerebelo
CG	Capa granular
CM	Capa molecular
CP	Capa de Purkinje
Cx43	Conexina 43
dpf	Días postfertilización
EG	Eminencia <i>granularis</i>
GB	Glía de Bergmann
GCaMP6s	Sensor de calcio genéticamente codificado
GECIs	Sensores de calcio genéticamente codificados
IP₃	Inositol-3-fosfato
K⁺	Ión potasio
kb	kilobases
LCa	Lóbulo caudal del cerebelo
NP	Neurona de Purkinje
ns	no significativo
P₂Y₂	Receptores purinérgicos
RG	Glía radial
Tol2	Transposón 2 del <i>Oryzias latipes</i> (pez medaka)
Va	Válvula del cerebelo
vz	Zona ventricular

1. Introducción

El cerebelo está involucrado en el procesamiento de las funciones sensoriomotoras y también participa en procesos de cognición y emoción (Koziol et al., 2014; Schmahmann, 2019). El daño al cerebelo puede resultar en alteraciones motoras o en trastornos que no involucran movimiento, como el autismo (Manto et al., 2020; van der Heijden et al., 2021, 2021). Considerando las implicaciones clínicas de la función del cerebelo y su interacción con diversas áreas del cerebro, emerge el interés de estudiar su desarrollo y su organización funcional.

La glía radial es un tipo celular del cerebelo que está altamente conservada desde peces hasta mamíferos (Hashimoto & Hibi, 2012; Hibi et al., 2017; Matsui et al., 2014). Se trata de una célula con forma bipolar del cerebelo que abarca todo el ancho de la corteza durante la etapa embrionaria temprana (Jurisch-Yaksi et al., 2020; Takeuchi et al., 2015). Durante la formación de las capas cerebelares, la glía radial extiende delgados procesos hacia la superficie pial (parte más externa de la corteza cerebelosa), formando andamios que guían a las neuronas granulares que migran hacia la superficie cortical (capa más interna) (Hamling et al., 2015) posteriormente los somas de la glía radial se alinean a lo largo de la capa de las neuronas de Purkinje y cumplen la función de los astrocitos, como proveer oxígeno, glucosa y remover glutamato de la hendidura sináptica. Durante la etapa adulta se le conoce como glía de Bergman y en peces permanece como célula madre neural (Kaslin et al., 2017; Than-Trong & Bally-Cuif, 2015). Aunque la glía radial tiene un rol fundamental durante el desarrollo y la función del cerebelo, se ha prestado poca atención a sus cambios morfológicos y funcionales durante las primeras etapas del desarrollo en peces. En contraste, se ha generado mucha información acerca del componente neuronal (Aizenberg & Schuman, 2011; Bae et al., 2009; Hibi & Shimizu, 2012; Hsieh et al., 2014; Matsui et al., 2014). Además se ha reportado que los astrocitos y la glía radial detectan y modulan la actividad neuronal, indicando

que las neuronas y la glía se comunican recíprocamente (Lines et al., 2020; Perea, 2005).

Estudios en ratón han mostrado que los astrocitos y la glía radial presentan eventos de calcio llamados ondas de calcio que se propagan a través de varias células (Semyanov et al., 2020; Shigetomi et al., 2016; Weissman et al., 2004). Las ondas de calcio ocurren de manera espontánea, pero requieren de la expresión de diversos componentes moleculares clave: las uniones comunicantes (conexina 43), receptores de ATP (P2Y1) y la liberación de calcio mediada por receptores intracelulares de inositol-3-fosfato (IP₃) (Denizot et al., 2019; Nett et al., 2002). Durante el desarrollo en la corteza cerebral embrionaria de ratón, las ondas de calcio de la glía radial incrementan su frecuencia durante la neurogénesis, y cuando las ondas de calcio se bloquean, la zona ventricular reduce la proliferación celular (Weissman et al., 2004). También se han descrito ondas de calcio en mamíferos adultos, la glía radial del cerebelo (glía de Bergmann) actúa en grupos delimitados de 6-8 células durante la ejecución locomotriz, esta actividad de calcio se ha clasificado en 3 tipos: destellos, flamas y explosiones de calcio (por la forma en la que se presentan) (Hoogland et al., 2009; Nimmerjahn et al., 2009).

El pez cebra es un atractivo modelo experimental para entender los cambios morfológicos y funcionales (eventos de calcio) de la glía radial durante el desarrollo del cerebelo. Además, desde el descubrimiento de que el cerebro del pez adulto se repara de lesiones a través de la inducción de la proliferación de la glía radial, un nuevo interés en las características funcionales de estas células ha emergido (Ekström et al., 2001; Lange et al., 2020; Zupanc et al., 2005).

En este trabajo, se abordó el estudio de las características morfológicas de la glía radial del cerebelo y el origen de la señalización de calcio durante el desarrollo. Primero, se realizó un estudio morfométrico de la glía radial en los primeros días del desarrollo. Después, generamos una línea transgénica de pez

cebra que expresa un indicador fluorescente de calcio genéticamente codificado GCaMP6s en la glía radial para estudiar la ontogenia de la aparición de las señales de calcio del cerebelo. Los resultados mostraron que la glía radial del cerebelo despliega elevaciones de calcio antes de la formación de los circuitos neuronales y una alta actividad de calcio que coincide con el incremento en la complejidad morfológica de los procesos de la glía radial. Finalmente, mostramos que el bloqueo farmacológico de las uniones comunicantes inhibe la propagación de las ondas de calcio en estados larvarios.

2. Antecedentes

El cerebelo

La organización celular del cerebelo está altamente conservada en vertebrados. Consta de tres capas celulares: la capa de neuronas de Purkinje, la capa molecular y la capa granular. En la capa de las neuronas de Purkinje se encuentran los somas de las neuronas de Purkinje y los somas de la glía de Bergmann; en la capa molecular se encuentran los procesos de las neuronas de Purkinje, los procesos de la glía de Bergmann y las células en canasta. En la capa granular se encuentran las neuronas granulares y las células de Golgi (Gruol et al., 2016) (Figura 1A). En peces, la organización general del cerebelo consiste en un lóbulo mayor llamado cuerpo cerebelar (CCe), dos lóbulos bilaterales y la aurícula (vestíbulo del cerebelo). El pez cebra tiene una sola folia, con 3 regiones principales: la válvula del cerebelo (Va), el cuerpo del cerebelo (CCe) y el lóbulo vestibulolateral formados por la eminencia *granularis* (EG) y el lóbulo caudal (Figura 1B).

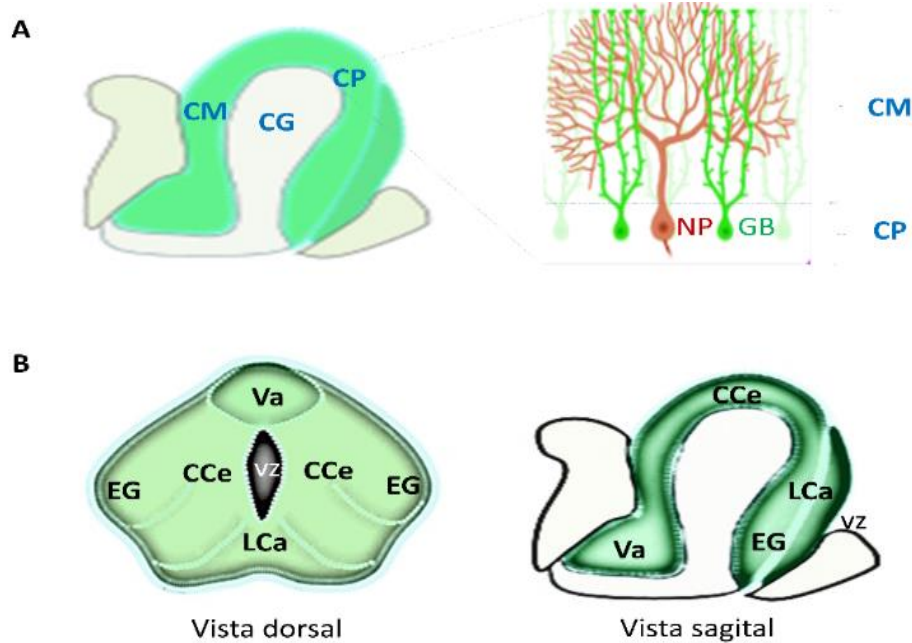


Figura 1. Estructura anatómica del cerebelo del pez cebra. **(A)** Corte sagital del cerebelo en el que se observan las capas celulares en las que se organiza el cerebelo. Las capas se indican con letras en color azul: CP: capa de neuronas de Purkinje, CM: capa molecular y CG capa granular. Además, se muestra un esquema de las células: NP: neurona de Purkinje y GB glía de Bergmann. **(B)** Vista dorsal y sagital de las regiones del cerebelo: Va: válvula del cerebelo, CCe: cuerpo del cerebelo, EG: eminencia *granularis*, LCa: lóbulo caudal y vz: zona ventricular.

Organización topográfica y funcional del cerebelo

En el cerebelo del pez cebra en larvas 5 dpf y en el adulto la válvula del cerebelo manda proyecciones hacia el nervio oculomotor, que controla los movimientos del ojo y procesa información de tipo no-locomotor, recibe información sensorial táctil y de la línea lateral. El cuerpo del cerebelo (CCe) manda proyecciones hacia el núcleo del fascículo medial longitudinal, el núcleo rojo, el tálamo y la formación reticular. Durante la actividad locomotora, se activa para modular y regular la precisión motora temporal del nado. Además, recibe información sensorial de tipo visual. El lóbulo vestibulo caudal (EG y LCa) envía proyecciones hacia el núcleo oculomotor, controla los movimientos oculares de sacada. También manda proyecciones hacia regiones anteriores del hipotálamo y

el *torus semicircularis*. Recibe y procesa información sensorial auditiva (Aizenberg & Schuman, 2011; Chang et al., 2021; Hsieh et al., 2014; Matsui et al., 2014; Poulsen et al., 2021).

Desarrollo del cerebelo

El tubo neural del pez cebra se forma a las 24 horas postfertilización, después comienza a formarse el cerebelo a partir de dos zonas neurogénicas: en el labio rómbico (LR) se producen las neuronas granulares que migran hacia la región central para formar la capa granular mientras que desde la zona ventricular (vz) se producen las neuronas de Purkinje, interneuronas, las células eurodendroides y la glía de Bergmann que van a migrar y formar las capas más externas del cerebelo (Figura 2A) (Hashimoto & Hibi, 2012; Takeuchi et al., 2017). Las células progenitoras derivadas del LR se mantienen constantemente activas produciendo neuronas granulares; mientras que las progenitoras de la zona ventricular (vz), es decir, la glía radial está activa produciendo neuronas de Purkinje, interneuronas y glía radial durante 1-3 meses, después se vuelve quiescente. Aunque, si se presenta daño celular en el cerebelo adulto, la glía radial se activa y produce glía radial e interneuronas pero, produce pocas neuronas de Purkinje y células eurodendroides (Kaslin et al., 2017).

Los cambios morfológicos para la formación del cerebelo del pez cebra se llevan a cabo durante la primera semana después de su fertilización (Figura 2B, parte superior). Los cambios funcionales, conductuales y celulares están descritos debajo de una línea negra que representa los periodos (dpf): la diferenciación neuronal en el cerebelo del pez cebra inicia a los 3 dpf y la estratificación de las capas ocurre a los 5 dpf (Bae et al., 2009). De 4-7 dpf las neuronas de Purkinje procesan estímulos sensoriales, como la luz y el tacto y a los 5 dpf, la larva comienza la caza y captura de su presa (Hsieh et al., 2014). Además, entre 6-8 dpf, las neuronas del cerebelo ya codifican la información de conductas complejas

involucradas en el aprendizaje motor (Aizenberg & Schuman, 2011) (Figura 2B, parte inferior).

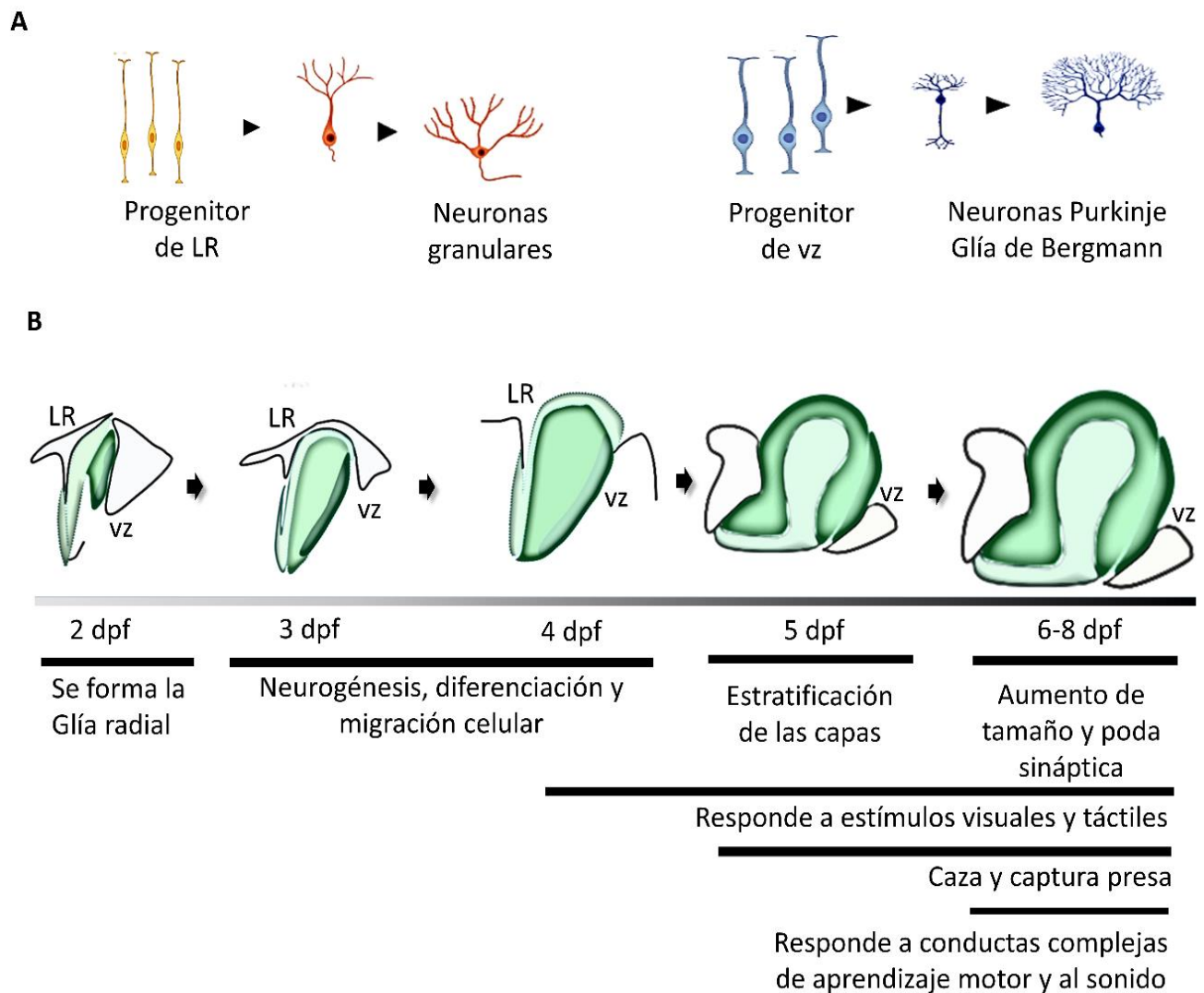


Figura 2. Desarrollo del cerebelo del pez cebra. **(A)** Progenitores neuronales. Las que se forman en el labio rómbico (LR) generan neuronas granulares y las células progenitoras de la zona ventricular (vz) producen neuronas de Purkinje y glía de Bergmann. **(B)** Desarrollo morfológico y funcional del cerebelo en la etapa embrionaria y larvaria; dpf = días postfertilización.

La evolución de las células gliales

Las células gliales están altamente conservadas evolutivamente, sin embargo, aún se desconocen muchas de sus funciones y su contribución en los circuitos neuronales (Ortega & Olivares-Bañuelos, 2020). Recientemente se han descrito funciones en la glía que permiten entender mejor la capacidad cerebral como sistema; algunos de estos hallazgos en invertebrados son: las células de tipo radial en equinodermos permiten la completa regeneración de su sistema nervioso (Mashanov & Zueva, 2018), un tipo de glía radial en *Caenorhabditis elegans* expresa una proteína encargada de controlar la estructura y función de neuronas sensoriales (Wallace et al., 2016). Un tipo celular llamado *Semper* con expresión de genes similar la glía de Müller (glía radial del ojo en mamíferos) se ha detectado en *Drosophila* (Charlton-Perkins et al., 2017) sin embargo, aún se desconoce su función. En vertebrados se han hecho más estudios sobre la glía en general y en particular sobre la glía radial. En tortugas la glía radial es progenitora neuronal durante el desarrollo y permanece en etapas adultas con potencial de célula progenitora neuronal (Clinton et al., 2014). En mamíferos, las células de Müller (glía radial) de la retina y la glía de Bergmann (glía radial) del cerebelo, permanecen en el estado adulto interviniendo en múltiples funciones: la glía de Bergmann remueve el glutamato de la hendidura sináptica a través de los transportadores de glutamato/aspartato (GLAST) y la recaptura de la glucosa se activa con la recaptura del glutamato (Guillem et al., 2015; Méndez-Flores et al., 2016). Además, estas células se encargan de mantener la estructura de las capas del cerebelo para que haya una adecuada comunicación neuronal (Miyazaki et al., 2017). En pez cebra no hay estudios de la glía radial durante el desarrollo, en adultos, la glía radial permanece como progenitor neuronal (Van Dyck et al., 2021).

Glía radial del cerebelo

La glía radial del cerebelo en mamíferos se forma a partir de las células neuroepiteliales (células cuboides); estas células cuboides comienzan a alargarse hasta producir la glía radial. Al inicio, la glía radial tiene un núcleo ameboide y grande con cromatina dispersa, tiene un proceso delgado con dos o tres protuberancias filiformes, durante su migración crece a partir de una estructura bipolar desde los ventrículos para formar las capas corticales y se encuentra asociada a vasos sanguíneos desde etapas muy tempranas. Después de su migración el número de procesos incrementa y se expanden los pies terminales cónicos. Al final, la glía de Bergmann concluye su transformación con la complejidad de sus procesos (Das, 1976; Takeuchi et al., 2017; Xu et al., 2013; Yamada & Watanabe, 2002).

Señales de calcio

La glía radial carece de excitabilidad, al igual que los astrocitos se comunica vía señales de calcio. Las señales de calcio de los astrocitos pueden ocurrir a través de la liberación de neurotransmisores o gliotransmisores (Bennett et al., 1981; Denizot et al., 2019; Nett et al., 2002). Los neurotransmisores y gliotransmisores que actúan como principales moduladores son el glutamato y el ATP en el cerebelo de ratón (Nimmerjahn et al., 2009). Los astrocitos generan frecuentemente numerosos eventos de calcio en somas y procesos. Sin embargo, las características de los eventos de calcio no son reportados porque ocurren en microdominios (Grosche et al., 1999; Krishnan & Chatterjee, 2013; Shigetomi et al., 2013), es decir, en áreas muy puntuales, por ejemplo, en los procesos cercanos a las áreas perisinápticas de las neuronas de Purkinje que son difíciles de registrar en los modelos de ratón o en rebanadas de cerebelo que es como se ha estudiado más. Por otro lado, las señales de calcio en los astrocitos también pueden generarse independientemente de la actividad neuronal, esta actividad es llamada actividad espontánea. Los mecanismos que permiten la entrada de calcio hacia los astrocitos

y la glía radial son dos: a través de la entrada de calcio extracelular o bien, a través de liberación de calcio intracelular (Di Virgilio et al., 1996; Plattner & Verkhratsky, 2015).

Ondas de calcio

Los astrocitos forman un sincitio que comunica a una célula con otra, vía uniones comunicantes (localizadas en somas y procesos, Figura 3). La actividad espontánea, neurotransmisores (glutamato, ATP) o factores de crecimiento liberados hacia el espacio extracelular pueden generar elevaciones transitorias de calcio intracelular y liberación de inositol-3-fosfato (IP_3) que se propaga a través de sincitios, a esto se le conoce como ondas de calcio (Haas et al., 2006; Hoogland et al., 2009; Morita et al., 2003; Nett et al., 2002).

La propagación de las ondas de calcio es isopotencial, así que no afecta la excitabilidad neuronal pero si el de las células gliales, por lo que facilitan la comunicación a zonas distantes (Dermietzel et al., 1991; Kiyoshi et al., 2018). En los astrocitos de ratón se generan ondas de calcio que se propagan a una velocidad de 50 $\mu\text{m/s}$ en grupos delimitados de células (Beierlein & Regehr, 2006). Además se ha mostrado que el grado de acoplamiento glial es diverso y varía dependiendo de la región del cerebro y de la edad (Mathiesen et al., 2013; Matias et al., 2019). Por ejemplo, la glía de Bergmann (glía radial del cerebelo) tiene un acoplamiento celular de hasta un 95% en el cerebelo de ratón adulto (Di Virgilio et al., 1996; Müller et al., 1992).

No se sabe específicamente cual es la función de las ondas de calcio, al parecer depende del contexto fisiológico en el cual se encuentren. La teoría general de la función del acoplamiento glial plantea que la capacidad de los astrocitos de generar ondas de calcio es para recapturar el glutamato y remover el exceso del ión

potasio de la hendidura sináptica y de esta manera, controla la excitabilidad neuronal (Bellot-Saez et al., 2018; Buskila et al., 2019). En el cerebelo de mamíferos adultos se han descrito las ondas de calcio con funciones muy diversas por ejemplo: durante la ejecución de movimiento en ratones la glía participa en la codificación neuronal a través de ondas de calcio (Nimmerjahn et al., 2009; Tanaka, 2008). Otros grupos han reportado que también permite una distribución uniforme de glucosa en lugares con alta actividad neuronal (Giaume & Theis, 2010; Rouach et al., 2008).

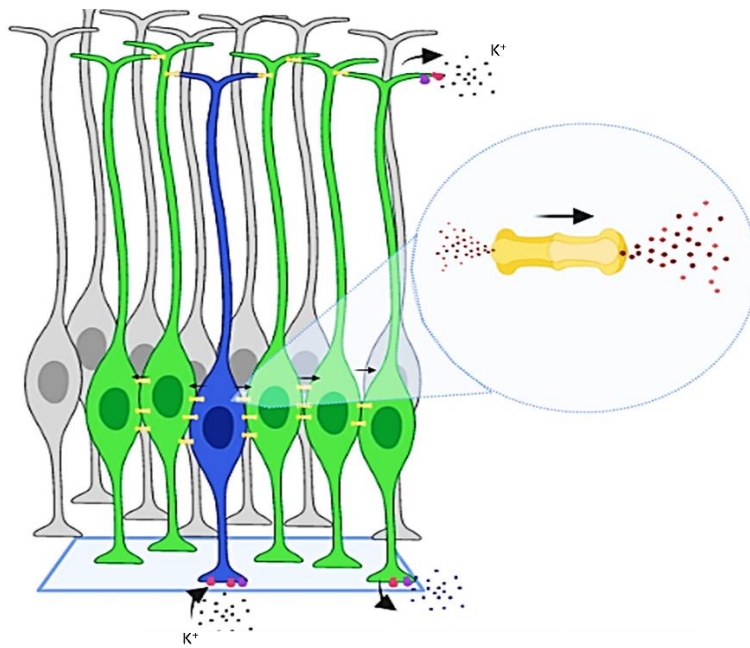


Figura 3 Propagación de las ondas de calcio en la glía radial. En el esquema la glía radial (célula azul) envuelve una hendidura sináptica activa y a través de los transportadores de glutamato (rojo) y los canales de potasio (morado) remueve el glutamato y el ión potasio de esa zona. Aumentan las concentraciones de calcio y a través de las conexinas (amarillo), difunde inositol-3-fosfato (IP₃), ión potasio (K⁺) y ión calcio (Ca²⁺) hacia las células radiales vecinas (en verde) generando una onda de calcio que también redistribuye el ión potasio y lo libera en una zona no activa (glía radial gris).

En ratones durante las etapas tempranas del desarrollo, las ondas de calcio en glía radial son clave en procesos de neurogénesis y de diferenciación neuronal de la corteza (Weissman et al., 2004). Los astrocitos y glía radial del cerebelo expresan la conexina 43 (Cx43) desde etapas embrionarias en pez cebra (Giaume

& Liu, 2012) y hay estudios que sugieren un rol importante en procesos de proliferación, migración y diferenciación celular. Por ejemplo, en ratones knock-out $Cx43^{-/-}$ hay un decremento en la proliferación neuronal y se reduce la tasa de diferenciación celular (Liebmann et al., 2013).

Para que se propaguen las ondas de calcio es necesario que una señal (neurotransmisor-gliotransmisor) active a un astrocito, o bien que la actividad espontánea a través de un astrocito permita la elevación del ión calcio dentro del astrocito, después que se eleve el IP_3 y que se abran las reservas intracelulares del ión calcio y que el IP_3 pase a través de las conexinas para que se mande la señal a las otras células y se dé la elevación de calcio coordinada. Estos antecedentes sugieren que ocurre este tipo de eventos de calcio mediado por conexinas en la glía radial del cerebelo del pez cebra.

El modelo experimental: Pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez tropical que vive en ríos de agua dulce, es originario de la India, y es muy popular en centros de investigación. En 1981 George Streisinger utilizó este pez vertebrado para clonarlo y posteriormente se estableció como modelo experimental en distintos campos de la ciencia: en biología del desarrollo, biología celular y molecular, neurofisiología, farmacología etc. (Houart, 2001; Meunier, 2012).

Hay muchos estudios comparativos de pez cebra con otros peces, y otros vertebrados como ratón o humanos que permiten comprender diversos mecanismos biológicos conservados. El genoma del pez cebra tiene un tamaño de 1700 Mb con 25 cromosomas, su DNA es diploide, tiene una homología del 70% con los genes humanos y el 84% de genes conocidos se han asociado a una enfermedad. El pez cebra se ha utilizado como herramienta para la manipulación del DNA y estudio de

sus fenotipos a gran escala. Se ha utilizado para estudios de enfermedades complejas como depresión, autismo, psicosis, efectos de drogas de abuso y desordenes cognitivos gracias al uso de drogas que inducen estos síntomas. (Kalueff et al., 2014). También hay una amplia descripción acerca de su anatomía, evaluaciones del comportamiento *in vivo* y función neuronal (Burgess & Granato, 2007; Heap et al., 2018).

A lo largo de los años se han generado una gran cantidad de líneas mutantes, transgénicos, datos genómicos y bases de datos: (ZFIN, repositorio primario de la información de genética y genómica del pez cebra <http://www.zfin.org> anatomía, líneas genéticas, mapas y genes <http://zebrafish.uoregon.edu/>, mapas genéticos e información de microsatélites <http://zebrafish.mgh.harvard.edu/>, bibliotecas de cDNA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/Dr.Home.html>, atlas del cerebro www.zebrafishbrain.org, información de líneas transgénicas <http://phenome.jax.org/> y mutantes <http://www.informatics.jax.org/>). Además, su popularidad aumentó con el desarrollo simultáneo de técnicas con las que se pueden modificar eficazmente el DNA de los embriones recién fertilizados tales como Tol2 o CRISPR-Cas9.

Las principales ventajas de su uso en el laboratorio:

Los peces se reproducen fácilmente todo el año y se obtienen muchos embriones (100-200 por pareja). Los embriones tienen un desarrollo externo y rápido (una semana); durante los primeros días del desarrollo es transparente y se puede estudiar a través de un microscopio sin técnicas invasivas, llega a su etapa adulta a los 3 meses y a los 4 ya producen embriones y sus requerimientos son mínimos comparados con otros modelos: agua dulce a una temperatura de 28 °C, ciclos de luz y oscuridad 10:14 h, tanques con recirculación y oxigenación del agua, alimentación a base de algas y artemia (crustáceo marino), (Lawrence, 2011; Wixon, 2000).

Debido al rápido desarrollo del cerebelo (7 días) y la transparencia del pez, tomamos 3 edades clave durante el desarrollo (3, 5 y 7 dpf) para evaluar los cambios morfológicos, y para evaluar señales de calcio generamos un pez transgénico con un promotor glial que dirija la expresión de un indicador de calcio genéticamente codificado como los GCaMP, ya tienen múltiples ventajas: es una técnica menos invasiva que incluye áreas de registro amplias y se puede hacer registro *in vivo* (Kuhn et al., 2011; Liu et al., 2021; Matsui et al., 2014; Mu et al., 2019).

Sistema Tol2

El sistema Tol2 proviene de un transposón autónomo encontrado en el pez medaka (*Oryzias latipes*), este transposón codifica para una proteína llamada transposasa, la cual cataliza la transposición de una región del DNA hacia otra región del DNA. El Tol2 puede insertar secuencias largas de DNA (11 kilobases de DNA) sin decrecer su actividad. Por lo que se ha considerado como una herramienta muy útil en el campo de la biología molecular para generar transgénicos (pez cebra, *Xenopus*, pollos, ratones y células humanas); se inyectan concentraciones de un plásmido vector (que incluye un cassette con la región de DNA exógeno con sitios de reconocimiento de la transposasa) y la transposasa Tol2 en embriones recién fertilizados Figura 4 (Asakawa, 2009, 2009; Kawakami, 2007; Takeuchi et al., 2015).

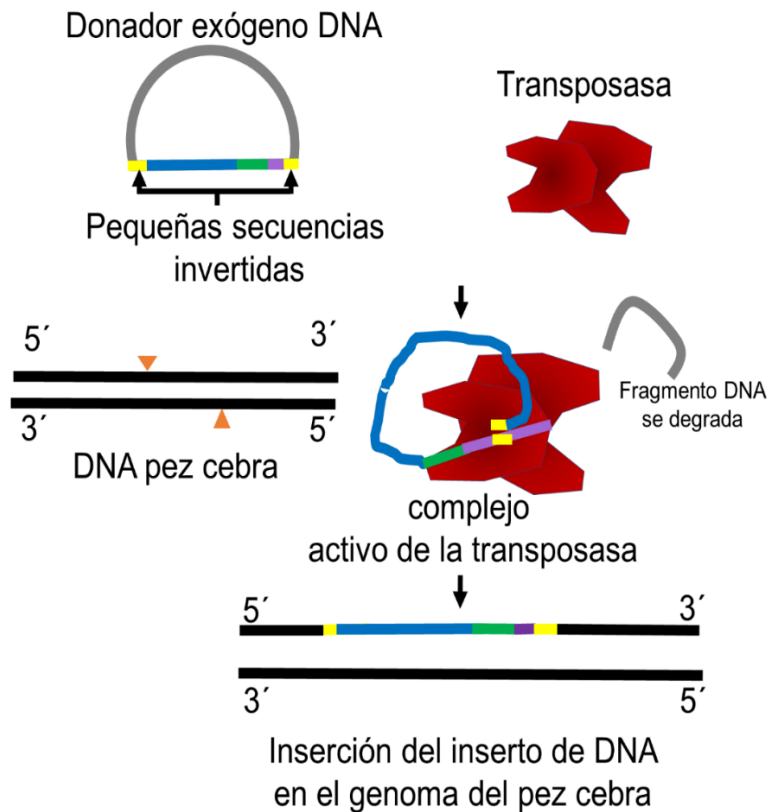


Figura 4 Sistema Tol2. En el esquema se muestra la recombinación heteróloga que se lleva a cabo mediante el sistema Tol2. La transposasa reconoce unas pequeñas secuencias invertidas (color amarillo) que se encuentran flanqueando el DNA exógeno. El complejo activo de la transposasa acarrea la secuencia flanqueada e inserta la secuencia en el DNA genómico de embriones recién fertilizados de pez cebra.

Sensores de calcio genéticamente codificados

Los genes que codifican para sensores de calcio (GECIs), están constituidos por el dominio de la calmodulina o de la troponina C que une calcio, por un péptido M-13 que permite un cambio conformacional tras la unión de calcio, lo que permite la emisión de la fluorescencia por la proteína verde fluorescente (EGFP). Estos sensores son altamente sensibles a distintas concentraciones de calcio intracelular y en la actualidad existen sensores que pueden localizarse selectivamente en células específicas o en regiones celulares concretas, lo que las hace herramientas muy útiles para realizar registros de calcio en modelos *in vivo* (Barykina et al., 2017;

T.-W. Chen et al., 2013). En pez cebra se ha utilizado para hacer registros de actividad neuronal ante distintos estímulos visuales y el uso del indicador de calcio permitió visualizar con alta precisión las neuronas involucradas en el procesamiento de la información (Heap et al., 2018); en estados de epilepsia se describió en el pez completo como se activan varias zonas del cerebro de manera asincrónica (Liu et al., 2021) y en astrocitos de la medula espinal, se describieron las características de la actividad espontánea de calcio y el efecto de la norepinefrina (J. Chen et al., 2020).

3. Justificación

La organización celular y la actividad de calcio en la glía radial del cerebelo del pez cebra aún no está descrita. La evidencia sugiere que tanto la citoarquitectura como la actividad de calcio será similar a la reportada en mamíferos. Sin embargo, comprender sus características y evolución a lo largo del desarrollo podría ayudar a elucidar las funciones de las células gliales durante estas etapas.

Actualmente, hay evidencia de que la glía radial del ratón produce ondas de calcio que aumentan durante la etapa de la neurogénesis y que podría ser una de las funciones de estas ondas durante las etapas del desarrollo. La glía radial del cerebelo de pez cebra se forma entre 2-3 días postfertilización, produce neuronas y células gliales, posteriormente permite la estratificación de las capas del cerebelo. Por lo que su rol es determinante en las etapas del desarrollo, sin embargo, no hay estudios acerca de estas células en etapas tempranas del desarrollo, en contraste con los amplios conocimientos acerca de lo que ocurre con las neuronas. En las últimas décadas, se propone una visión en la que se estudien los circuitos partiendo de un modelo funcional neurona-glía, en este estudio se propuso un estudio donde se evaluaron las características morfológicas de la glía radial y la aparición de la actividad de calcio como medida de su actividad. En el futuro, este trabajo permitirá dirigir preguntas más concretas que nos revelen más acerca de su función y su contribución en el funcionamiento general del cerebelo en condiciones normales o patológicas.

4. Hipótesis

La adquisición de complejidad morfológica de la glía radial está relacionada con la aparición de una actividad más compleja de calcio del cerebelo del pez cebra.

5. Objetivos

Objetivo General

Evaluar los cambios morfológicos y elucidar el origen ontogénico de la actividad espontánea de calcio en células de la glía radial del cerebelo de pez cebra.

Objetivos Específicos

1. Describir los cambios morfológicos que sufre la glía radial durante el desarrollo del cerebelo.
2. Generar un pez transgénico que exprese un indicador de calcio en la glía radial.
3. Describir las características de las señales de calcio de la glía radial en los primeros días postfertilización.

6. Materiales y Métodos

El proyecto se dividió en dos etapas. En la primera se realizó un análisis morfométrico de la glía radial del cerebelo a los 3, 5 y 7 dpf con el fin de determinar su posición y organización en estas etapas del desarrollo, en la segunda se determinó la actividad de calcio en la glía radial en estos mismos días del desarrollo. Para ello primero se utilizaron técnicas de biología molecular para generar un plásmido que porta un gen que codifica para un detector de la actividad de calcio (GCaMP6s) bajo el control del promotor del gen GFAP, después se produjo una línea transgénica que expresa GCaMP6s en la glía radial y finalmente se determinó la actividad de estas células por microscopía de epifluorescencia.

Cuidado y mantenimiento del pez cebra

Los peces adultos (*D. rerio*) de la línea TABWIK se mantuvieron a una temperatura de 28 °C con un ciclo (14:10 h) de luz-oscuridad. El cuidado de los peces y su alimentación se realizaron de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité Institucional de Ética del Instituto de Neurobiología UNAM (protocolo 95A aprobado en abril 2016) y basado en los protocolos descritos por Lawrence y Norton (Lawrence, 2011; Norton et al., 2019).

Análisis morfológico de la glía radial del cerebelo

Para determinar los cambios morfológicos de la glía radial en el cerebelo durante los primeros dpf se realizó inmunofluorescencia con el protocolo modificado de (Sheets et al., 2011). Para la preparación de los especímenes, se anestesiaron larvas de 3, 5 y 7 dpf con triclaína 1% (Sigma-Aldrich) durante 10 min. Después, las fijamos con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 4°C,

transferimos a un contenedor de vidrio y lavamos durante 5 min con buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7.4, después lavamos con agua destilada y permeabilizamos la membrana durante 5 min en acetona fría. Lavamos con buffer de fosfatos y agregamos solución de bloqueo (PBS con suero de cabra al 2%) e incubamos por 2 h a temperatura ambiente y lavamos 5 veces durante 10 min con PBS/BSA 1% a temperatura ambiente.

Para la inmunofluorescencia, se utilizó el anticuerpo primario anti-GFAP (1:250, #GTX128741 Gentex), el cual fue agregado e incubado durante 3 días a 4°C. Después las larvas fueron lavadas 7 veces durante 10 min con PBS a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario anti-conejo Alexa fluor 594 (1:500, #AB150080 Abcam) se adicionó y se incubo por 2 días a 4°C. Las larvas se lavaron 7 veces durante 10 min con PBS a temperatura ambiente. Para tinción nuclear se añadió DAPI (1:5000 #D1306 Thermo Fisher) y se incubo durante 1 h después se lavó 7 veces durante 10 min con PBS a temperatura ambiente. Las larvas se incubaron en soluciones al 25, 50, 75 y 100 % de glicerol (J. T. Baker) durante 20 min en cada una. Finalmente se guardaron a 4°C.

Obtención de imágenes por microscopía confocal

Para generar las imágenes de la glía radial del cerebelo completo, montamos en portaobjetos con agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Sigma-Aldrich) a las larvas en posición dorsal y tomamos imágenes con el microscopio Confocal Zeiss 780 LSM (con el objetivo Plan-Apochromat 1mm Korr DIC 25X, 0.8 N.A.). Los láseres utilizados fueron Argón A488, DPSS 561-10 y el camaleón Ultra-Ti:Sapphire 690-1064. Las imágenes se capturaron a 1024 por 1024 pixeles en plano z de 50-65 µm con intervalos de 1.3 µm.

Análisis morfológico

Las imágenes obtenidas en el plano z (50-65 μm de profundidad) desde la región caudal del encéfalo fueron procesadas utilizando el programa ImageJ/FIJI (versión 2.35) (Schindelin et al., 2012). Las regiones de interés del cerebelo fueron cortadas y la autofluorescencia que emite la piel se removió en cada capa aplicando la herramienta “Erase” de FIJI en cada plano z. Después la fluorescencia de las señales de GFAP (rojo) y DAPI (azul) se separan y se procesan independientemente. El ruido de la señal de fluorescencia de GFAP se sustrajo utilizando un filtro que promedia la señal por radio 60-70 píxeles y aplicando un contraste general donde se incrementa al 0.1% de píxeles saturados. El contraste local se amplificó con la función (CLAHE tamaño del bloque 150-200, inclinación: 2) y se utilizó un filtro (radio 1.0 máscara peso 6.0). En el caso de la señal de DAPI, solamente se utilizó un filtro. Para el análisis por región, los planos en z se dividieron en tres zonas (ventral, medial y dorsal) y cada una proyecta a un solo plano (modo máxima intensidad). Las reconstrucciones 3D se hicieron con los planos en z procesados y utilizando un visualizador 3D de FIJI.

Para determinar las características de la glía radial de acuerdo a la señal de GFAP utilizamos la herramienta “line” para dibujar y procesar a través de preprocesador de planos z con la herramienta “mano libre” para dibujar el soma. Siguiendo las células, cada elemento se procesó como región de interés con la herramienta ROI Manager de FIJI. El área total, número y tamaño de procesos se determinaron con la herramienta de medición de FIJI y los resultados se organizaron por dpf y por región del cerebelo (Kaslin & Brand, 2016).

Análisis estadístico de la morfología celular de la glía radial

La estadística descriptiva (media, desviación estándar (SD) y error estándar de la media (SEM)) de la morfología celular de los parámetros de larvas de 3, 5 y 7 dpf fue obtenida de N=5 larvas por edad. La diferencia entre los grupos se determinó por la prueba Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de comparación múltiple (post hoc Dunn's). Las diferencias entre las regiones del cerebro por edad fueron determinadas por la prueba de ANOVA de una cola seguida de una prueba de comparación múltiple (Tukey post hoc). Finalmente, las diferencias entre las regiones central y lateral a los 3 dpf fueron determinados por la prueba Mann-Whitney U. En todos los casos, nosotros utilizamos un nivel de significancia (alfa de 0.05); los resultados se reportaron como media \pm SEM, mientras que los valores de significancia de p se reportan como 0.10 (ns), 0.01*, 0.002**, >0.001***. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron elegidas en base al tipo de distribución de los datos, la variabilidad de homogeneidad y el número de muestras.

Biología molecular

Con la finalidad de generar una línea de peces transgénicos que exprese el indicador de calcio GCaMP6s en la glía radial se exploraron varios promotores que se predecía dirigirían la expresión a este tipo celular: *cnot4b* (reportado como específico de glía Bergmann (Takeuchi et al., 2015), la proteína 7 de unión a ácidos grasos del cerebro *fabp7b* y la proteína ácida fibrilar glial (gfap). Se obtuvieron los fragmentos por PCR y se clonaron el plásmido pJET2 (Figura A3), se decidió seguir adelante únicamente con el promotor gfap ya que en los ensayos preliminares mostró mejor eficiencia de expresión y a que este promotor ya fue probado (Johnson et al., 2016; Leung et al., 2019).

Para la construcción del plásmido de expresión se sustituyó el promotor elavl3 del plásmido pTol2-elavl3-GCaMP6s (Addgene plásmido #59531) por el

promotor de gfap obtenido por PCR a partir del plásmido p5E-gfap (Addgene plásmido #75024) (Figura 5). La identidad del nuevo plásmido fue corroborada por análisis con enzimas de restricción y determinación de la secuencia del promotor gfap.

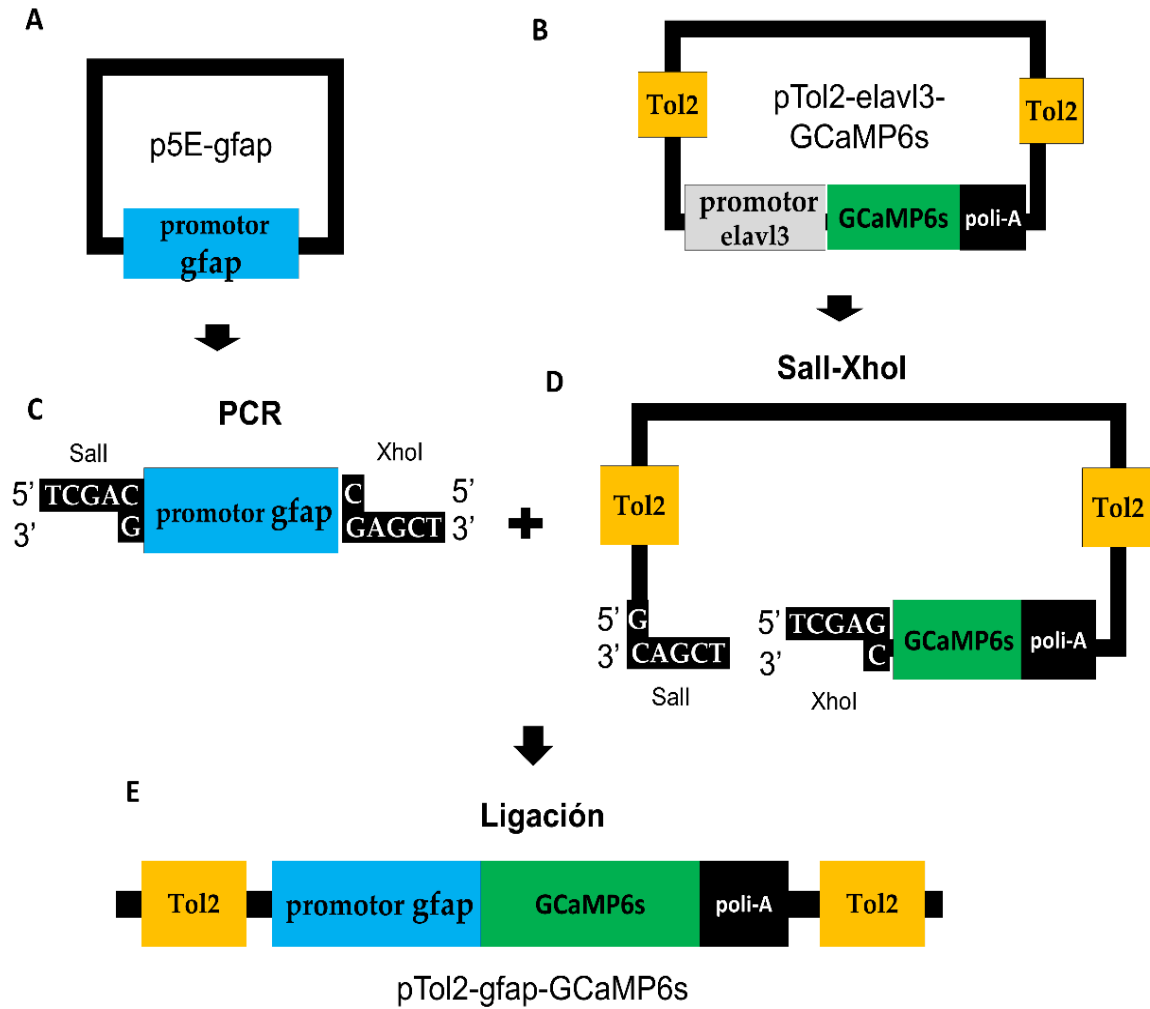


Figura 5. Estrategia de clonación. (A) El plásmido p5E-gfap porta el promotor gfap de pez cebra, este fue amplificado por PCR y se añadió en el extremo 5' el sitio Sall y en el 3' el sitio XhoI, (B) por otro lado el plásmido pTol2-elavl3-GCaMP6s codifica para GCaMP6s bajo el promotor elavl3 y está flanqueado por los sitios de reconocimiento de la transposasa Tol2. (D) El promotor elavl3 fue removido mediante el corte con las enzimas Sall y XhoI y (E) sustituido por el promotor gfap.

Generación de una línea transgénica que expresa GCaMP6s en glía radial

La técnica consiste en inyectar en la etapa de una célula una mezcla del nuevo plásmido (pTol2-gfap-GCaMP6s) (Figura A2) con RNAm de la transposasa Tol2. Esta estrategia permitió la inserción en el genoma del cassette de expresión gfap-GCaMP6s mediado por la actividad de la enzima Tol2. Para esto, se utilizó el plásmido pCS2FA-transposase (#133032 Addgene) como molde para la producción del RNAm de Tol2. Este plásmido porta el gen de Tol2 bajo el control del promotor del fago SP6. Primero se linearizó el plásmido con la enzima NcoI, después se sintetizó el RNAm utilizando el kit Message mMachine SP6 (ThermoFisherScientific) siguiendo las especificaciones del fabricante, posteriormente se precipitó el RNA con LiCl (3 M), se lavó con etanol 75% y finalmente se resuspendió en agua DEPC. Para la mezcla de microinyección: se utilizaron 25 pg de RNAm de Tol2, 35 pg de pTol2-gfap-GCaMP6s, 1 µL de rojo fenol y KCl 0.5 M preparados con agua DEPC en un volumen de 10 µL (Kawakami, 2007).

Para la obtención de embriones, se cruzaron peces adultos (TAB/WIK) y se colectaron los huevos fertilizados en medio E3 (Buffer Tris pH 7) en etapa de una célula, se alinearon los embriones en una placa de agarosa al 2% y se inyectó 0.5-1 nL a cada embrión con la mezcla de inyección. Después de 24 h se identificaron y seleccionaron los embriones que expresaban el indicador de calcio por microscopía de epifluorescencia con luz monocromática azul ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Los embriones positivos fueron cuidados por 3-4 meses. Los adultos fueron cruzados para obtener las líneas F1, F2 y F3 las cuales fueron confirmadas y seleccionadas por epifluorescencia y genotipificados por PCR (gen=GCaMP6s, oligonucleótidos: sentido 5'-3' CTCGAGAACGTCTATATCAAGGCCG y antisentido 5'-3' TCACTTCGCTGTCATCATTTGTACA producto=1200 pb).

Actividad de calcio *in vivo*.

La línea transgénica (gfap-GCaMP6s) se utilizó para realizar los registros de imagen de calcio. Para esto, peces adultos fueron cruzados y se colectaron los embriones en medio E3 (pH 7.4). La pigmentación se inhibió añadiendo 75 μm de fenil-urea (Sigma-Aldrich) a las 6 h postfertilización (Matsui et al., 2014; Takeuchi et al., 2015). Las larvas fueron paralizadas con 0.5 mM de tubocurarina (Sigma-Aldrich) a los 3 dpf, o 2 mM de tubocurarina a los 5 y 7 dpf durante 10-15 min (Miyazawa et al., 2018; Parrock et al., 2013). Para la imagen de calcio las larvas se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 2% a 35°C en un portaobjetos cóncavo con 100 μL en medio E3 con tubocurarina (Kaufmann et al., 2012; Weber et al., 2014).

Para la imagen de calcio *in vivo*, se utilizó un microscopio Olympus BX51W con un objetivo de inmersión en agua 20X, 0.8 NA Acoplado al LED X-Cite XLED1 (Excelitas Technologies) con una longitud de onda de 465 nm al 6% de poder. Los peces se adaptaron durante 20 min antes de iniciar los registros y durante el registro permanecieron a 26°C en oscuridad. Los videos fueron adquiridos a 2.55 Hz y a 4 Hz con una cámara de alta resolución pco.edge 4.2, acoplada al programa Micromanager. Se realizaron registros de dos campos: campo 1: correspondiente a la parte más dorsal del cerebelo, donde se localizan el CCe, EG y LCa. Campo 2: correspondiente a la parte ventral, donde encontramos la Va y la EG.

Bloqueo farmacológico de uniones comunicantes *in vivo*

Con el fin de determinar si las uniones comunicantes juegan un papel en la actividad endógena de calcio en el cerebelo en desarrollo se utilizó una estrategia de bloqueo farmacológico. Primero, las larvas (N=6) de 5 dpf se montaron en agarosa de bajo punto de fusión (2%), después se agregó una solución de 500 μM de heptanol y se incubó durante 30 minutos, posteriormente se adquirieron

imágenes a 2.55 Hz durante 19.5 min en oscuridad a una temperatura de 26°C. Al terminar los registros, las larvas se regresaron a la pecera y se monitoreo el ritmo cardiaco y el flujo sanguíneo durante 1 h; aquellos peces que no mostraron actividad se excluyeron del análisis.

Análisis y estadística de la imagen de calcio

Se utilizó el programa ImageJ/FIJI para remover el ruido de la imagen (promedio circular de radio de 12 pixeles), para corregir el movimiento durante el registro se utilizó el programa de Turboreg (cuerpo rígido). Los cambios en la fluorescencia de los somas y los procesos se detectaron de forma automática con el programa: análisis cuantitativo de astrocitos (AQuA) (<https://github.com/yu-lab-vt/AQuA>, acceso Junio 2021)(J. Chen et al., 2020). En Matlab (versión R2020a) se realizaron los códigos utilizados para el análisis. Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia alfa=0.05, seguida de una comparación múltiple de las medias con los valores de significancia de $p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$ y $< 0.0001^{***}$. La diferencia entre el control y el bloqueo con heptanol se determinó con la prueba Mann-Whitney U con un nivel de significancia alfa=0.05, los valores de significancia de $p < 0.0001^{***}$ y $< 0.00001^{****}$. Para cada parámetro, se reportó el promedio y el SEM (Tablas suplementarias A2-A4). El número de larvas analizadas por edad y por cada campo (campo 1 y campo 2 a 4 Hz durante 4.16 min) fue de N=6. El número de larvas por edad en el campo 1 a 2.55 Hz durante 19.5 min N=6. El número de larvas para el bloqueo de heptanol es de N=6 en el campo 1 a 2.55 Hz durante 19.5 min.

7. Resultados

Distribución de la glía radial en el cerebelo durante el desarrollo

Se evaluaron los cambios estructurales de las regiones que conforman el cerebelo y los cambios morfológicos de la glía radial del pez cebra a los 3, 5 y 7 dpf. Para el análisis, se dividió el cerebelo en tres secciones: dorsal, medial y ventral (Figura 6 y Figura A1) y la glía radial se visualizó en secciones ópticas por microscopia confocal (N=5 por edad).

A los 3 días postfertilización encontramos que el cerebelo muestra solamente una región, llamada válvula (Va), en donde la mayoría de las células de la glía radial se alinean verticalmente a lo largo del eje anteroposterior y están distribuidas de manera uniforme (Figura 6B). Los somas de la glía radial aparecen cerca de la parte posterior (dorsal) del cerebelo, y sus pies terminales proyectan hacia la parte anterior y ventral, donde forman la capa anterior de la válvula. A esta edad la zona ventricular (vz) del cerebelo es amplia, y forma la sección dorsal del cerebelo. Se detectaron células polarizadas de la línea media dorsal en el cerebelo y en el labio rómbico cerebeloso, que es una de las zonas germinales del cerebelo (Gruol et al., 2016).

En contraste a los 5 y 7 dpf el cuerpo del cerebelo tiene tres capas de células y una folia, es decir, la estructura que se va a conservar hasta la edad adulta. En estas edades se encontraron todas las regiones del cerebelo: la válvula (Va) que forma la parte más ventral del cerebelo, el cuerpo (CCe) que forma la folia del cerebelo, la eminencia granularis (EG) y el lóbulo caudal (LCa) que se encuentran hacia los lados y en la parte más caudal del cerebelo.

En la Va, la glía radial se localiza a lo largo del eje horizontal formando el piso del cuarto ventrículo y los densos procesos se alinean en la línea media cerrando la cavidad (Figura 6B). En la parte dorsal medial de la sección de la glía radial los somas fueron localizados a lo largo de la línea media y proyectan sus procesos hacia la sección lateral, formando la región caudal de la válvula (Figura 6B).

En CCe, la glía radial se alinea a lo largo del eje medial-lateral. Los somas están en la región dorsal del CCe y giran y proyectan a través de la región ventral de la EG, los somas de la glía radial están situados en la región medial y muestran un solo proceso grueso.

En LCa, la glía radial es homogénea con somas localizados en la región central y los procesos proyectan ventralmente (Figura 6B). En la Figura 1A podemos observar una reconstrucción de células gliales (GFAP⁺-rojo) y los núcleos (DAPI-azul) en el cerebelo.

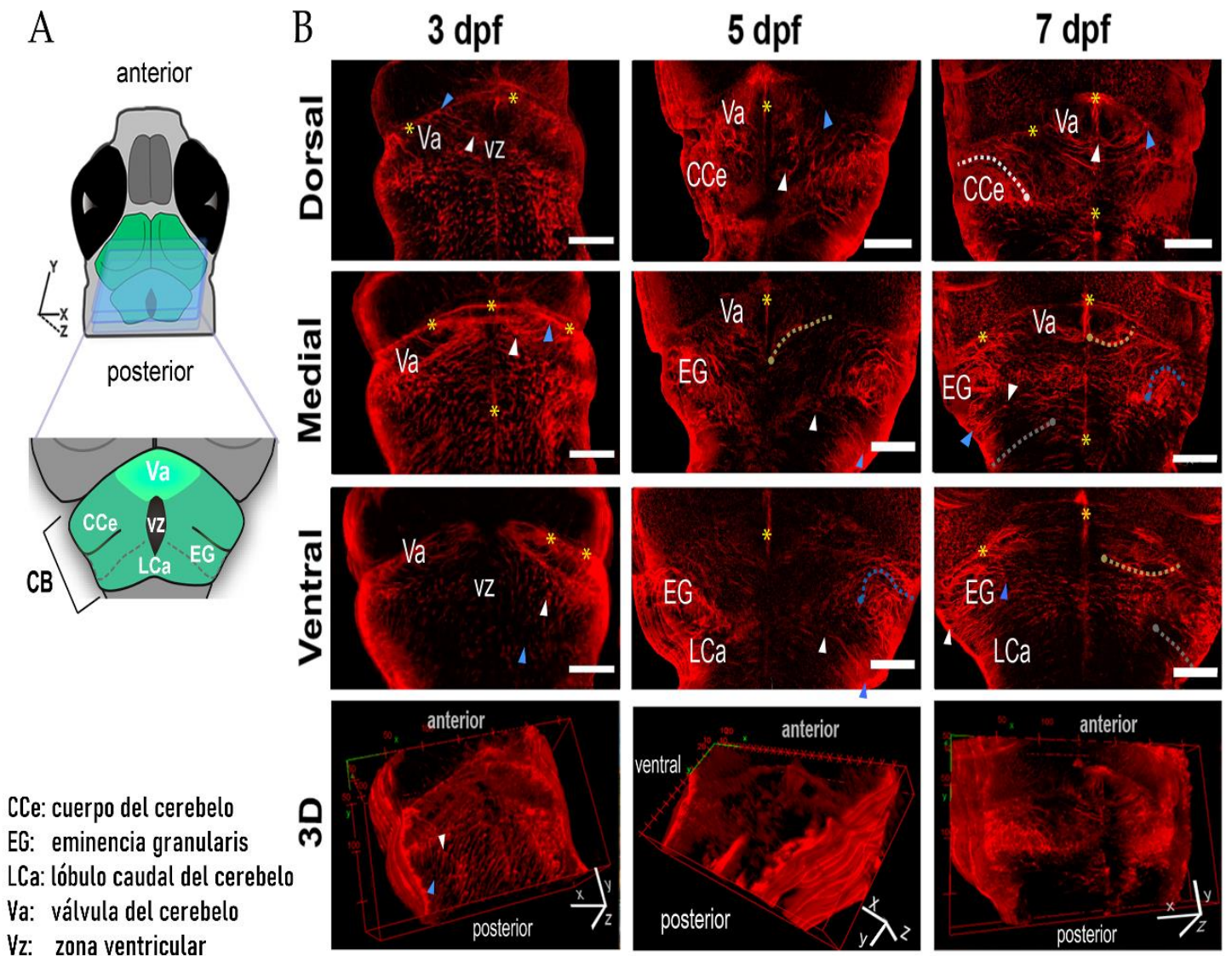


Figura 6. Glía radial durante el desarrollo del pez cebra. **(A)** El esquema muestra las regiones del cerebelo del pez cebra, y la posición en que fueron adquiridas las imágenes que están al lado derecho. **(B)** Imágenes representativas de secciones ópticas del cerebelo de células GFAP positivas; la glía radial está representada en cada edad en tres zonas: dorsal, medial y ventral. Los paneles inferiores muestran reconstrucciones en 3D correspondientes. En cada plano, se indica la localización del soma (flecha blanca) y su pie terminal (flecha azul). Los asteriscos amarillos indican la línea media donde los pies terminales forman un continuo de la Va y el CCe. Las líneas punteadas indican la trayectoria del proceso de cada glía radial. La posición del soma está indicada por un punto del mismo color: Va, línea punteada amarilla, CCe, línea punteada blanca, EG, línea punteada azul, LCa, línea punteada gris; dpf días postfertilización; escala de barras 50 μm.

Análisis morfométrico de la glía radial durante el desarrollo.

Células individuales de cada región del cerebelo en desarrollo fueron analizadas para determinar su morfología basada en la distribución de GFAP (n=64-70 células por grupo, N=5 larvas por edad). Para clasificar las diferencias morfológicas, determinamos el número de procesos por cada célula, la longitud de cada proceso y el área del soma. El cerebelo se dividió en dos regiones para analizar la etapa de 3 dpf (lateral y central). De los 5 y 7 dpf dividimos el cerebelo en cuatro regiones Va, CCe, EG y LCa para hacer la descripción de la distribución de la glía radial.

En la Figura 7A se muestran imágenes representativas de las morfologías encontradas en cada edad del desarrollo analizada. La glía radial del cerebelo a los 3 dpf tiene 2.16 ± 0.12 procesos con una longitud de $17.89 \pm 0.97 \mu\text{m}$ y un área del soma de $23.28 \pm 1.19 \mu\text{m}^2$. A los 5 dpf 1.48 ± 0.09 procesos con una longitud de $59.53 \pm 2.17 \mu\text{m}$ y un área del soma de $34.87 \pm 2.27 \mu\text{m}^2$ y a los 7 dpf 3.99 ± 0.31 procesos con una longitud de $34.37 \pm 1.56 \mu\text{m}$ y un área del soma de $31.13 \pm 1.90 \mu\text{m}^2$ (Tabla 1). Encontramos una marcada variabilidad entre edades en el número de procesos, longitud del proceso y el área del soma (Tabla 1, Figura 7C). Se observó que hay un rápido incremento en el área de los somas y la longitud de los procesos entre los 3 dpf (soma $17.89 \pm 0.97 \mu\text{m}^2$; longitud proceso $23.28 \pm 1.19 \mu\text{m}$) y los 5 dpf (soma $59.53 \pm 2.17 \mu\text{m}^2$; longitud del proceso $34.87 \pm 2.27 \mu\text{m}$ $p < 0.001^{***}$, en ambos) seguido de una reducción significativa de los procesos a los 7 dpf (longitud del proceso $31.13 \pm 1.90 \mu\text{m}$). También observamos que el área del soma se redujo a los 7 dpf ($34.37 \pm 1.56 \mu\text{m}^2$) comparado con 5 dpf ($59.53 \pm 2.17 \mu\text{m}^2$). El número de procesos por glía radial decrece desde un promedio de $2.16 \pm 0.12 \mu\text{m}$ a los 3 dpf a $1.48 \pm 0.04 \mu\text{m}$ a 5 dpf ($p < 0.007^{**}$) y después aumenta $3.99 \pm 0.31 \mu\text{m}$ a los 7 dpf ($p < 0.001^{***}$). El aumento en el área del soma y la longitud del proceso de 3 dpf a los 5 dpf puede deberse un alargamiento extra para permitir la formación de la folia y la correcta migración de las células neuronales. Posteriormente los cambios que observamos de 5 a 7 dpf pueden deberse a la poda sináptica y a la maduración de las células gliales para pasar a ser glía de Bergmann, disminuye el tamaño, pero

aumenta el grosor de los procesos para recubrir las sinapsis y la formación de los pies cónicos que se asocian con los vasos sanguíneos para formar la barrera hematoencefálica.

La comparación entre las morfologías promedio de las diferentes regiones del cerebelo en cada edad analizada no mostraron diferencias significativas en la mayoría de los casos (los resultados estadísticos se muestran en la Tabla A1), indicando poca variabilidad en la morfología entre las distintas regiones analizadas (Tabla 2, Figura 7B). Sin embargo, encontramos algunas excepciones a los 3 dpf, el área del soma fue mayor en la zona lateral que en la zona central ($21 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ vs $26 \pm 2.0 \mu\text{m}^2$ respectivamente), y, a los 5 dpf los procesos son más largos en el lóbulo caudal (LCa) que en la válvula del cerebelo (Va) ($67.7 \pm 4.7 \mu\text{m}$ vs $52.3 \pm 2.2 \mu\text{m}$).

Tabla 1. Características morfométricas de la glía radial

Edad	Número de procesos	Longitud del proceso (μm)	Área del soma (μm^2)
3 dpf	2.16 ± 0.12	17.89 ± 0.97	23.28 ± 1.19
5 dpf	1.48 ± 0.09	59.53 ± 2.17	34.87 ± 2.27
7 dpf	3.99 ± 0.31	34.37 ± 1.56	31.13 ± 1.90

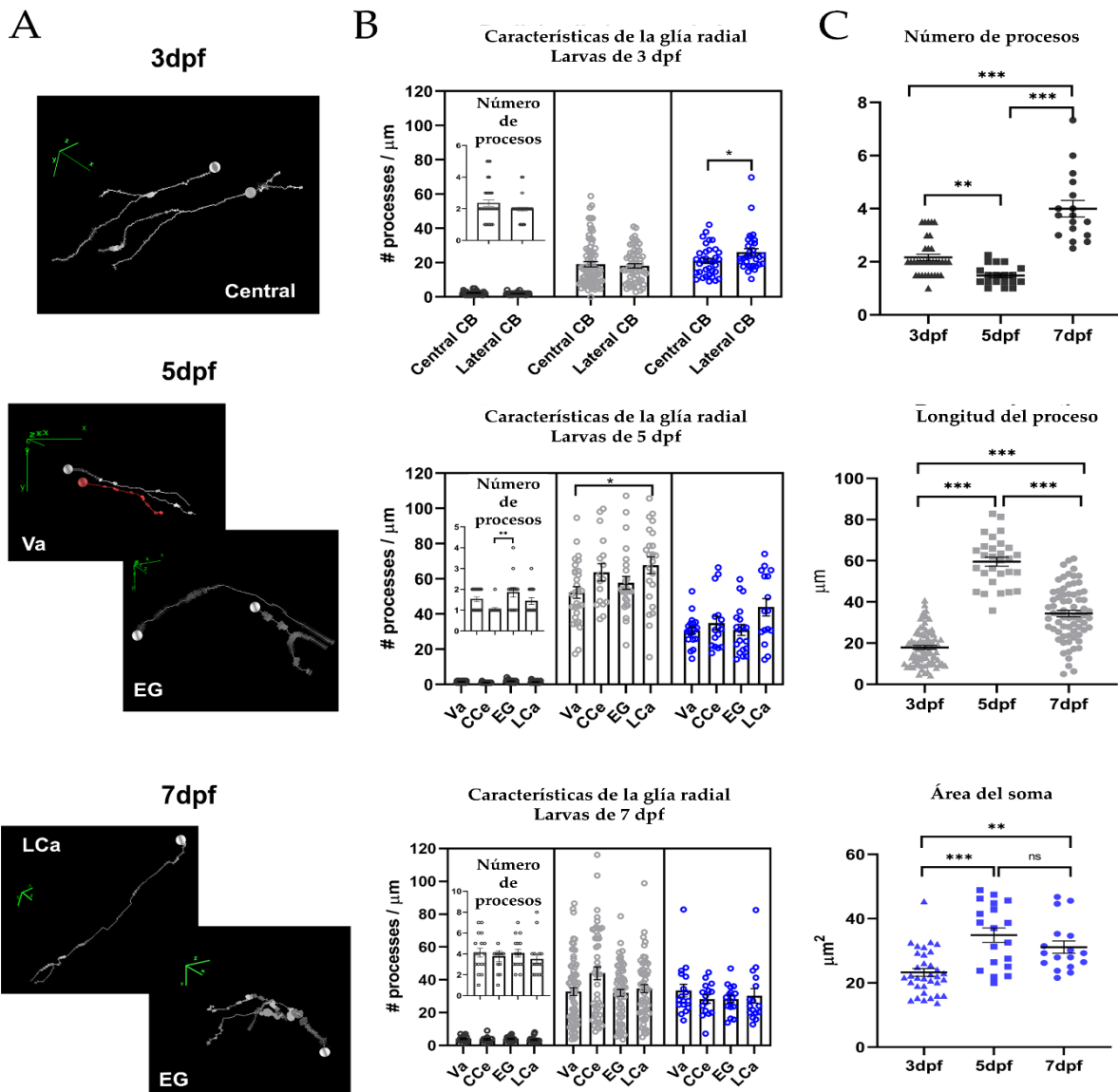


Figura 7. Características morfométricas de la glía radial del cerebelo durante el desarrollo. **(A)** Reconstrucciones en 3D representativas de la glía radial seleccionadas al azar de diferentes regiones del cerebelo a los 3, 5 y 7 días postfertilización. En esta representación el núcleo está indicado por una esfera, el proceso en línea blanca o roja. La orientación del eje (x, y, z) se muestra en líneas verdes. **(B)** Los gráficos muestran el número de procesos (puntos negros), la longitud de los procesos (puntos grises) y área del soma (puntos azules) en las diferentes regiones del cerebelo a los 3, 5 y 7 dpf (Va, CCe, EG, y LCa; N= 5-7 larvas por edad). Para simplificar el resultado, solo se muestran las diferencias estadísticamente significativas; los somas a los 3 días lateral y central, prueba Mann-Whitney-U ($p0.049^*$, $\alpha=0.05$), la longitud del proceso 5 días ANOVA-Tukey ($p 0.03^*$, $\alpha=0.05$). **(C)** Comparación de las características de la glía radial de todo el cerebelo entre edades (prueba Kruskal-Wallis, Dunn's post-hoc, $\alpha 0.05$, $p<0.05^*$, 0.01^{**} , 0.001^{***}), los gráficos muestran el promedio \pm error estándar (referir a Tabla 2 para estadística descriptiva de los datos).

Tabla 2. Análisis morfométrico de la glía radial por regiones

Edad	Número de procesos		Longitud del proceso (μm)		Área del soma (μm^2)	
	Lateral	Central	Lateral	Central	Lateral	Central
3 dpf	2.35 \pm 0.20	1.97 \pm 0.12	19.10 \pm 1.50	18.10 \pm 1.24	21.00 \pm 1.51	26.20 \pm 2.03
	Va	CCe	Va	CCe	Va	CCe
5 dpf	1.50 \pm 0.12	1.10 \pm 0.06	52.20 \pm 3.30	63.60 \pm 4.90	21.20 \pm 3.00	22.70 \pm 4.10
	EG	LCa	EG	LCa	EG	LCa
7 dpf	1.90 \pm 0.23	1.40 \pm 0.16	57.70 \pm 3.70	67.70 \pm 4.70	21.70 \pm 3.40	28.90 \pm 5.20
	Va	CCe	Va	CCe	Va	CCe
7 dpf	4.12 \pm 0.43	3.77 \pm 0.53	32.90 \pm 2.40	44.10 \pm 3.90	33.50 \pm 3.80	28.40 \pm 2.60
	EG	LCa	EG	LCa	EG	LCa
	4.06 \pm 0.37	3.50 \pm 0.44	32.10 \pm 2.10	34.70 \pm 2.50	28.40 \pm 2.20	30.30 \pm 4.40

Obtención de la línea transgénica *Tg gfap::GCaMP6s*

Se inició el trabajo experimental para la obtención de peces transgénicos (pTol2-gfap-GCaMP6s) con la generación de un plásmido que incluye con el promotor de gfap y el detector de calcio GCaMP6s. La Figura 8A muestra la amplificación por PCR del fragmento del promotor gfap y una representación esquemática del plásmido pTol2-GFAP-GCaMP6s (Figura A2) junto a un gel de agarosa del mismo plásmido.

Después se utilizó la técnica de transgénesis con Tol2 en embriones recién fertilizados para insertar el cassette GFAP-GCaMP6s en peces silvestres (Figura 8B). Estos peces se seleccionaron si emitían fluorescencia uniforme a lo largo del sistema nervioso y por amplificación por PCR del fragmento GCaMP6s en la descendencia F1, F2 y F3 (Figura 8C).

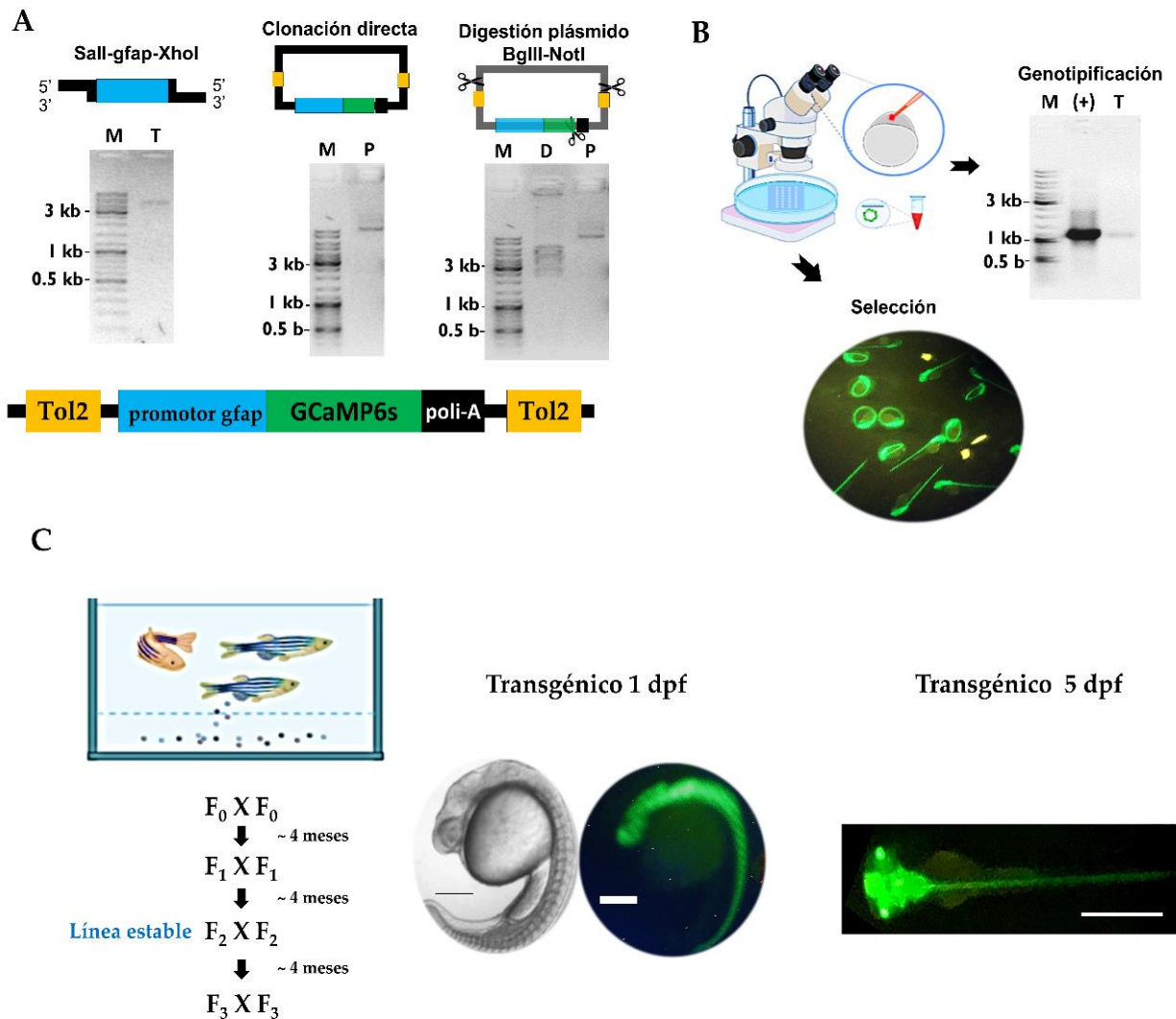


Figura 8. Obtención de línea transgénica con expresión del sensor de calcio en glía. (A) Generación del plásmido pTol2-gfap-GCaMP6s. Izquierda: esquema del promotor gfap con sitios de restricción e imagen de su amplificación por PCR (7.3 kb). Centro: esquema del plásmido pTol2-gfap-GCaMP6s e imagen del plásmido completo (12.6 kb). Izquierda: esquema e imagen de caracterización del plásmido con las enzimas de restricción BglII/NotI (5.78, 4.26, 1.99 kb y 0.57 kb). Abajo-centro: mapa funcional del plásmido que incluye el cassette de expresión gfap-GCaMP6s flanqueado por los sitios de reconocimiento de la transposasa Tol2. (B) 1) esquema de microinyección, 2) selección de peces con fluorescencia y 3) genotipificación por PCR (fragmento de 1.2 kb). (C) Izquierda: esquema de cruces para la obtención de la línea estable. Derecha: imagen de epifluorescencia de peces transgénicos a 1 dpf y 5 dpf (vista lateral y dorsal respectivamente). M: marcador de peso molecular, T: producto de PCR, kb: kilobases, P: plásmido completo, D: digestión, (+) control positivo (producto de PCR del plásmido GCaMP6s), dpf = días postfertilización, escala de barras 500 μ m y 1 mm.

Actividad de calcio en la glía radial durante el desarrollo

Después de que establecimos que la glía radial incrementa en su complejidad morfológica durante los primeros días del desarrollo, evaluamos la actividad de calcio en este periodo.

Para realizar los registros de la actividad, utilizamos larvas paralizadas con tubocurarina (Drapeau et al., 1999; Zdebik et al., 2013) embebidas en agarosa y se obtuvieron imágenes del cerebelo en dos campos: campo 1: correspondiente a la parte más dorsal del cerebelo, donde se localizan el CCe, EG y LCa. Campo 2: correspondiente a la parte ventral, donde encontramos la Va y la EG.

A los 3 dpf solo el CCe y la Va son evidentes (Figura 9 A,B). Por lo que nuestros registros son efectivos para detectar la actividad basal en todo el cerebelo a esta edad. Las regiones de interés fueron detectadas con el programa de cuantificación y análisis de astrocitos (AQuA), y los somas y los procesos de la glía radial se cubren con una máscara de color al azar (Figura 9C).

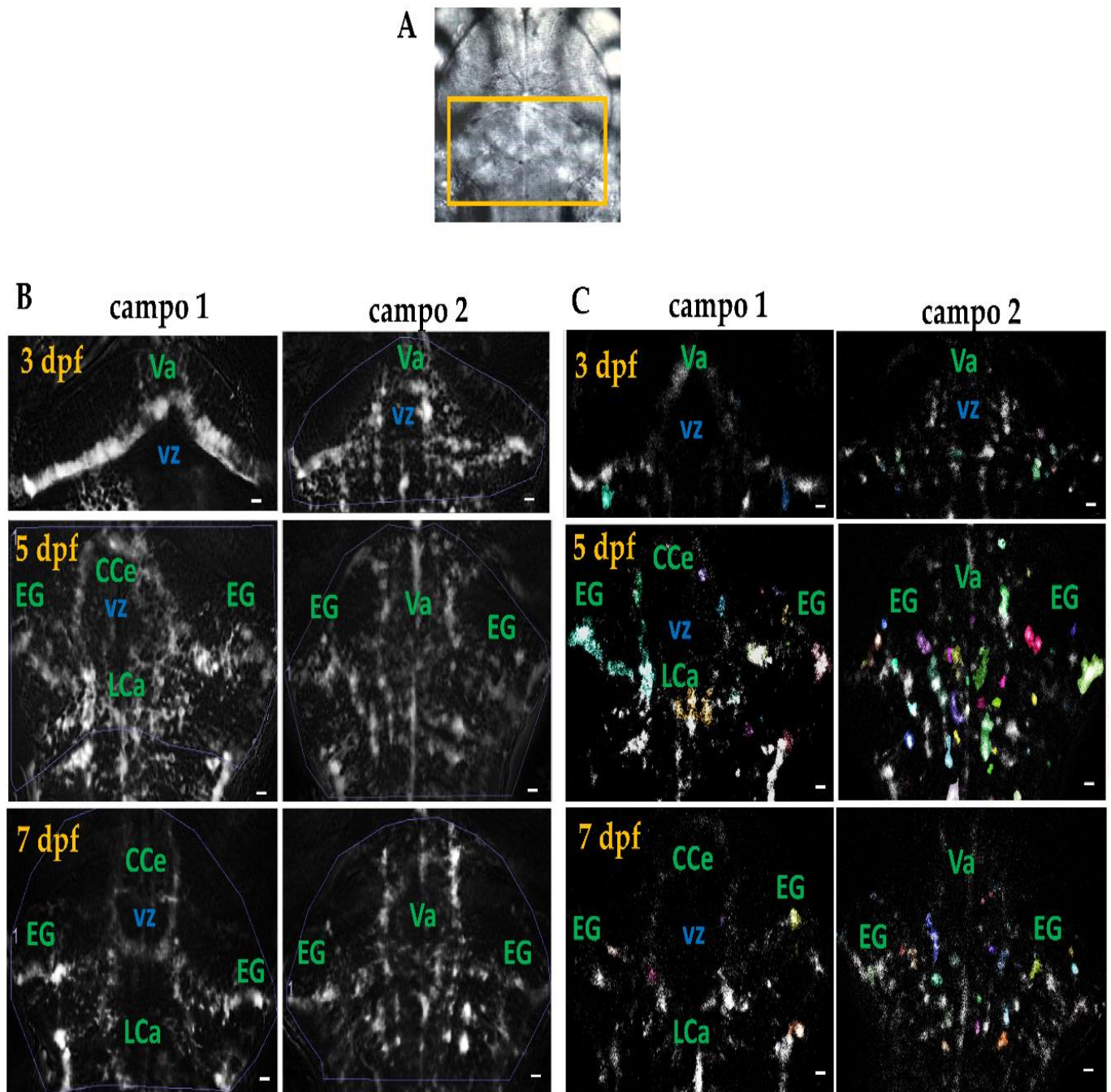


Figura 9. Campos en donde se registró la actividad de calcio. **(A)** Imagen en campo claro de una larva en posición dorsal (el cuadro amarillo señala la región del cerebelo). **(B)** Proyección de la imagen de los registros de la glía radial-GCaMP6s (los colores blanco y gris son las células y procesos en el campo de registro correspondiente) a las edades 3, 5 y 7 dpf del campo 1 (región dorsal CCe, EG y LCa) y campo 2 (región ventral CCe y Va). **(C)** Glía radial con actividad de calcio (máscara multicolor). CCe: cuerpo del cerebelo, EG: eminencia granularis, Va: válvula del cerebelo, LCa: lóbulo caudal del cerebelo, dpf: días postfertilización.

En la figura 10A aparecen imágenes con ejemplos de la fluorescencia de la actividad basal durante el periodo de registro (4.16 min) en el campo 1 y 2 a los 5 dpf. La mayoría de los cambios de actividad fueron detectados en las somas de las células (línea punteada blanca), aunque también en los procesos se detectó actividad (flechas rojas). Los cambios de fluorescencia a través del tiempo ($\Delta F/F_0$) se obtuvieron a partir de registros de imagen (Figura 10 A,B) y comparaciones múltiples entre los grupos.

Primero, se observó que a los 3 dpf el número de eventos de calcio en los campos 1 y 2 fue significativamente diferente ($7.4 \pm 0.36/4$ min vs $5.50 \pm 0.23/4$ min $p < 0.001^{***}$), a los 5 dpf no hay diferencias entre el número de eventos en los campos 1 y 2 ($6.15 \pm 0.21/4$ min vs $6.79 \pm 0.13/4$ min), y a los 7 dpf el número de eventos fue significativamente diferente entre los campos 1 y 2 ($8.4 \pm 0.26/4$ min vs $7.29 \pm 0.21/4$ min $p < 0.05^*$, Figura 11A).

Al realizar la comparación de los eventos de calcio por edad se encontró un incremento en el número de eventos a partir de 5 dpf en el campo 2 pero no en el campo 1 (campo 1: 3 dpf $7.4 \pm 0.36/4$ min vs 5 dpf $6.15 \pm 0.21/4$ min $p < 0.05^*$ vs 7 dpf $8.43 \pm 0.26/4$ min $p = 0.05$ ns), y campo 2 (3 dpf $5.50 \pm 0.23/4$ min vs 5 dpf $6.79 \pm 0.13/4$ min vs 7 dpf $7.29 \pm 0.21/4$ min $p < 0.001^{***}$, (Figura 10C, Tabla 3).

Enseguida se calcularon los cambios de la amplitud de los eventos, la duración y la cinética de liberación de los eventos de calcio. Encontrando que, en el campo 1, la amplitud fue mayor a los 5 ($1.65 \pm 0.04 \Delta F/F_0$) y 7 dpf ($1.48 \pm 0.03 \Delta F/F_0$) que a los 3 dpf ($1.34 \pm 0.06 \Delta F/F_0$ $p < 0.05^*$ y $< 0.001^{**}$, Figura 11B), mientras en el campo 2, la amplitud permanece constante a los 3 dpf ($1.77 \pm 0.04 \Delta F/F_0$), 5 dpf ($1.83 \pm 0.02 \Delta F/F_0$), 7 dpf ($1.73 \pm 0.02 \Delta F/F_0$, Figura 10D, Tabla 3).

La duración de los eventos de calcio fue mayor en el campo 2 que en el campo 1 a los 3 dpf (campo1: 6.94 ± 0.47 s vs campo2: 10.46 ± 0.46 s $p < 0.001^{***}$), sin embargo, las duraciones fueron similares entre ambos campos a los 5 dpf (campo1: 11.38 ± 0.43 s vs campo2: 11.25 ± 0.24 s) y a los 7 dpf (campo 1: 9.27 ± 0.35 s vs campo 2: 9.96 ± 0.24 s $p > 0.05$ ns, Figura 11C). Cuando analizamos la duración de los eventos observamos un incremento de 3 a 5 dpf, seguida por una reducción a los 7 dpf (campo 1: 3 dpf 6.94 ± 0.47 s, 5 dpf 11.38 ± 0.43 s y 7 dpf 9.27 ± 0.35 s $p < 0.001^{***}$, Figura 10E, Tabla 3).

Al evaluar el tiempo de la cinética de liberación de los eventos de calcio. No se registran diferencias significativas entre campos a los 3 dpf (2.64 ± 0.19 s vs 3.05 ± 0.15 s Figura 11D). Al comparar entre edades, la cinética fue más rápida en el campo 1 a los 3 dpf (2.64 ± 0.19 s) comparada con 5 dpf (4.11 ± 0.18 s $p < 0.001^{***}$) y 7 dpf (3.40 ± 0.15 s $p < 0.05^*$). En contraste, no encontramos diferencias en el tiempo de liberación en el campo 2 (3 dpf 3.05 ± 0.15 s, 5 dpf 3.38 ± 0.08 s y 7 dpf 3.38 ± 0.11 s; Figura 10F, tabla 3).

Finalmente, para entender cómo la dinámica oscilatoria cambia durante el desarrollo, se analizaron las interacciones entre el número de eventos de calcio simultáneos en el campo 1 y el campo 2 a las edades de 3, 5 y 7 dpf (Figura 11E). A los 3 dpf hay pocos eventos sincronizados durante el tiempo de registro (3-6 eventos en promedio en el campo 1 y 2 respectivamente). Que ocurren entre 1-2 pares de células de la glía radial en el campo 1, y alrededor de 3-4 células de la glía radial en el campo 2. A los 5 dpf, la sincronización de los eventos fue más frecuente en el campo 1, los cuales mostraron un promedio de 10 eventos con 2-10 células de la glía radial, mientras que en el campo 2 mostraron un pico de 18 eventos con 20 células de la glía radial sincronizada. A los 7 dpf, las células de la glía radial fueron similares a las de 5 dpf. En el campo 1 el pico de actividad sincronizada consistía en 20 eventos en los cuales 16 células de la glía estuvieron sincronizadas, en el campo 2 el pico de actividad sincronizada fue de 10 eventos en los cuales 20 células estuvieron sincronizadas (Figura 10G, Tabla 3). Estos datos indican que los

eventos de calcio y su sincronización para formar redes funcionales tienen correlación con el desarrollo morfológico y la complejidad de la glía radial (la Tabla A2, muestra los datos estadísticos de la Figura 10).

Observamos que a los 5 y 7 dpf el número de eventos de calcio, la duración y amplitud aumentan, la cinética del evento es más rápida a estas edades y encontramos un mayor número de eventos sincronizados con respecto a los 3 dpf. Adicionalmente los campos 1 y 2 (áreas de registro del cerebelo a diferente profundidad) también mostraron cambios significativos en los parámetros mencionados. Esto podría deberse a que dependiendo de la región hay características diferentes de dinámica de calcio.

Tabla 3. Señales de calcio de la glía radial durante el desarrollo.

Característica	3 dpf		5 dpf		7 dpf		Unidad
	campo 1	campo 2	campo 1	campo 2	campo 1	campo 2	
Número de eventos	7.44±0.36	5.50±0.21	6.15±0.21	6.79±0.13	8.43±0.26	7.29±0.21	#/4 min
Amplitud	1.34±0.06	1.77±0.04	1.65±0.04	1.83±0.02	1.48±0.03	1.73±0.02	$\Delta F/F_0$
Duración	6.94±0.47	10.46±0.46	11.38±0.43	11.25±0.24	9.27±0.35	9.96±0.24	s
Cinética de liberación	2.64±0.19	3.05±0.15	4.11±0.18	3.38±0.08	3.40±0.15	3.38±0.11	s
Sincronía	3.02±0.11	6.23±0.23	10.30±0.23	12.98±0.25	10.95±0.20	10.69±0.28	#/4 min

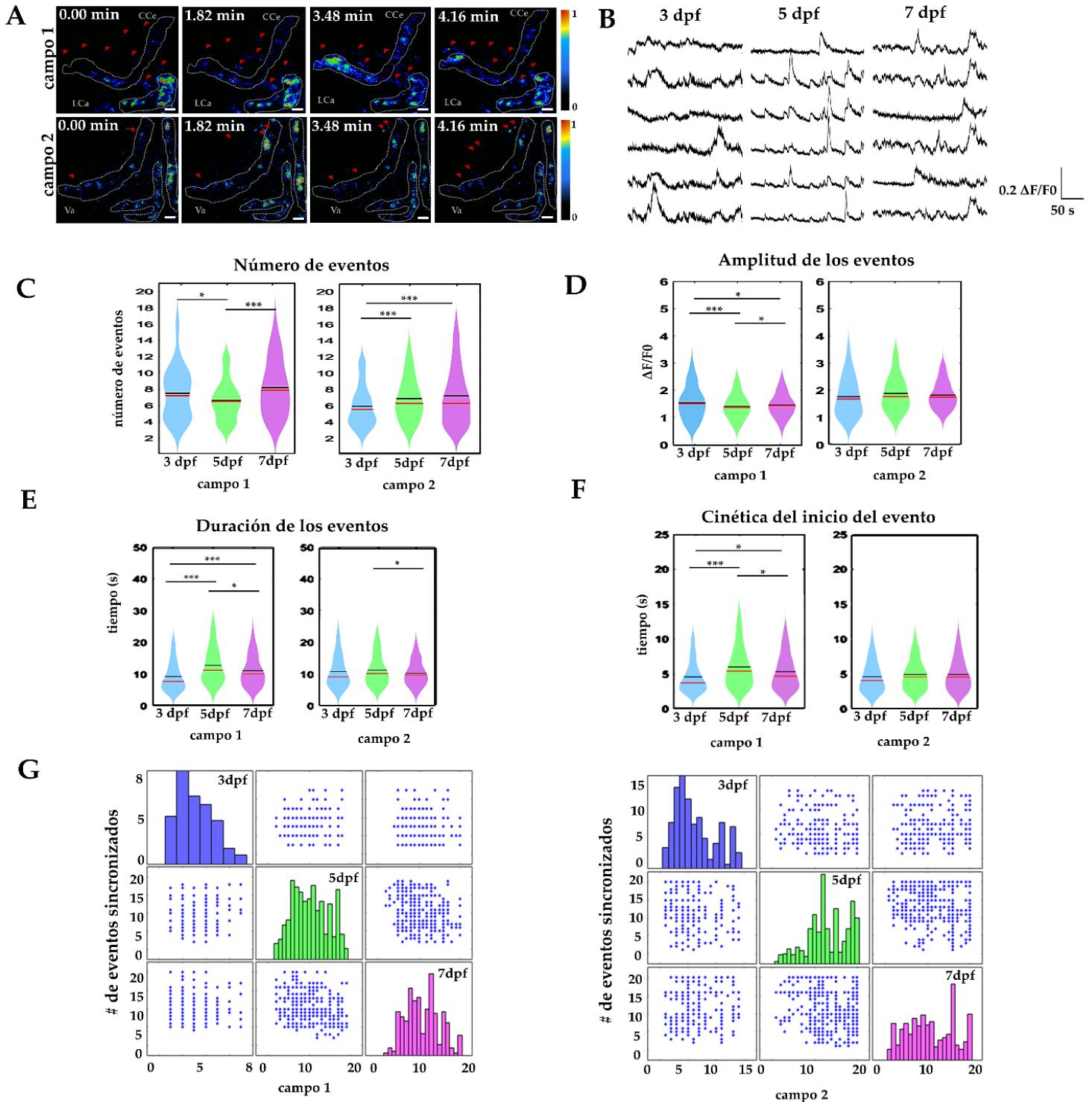


Figura 10. Señales de calcio durante el desarrollo. **(A)** Imagen de calcio de la región lateral derecha del cerebelo a los 5 dpf. La línea punteada blanca: delimita los somas de la glía radial; flechas rojas: indican la actividad de calcio en los procesos de la glía radial. **(B)** Ejemplo de registros de actividad de calcio ($\Delta F/F_0$ durante 4.16 min, a 3, 5 y 7 dpf en el campo 1). **(C)** Número de eventos de calcio en 4.16 min.

(D) Amplitud de los eventos de calcio ($\Delta F/F_0$). (E) Duración de los eventos de calcio (segundos). (F) Cinética de liberación del evento de calcio (segundos). Los gráficos muestran la distribución de los datos, los valores promedio (línea negra) y la media (línea roja). Utilizamos estadística no paramétrica: prueba Kruskal-Wallis, α 0.05, $p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, $< 0.0001^{***}$. (G) Número de eventos de calcio sincronizados a los 3, 5 y 7 dpf (barras azul, verde, magenta, corresponden respectivamente en los gráficos a los puntos en las columnas x y a las barras en los ejes). Para estos experimentos utilizamos 6 larvas por edad y por campo. Los eventos de calcio que obtuvimos por cada campo fueron: $n=200$ a 3 dpf, $n=750$ a 5 dpf y $n=400$ a 7 dpf, escala de barras 20 μm .

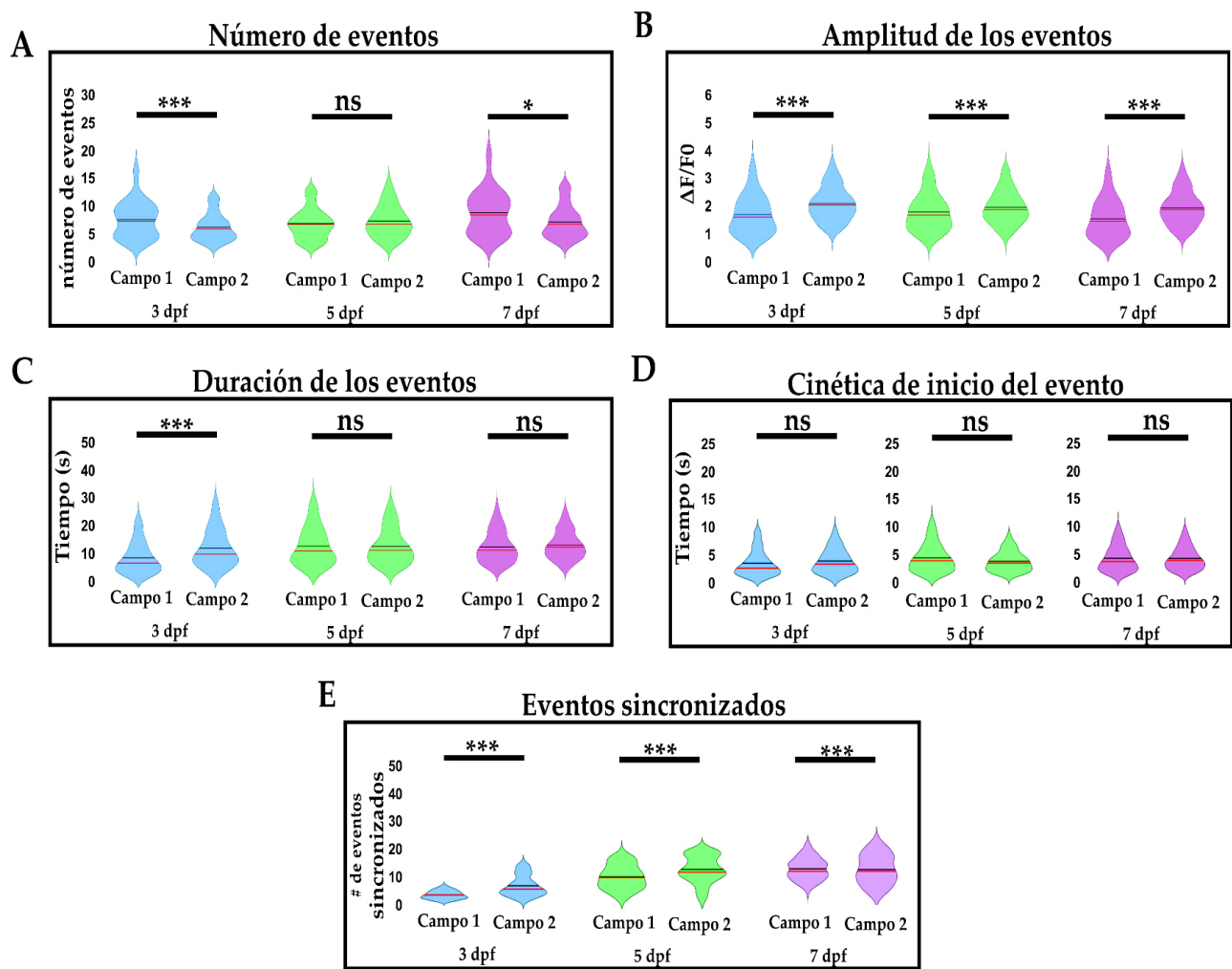


Figura 11. Comparación de las características de los eventos de calcio campo 1 vs campo 2 (A) Número de eventos (número de eventos en 4.16 min). (B) Amplitud de los eventos ($\Delta F/F_0$). (C) Duración de los eventos (segundos). (D) Cinética liberación del evento de calcio (segundos). (E) Número de eventos sincronizados (número de eventos en 4.16 min que están sincronizados), dpf = días postfertilización.

Ondas de calcio en la glía radial durante el desarrollo

Las elevaciones de calcio en la glía aparecen espontáneamente afectando la función de redes de circuitos neuronales y la vasculatura. En mamíferos, las ondas de calcio se propagan a través de la glía radial en la zona ventricular en etapas embrionarias (Weissman et al., 2004). Tras demostrar que ocurren eventos de calcio espontáneos durante el desarrollo del cerebelo, se evaluó si se producen ondas de calcio en la glía radial del pez cebra y se describen sus propiedades.

Utilizando registros de imagen de calcio, encontramos que la actividad de la glía radial en el campo 1 ocurre en pequeños grupos a los 3 dpf. A esta edad, 46 eventos por minuto se observaron en 149 ± 2.25 células y la actividad se propaga solo a un pequeño grupo de células (a una distancia no mayor a $4.94 \mu\text{m}$ en promedio). Las ondas de calcio se detectaron a los 5 dpf en el cerebelo, a esta edad, se observaron 735.79 eventos por minuto en 2391.30 ± 39.24 células sincronizadas en forma de ondas de calcio. Inesperadamente la actividad se redujo a los 7 dpf con 435.74 eventos por minuto y 1474.70 ± 7.6 células sincronizadas en forma de onda. La Figura 12A muestra los eventos detectados por edad, los puntos muestran la evidencia de los eventos sincronizados y las células durante el tiempo de registro.

La propagación de las ondas de calcio fue direccional. Inician en la parte más posterior del cerebelo y se propaga hacia la parte anterior de la región. Además, se observó que la propagación de las ondas es un evento global que iniciaba en la médula, pasaba hacia el cerebelo y continuaba hacia el cerebro medio. Sin embargo, el estudio se enfocó solamente en los eventos que ocurrieron en el cerebelo. En esta región, la actividad de calcio se detectó primero en los somas de la glía radial (Figura 12B), luego ésta se propaga hacia los procesos y van hacia los pies terminales de la superficie pial. Eventualmente la actividad desaparece, primero en los procesos y después de los somas (Figura 12C).

Para clasificar las características de estas ondas, dividimos estos eventos en tres grupos: a) eventos sin propagación ($<20 \mu\text{m}$), b) eventos de propagación a corta distancia ($20-60 \mu\text{m}$) y c) eventos de propagación a larga distancia ($>60 \mu\text{m}$).

A los 3 días postfertilización, todos los eventos que se detectaron fueron eventos sin propagación (897 eventos $4.29 \pm 0.48 \mu\text{m}$ distancia). Sin embargo, a los 5 dpf se detectaron en total 127 eventos de propagación a corta distancia $32.21 \pm 10.46 \mu\text{m}$ y 3437 eventos que se propagan a larga distancia ($138.71 \pm 18.75 \mu\text{m}$); estas ondas de calcio se propagan con muy poca frecuencia, pero reclutan a la mayoría de la glía radial del cerebelo. Finalmente, a los 7 dpf fueron detectados 8820 eventos sin propagación ($0.21 \pm 0.01 \mu\text{m}$), 25 eventos de propagación a corta distancia ($30.34 \pm 1.77 \mu\text{m}$) y 2500 eventos de propagación a larga distancia ($101.65 \pm 19.20 \mu\text{m}$) (Figura 12D).

La velocidad de los eventos fluctuó todo el tiempo, sin embargo, la velocidad máxima a los 3 dpf fue de $10 \mu\text{m/s}$ e incrementó a los 5 y 7 dpf entre $40-60 \mu\text{m/s}$ (Figura 12E). Colectivamente, los datos obtenidos muestran que la glía radial del cerebelo del pez cebrá tiene características similares a las reportadas en ratones (Beierlein & Regehr, 2006), tales como, el incremento de la actividad espontánea con respecto a la edad y la velocidad de propagación de la onda (Weissman et al., 2004). Se muestran las características de la actividad basal en peces y se describe que hay ondas de calcio en los que se observan pequeños grupos sincronizados y otros en los que se asocian la mayoría de la glía radial. Esto no se ha observado en mamíferos, en donde las redes de propagación son más limitadas. Los patrones de la actividad de calcio podrían estar fuertemente asociados con el desarrollo de la complejidad morfológica de la glía radial en el cerebelo.

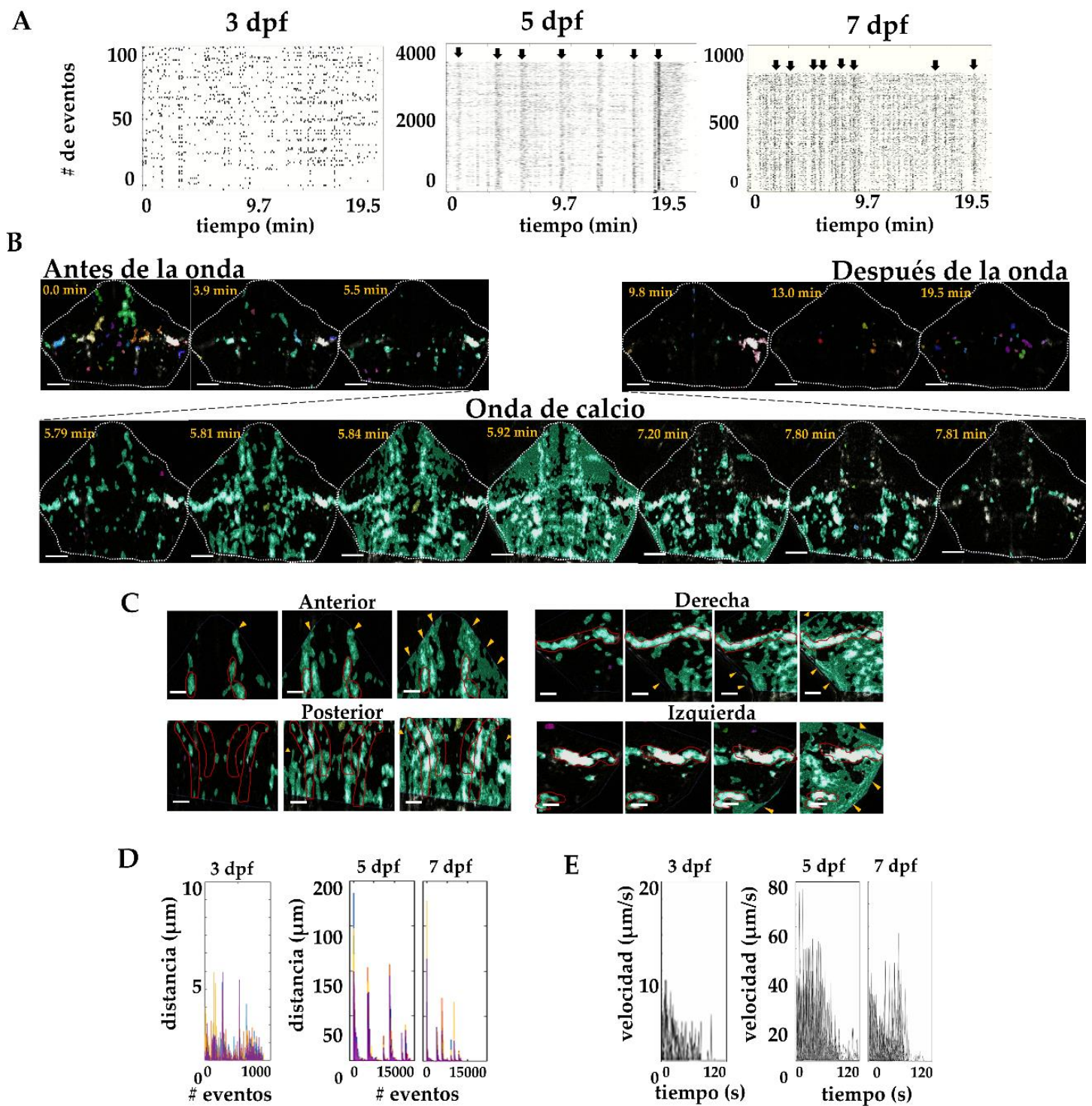


Figura 12. Ondas de calcio en la glía radial. **(A)** Eventos de calcio a 3, 5 y 7 dpf (cada región de interés está alineada en el tiempo, y cada evento de calcio está representado por un punto negro, las flechas negras indican las ondas). **(B)** Onda de calcio a los 5 dpf. La señal se propaga desde la parte más posterior y central del cerebelo hacia la región anterior (las líneas punteadas blancas delimitan el cerebelo). **(C)** Imágenes que muestran un ejemplo de la propagación de la glía radial en la región lateral (izquierdo-derecho) y la región anterior y posterior. Las líneas rojas indican el área donde se localizan los somas de la glía radial y las flechas amarillas indican la posición de los pies terminales de la glía radial que forman la

superficie pial. **(D)** Distancia de propagación de las ondas de calcio. (Como se muestra en (A)). A los 5 y 7 dpf, solo el 2% de los eventos se propagan en forma de ondas de calcio. **(E)** La velocidad de propagación a los 3, 5 y 7 dpf. N=6 larvas por edad, 3 dpf n=897; 5 dpf n=14348; 7 dpf n=8848, escala de barras 50 y 20 μm .

Efecto del bloqueo de uniones comunicantes en las señales de calcio durante la actividad espontánea

Las uniones comunicantes son proteínas que comunican el sincitio de células vecinas, su acoplamiento es esencial para entender la formación de las ondas de calcio; las uniones comunicantes son permeables a pequeñas moléculas, incluidos el calcio (Ca^{2+}) y el inositol-3-fosfato (IP_3) (Hoogland et al., 2009, 2009; Plattner & Verkhratsky, 2015). Una vez que encontramos que a partir de los 5 dpf ya hay ondas de calcio en el cerebelo del pez cebra analizamos la propagación de estas después de exponer al pez a heptanol, un bloqueador no específico de las uniones comunicantes (Liu et al., 2021). Como en las secciones previas, los eventos fueron analizados con el programa AQuA (N=6 larvas por condición Figura 13A).

En la Figura 13 se muestran imágenes que ilustran la máxima dispersión de la onda en control (Figura 13A panel 1) y la propagación en los peces tratados con heptanol (Figura 13A panel 2). Esta serie de imágenes muestran que el heptanol afecta severamente las dimensiones de la onda de calcio comparada con los peces no tratados, lo que sugiere que el rol de las uniones comunicantes en la propagación de las ondas de calcio es fundamental.

El análisis de la dinámica de las ondas de calcio mostró diferencias en la sincronización de los eventos (Figura 13B, control $21.96 \pm 0.10/19.5$ min vs heptanol $3.62 \pm 0.06/19.5$ min, $p < 0.00001$ ****), número de eventos (Figura 13C, control $35 \pm 0.17/19.5$ min vs heptanol $4.77 \pm 0.11/19.5$ min, $p < 0.00001$ ****), amplitud de los

eventos (Figura 13D, control $2.34 \pm 0.01 \Delta F/F_0$ vs heptanol $1.57 \pm 0.02 \Delta F/F_0$, $p < 0.00001^{****}$), duración de los eventos (Figura 13E, control 13.32 ± 0.08 s vs 13.09 ± 0.37 s, $p < 0.0001^{***}$) y la cinética de inicio del evento de calcio (Figura 13F, control 4.03 ± 0.02 s vs heptanol 4.95 ± 0.12 s, $p < 0.0001^{***}$). En resumen, se observa que disminuye el número de células sincronizadas, el número de eventos y su amplitud. También disminuye la duración de los eventos, y aunque es pequeña, la diferencia es significativa estadísticamente. También aumenta el tiempo de la cinética de inicio del evento.

La distancia de propagación de las ondas de calcio son afectadas severamente por el heptanol, ya que los peces expuestos a éste solo muestran actividad de calcio sin propagación (1467 eventos con una distancia promedio de $2.89 \pm 1.75 \mu\text{m}$), en contraste con los peces no tratados que mostraron los tres tipos de actividad de calcio: eventos sin propagación (14,188 eventos con una distancia promedio de propagación $0.43 \pm 0.02 \mu\text{m}$), eventos con propagación a corta distancia (127 eventos $32.31 \pm 10.46 \mu\text{m}$) y eventos con propagación a larga distancia (33 eventos $138.71 \pm 18.75 \mu\text{m}$), Figura 13G.

La sincronía de los eventos de calcio fue eliminada durante el tratamiento con heptanol como se muestra en la Figura 13B,H donde se muestra con flechas negras los eventos sincronizados en las condiciones de control, sin embargo no se detectaron en los peces tratados con heptanol. En estos gráficos se muestra la reducción del número de eventos de calcio producto del bloqueo con heptanol, donde 75 eventos por minuto fueron detectados en 244 ± 7.6 células, en contraste con las condiciones control en el cual 735 eventos por minuto fueron detectados en 2391 ± 39.24 células (Figura 13H, Tabla 4).

Finalmente, la velocidad máxima de los eventos de calcio se redujo de 40-60 $\mu\text{m/s}$ en condiciones control a 15-25 $\mu\text{m/s}$ en condiciones de peces tratados con heptanol (Figura 13I). Estos datos indican que a los 5 dpf las uniones comunicantes

son fundamentales para la propagación de las ondas de calcio. La inducción del bloqueo con heptanol genera disminución general de la actividad espontánea de calcio, por lo que podríamos suponer que las elevaciones de calcio provienen de reservas intracelulares durante la generación de la onda.

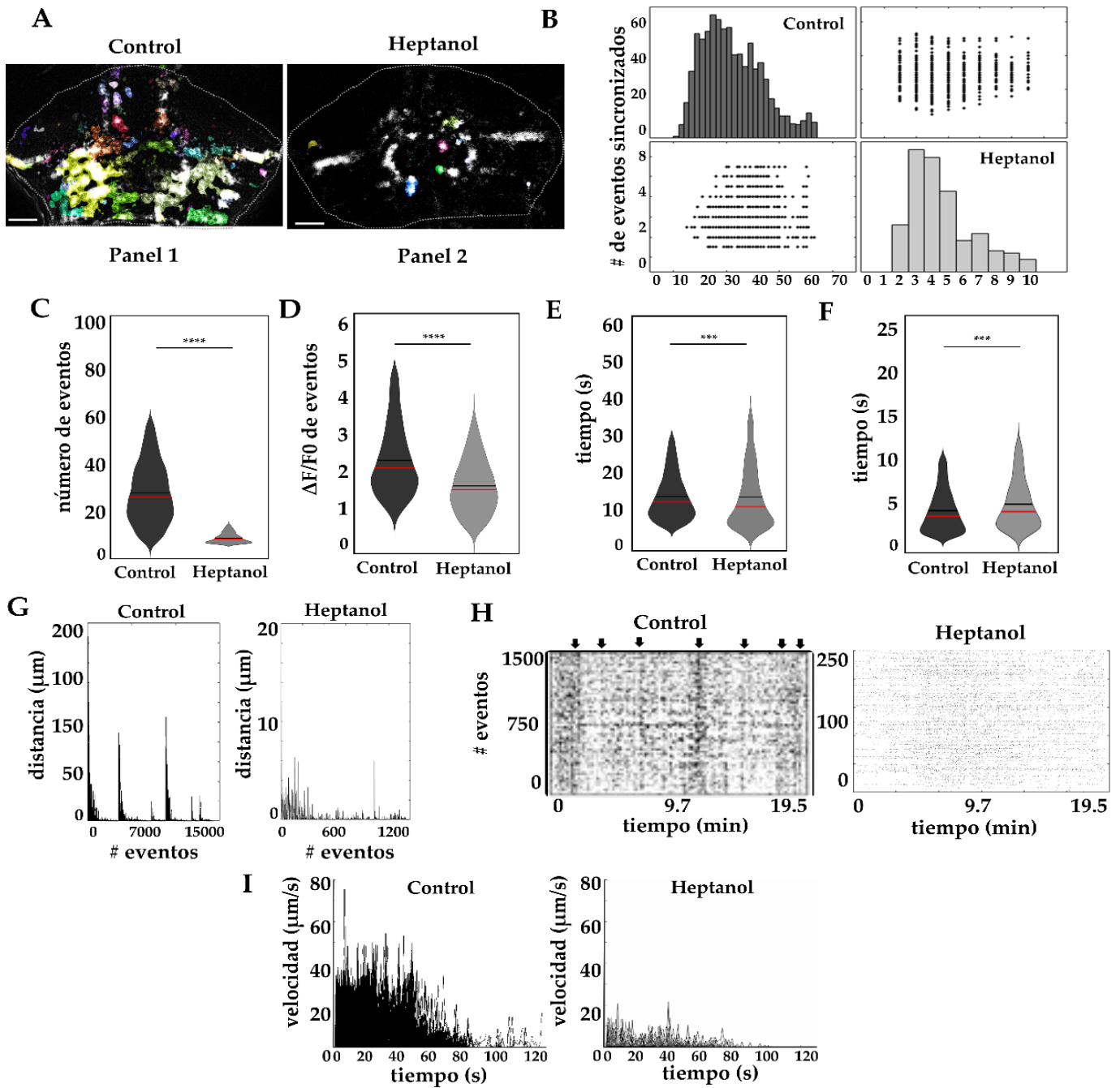


Figura 13. Disrupción de las ondas de calcio en la glía radial por exposición al heptanol. **(A)** Eventos de calcio en el cerebelo de pez cebra después de la exposición a heptanol (los cambios de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) se muestran con una máscara multicolor y la línea punteada blanca indica el área del cerebelo). En el panel 1, control (eventos que se propagan a larga distancia), en el panel 2, heptanol (eventos que no se propagan). **(B)** La sincronización los de eventos de calcio reducidos en el tratamiento con heptanol (los gráficos de barras negras y grises corresponden al control y heptanol respectivamente, Los gráficos de puntos muestran la correlación de la columna x con la muestra con respecto al eje y). **(C)** Número de eventos de calcio en 19.5 min. **(D)** Amplitud ($\Delta F/F_0$). **(E)** Duración de los eventos (segundos) **(F)** Cinética de inicio del evento (segundos). **(G)** Distancia de

propagación de los eventos (μm). **(H)** Grafico de puntos donde se muestran los eventos de calcio durante 19.5 min (cada punto representa un evento de calcio y la flecha indica donde ocurre una onda de calcio). **(I)** Velocidad máxima de las ondas de calcio ($\mu\text{m/s}$). Los gráficos (C-F) muestran la distribución de los datos, el valor promedio (línea negra) y el valor de la media (línea roja). Utilizamos estadística no paramétrica, la prueba Mann-Whitney U, α 0.05, valor de $p < 0.0001^{***}$, $< 0.00001^{****}$. Los registros fueron obtenidos de larvas de 5 días postfertilización. N=6 para cada condición, control: $n=14,348$ y heptanol $n=1467$, dpf=días postfertilización, escala de barras en (A) $50 \mu\text{m}$.

Tabla 4. Señales de calcio en la glía radial después del bloqueo de uniones comunicantes.

Características	Unidades	Control	Heptanol
Número de eventos	#/4 min	35.86 \pm 0.18	4.77 \pm 0.11
Amplitud	$\Delta F/F_0$	2.34 \pm 0.01	1.57 \pm 0.02
Duración	(s)	13.32 \pm 0.08	13.09 \pm 0.37
Cinética de liberación	(s)	4.03 \pm 0.02	4.95 \pm 0.12
Sincronía	#/4 min	21.96 \pm 0.10	3.62 \pm 0.06

8. Discusión

Mediante una combinación de análisis morfométrico y registros de actividad de calcio *in vivo* en peces cebras, se observaron eventos críticos en el desarrollo de la glía radial del cerebelo. Específicamente, se demostró que la complejidad morfológica de la glía radial podría estar estrechamente relacionada con la aparición de eventos de calcio sincronizados y con las ondas de calcio.

Se encontró que a los 3 dpf, la mayoría de las células de la glía radial tienen uno o dos procesos cortos con un soma pequeño y que los eventos de calcio son escasos y rápidos, estos eventos de calcio no se propagan a largas distancias.

A los 5 dpf, los somas y procesos aumentan de tamaño y longitud y observamos que los eventos de calcio aparecen más frecuentemente y tienen mayor duración y disminuye la cinética de liberación del evento. Además, se identificaron dos aspectos inesperados.

Primero, las características de la glía en cuanto al tamaño del soma, longitud de los procesos, el aumento del número de eventos, la duración del evento, la sincronización, la distancia y la velocidad de propagación de los eventos no fue lineal. En casi todas las características que medimos a los 5 dpf fueron mayores que a los 7 dpf.

A los 5 dpf ya está formado el cerebelo en capas y hay coordinación motriz, pero podría estar ocurriendo algún proceso fisiológico en este punto que provoque este aumento en la señalización de calcio. A pesar de que existen pocos estudios de actividad espontánea durante estas etapas del desarrollo, sabemos que la etapa en la que se observó un cambio drástico en los eventos de calcio es cuando ocurre

la formación de las conexiones sinápticas y su refinamiento. Es posible que el aumento de la actividad de calcio en esta etapa se deba a la participación en la consolidación de sinapsis funcionales y la poda neuronal. Otra teoría es que el mecanismo por el cual se ve involucrada es a través de la actividad mediada glutamato como un tipo de señalización y liberación de calcio intracelular (Miyazaki et al., 2017; Weissman et al., 2004; Yamada & Watanabe, 2002). Los procesos de la glía radial son más complejos y físicamente abarcan mayor espacio, envolviendo las sinapsis por lo que está en mayor contacto con los neurotransmisores liberados, existen reportes de que los eventos de calcio ocurren de manera más puntual en mamíferos, estos eventos ocurren sobre balsas de proteínas que delimitan la propagación del calcio a ciertas regiones de la célula y se conocen como microdominios. Durante el estudio se visualizaron algunas diferencias en los campos donde se pueden registrar mejor los procesos o los somas de la glía pero no parece ser tan claro como lo que se ha reportado en ratones (Grosche et al., 1999; Shigetomi et al., 2013).

A los 7 dpf, los procesos se retraen y cada glía radial tiene un mayor número de procesos, hay un aumento de los eventos de calcio, aunque no tantos como a los 5 dpf. A los 7 dpf ante un estímulo táctil o luminoso las neuronas responden exactamente después de que se aplica el estímulo (táctil o luminoso). Mientras que a los 5 dpf a pesar de que los peces ya se mueven, las neuronas en ocasiones no detectan esa luz o lo detectan segundos más tarde, falta madurar el momento del estímulo y la respuesta de ejecución. Además, a partir de los 6 días en adelante la larva es capaz de desarrollar aprendizaje motor condicionado e incondicionado. También aumenta el tamaño del cerebro al igual que el resto de órganos y tejidos del pez, de manera interesante, a esta edad el pez puede procesar la información sensorial de manera similar a un pez adulto (Hibi & Shimizu, 2012; Hsieh et al., 2014).

Segundo, se esperaba que las ondas de calcio fueran delimitadas en grupos, parecido a lo reportado en mamíferos (6-8 glías de Bergmann activas) pero se

encontraron grupos de células que propagan la onda de calcio a distancias mayores que abarcaron todo el cerebelo. Por lo que la señalización por ondas de calcio tiene un mayor alcance en pez cebra en cuanto al número de células que se reclutan durante el evento de onda de calcio (Hoogland et al., 2009; Nimmerjahn et al., 2009). Estos resultados son de gran interés y dejan la puerta abierta a una investigación más amplia que ayude a entender por qué y qué función tienen estas ondas que se propagan a distancias tan grandes y activando un grupo tan amplio y coordinado de células. Cabe resaltar que las conexinas que presentan estas células son las cx43 que también se encuentran en el tejido muscular esquelético del corazón (miocardio) y que permite contracción del tejido y el bombeo de la sangre de forma eficiente, por lo que eventos coordinados podrían ocurrir en estas células con algún tipo de función biológica en los que se requiera el reclutamiento celular (Epifantseva & Shaw, 2018; Valls-Lacalle et al., 2019; Wang et al., 2017).

En la corteza cerebral de los primates se ha estudiado la complejidad de la glía radial y se han identificado una variedad de subtipos morfológicos (Arellano et al., 2021; Betizeau et al., 2013; Nowakowski et al., 2016; Rakic, 1972). Nuestro estudio muestra que la glía radial del cerebelo del pez cebra sufre cambios radicales entre los días 3 y 7 dpf. A los 3 dpf estas células se encuentran homogéneamente distribuidas con sus somas alineadas a lo largo de la línea media y sus procesos proyectan ventralmente. Después, con la emergencia del Cce y la aurícula a los 5 dpf nuevas células de la glía radial ocupan estas áreas y se reorganizan para permitir la extensión del cerebelo hacia la parte dorsal para formar la folia. A los 7 dpf, los somas de la glía radial se alinean a lo largo de la línea media pero sus procesos proyectan de manera lateral, para dar la forma que será conservada hasta etapas adultas. En humanos se ha reportado que la glía radial de la corteza en etapas del desarrollo, muestra una expresión diferencial de genes y da lugar a diferentes tipos de neuronas (Nowakowski et al., 2017). Por lo que podría ser interesante, mediante transcriptómica estudiar a la glía radial del pez cebra durante el desarrollo temprano y comparar los perfiles transcriptómicos de larvas, juveniles y adultos (Lange et al., 2020; Raj et al., 2018).

La emergencia de la complejidad morfológica de la glía radial en los procesos correlaciona temporalmente con el origen de la actividad de calcio. Las uniones comunicantes localizadas en los somas y procesos de células vecinas son funcionales cuando las capas del cerebelo ya están formadas. A los 5 dpf, los somas y la longitud de los procesos son más del doble de los 3 dpf. Las estructuras que forman el cerebelo (campo 1 y campo 2) mostraron diferencias en la actividad de calcio, lo cual podría estar relacionado a diferencias en la actividad neuronal o bien a la actividad intrínseca de las células ya que son polares, por lo que en el campo 1 podemos visualizar un mayor número de procesos y en el campo 2 hay un mayor número de somas.

La expresión de los componentes básicos que permiten la comunicación en astrocitos y la glía radial ya está presente a los 3 dpf (Ashworth et al., 2007; Chatterjee et al., 2005; Lo, 2003); sin embargo, la actividad es mayormente local, es decir los elementos para que haya propagación de las ondas está desde los 3 días pero debe haber algún componente o señalización que las desencadena hasta los 5 dpf, quedando como incógnita para estudios posteriores de qué es lo que marca el inicio de la propagación de las ondas en la glía radial del pez cebra.

De manera interesante, la duración de los eventos de calcio a los 5 dpf en el cerebelo 11.38 ± 0.43 s es similar a los astrocitos que están en la medula oblongada a los 6 dpf (12 ± 5 s) lo que podría sugerir que independientemente del tipo de glía; radial o astrocito pueden tener actividad de calcio espontánea muy similar, además en ese estudio se mostró cómo al adicionar norepinefrina, la actividad de calcio en los astrocitos se potenció. Por lo que se sugiere que esta actividad basal se ve modificada por la influencia de neurotransmisores y es altamente probable que participen de manera más activa durante la actividad neuronal, tal como se ha mostrado en mamíferos (Chen et al., 2020; Kuhn et al., 2011; Nimmerjahn et al., 2009).

Debido a que aún queda mucho por saber acerca de las señales de calcio en la glía radial durante los procesos del desarrollo generamos un modelo experimental en el que podemos evaluar ahora con estímulos sensoriales o bien con fármacos que simulen diversos estados mentales para describir y evaluar cómo afectan la señalización del calcio glial y definir mejor cómo se involucra en diversos estados fisiológicos o en estados neurológicos alterados (Buskila et al., 2019; Gruol et al., 2016; Kalueff et al., 2014; Kaufmann et al., 2012; Leung et al., 2019).

9. Conclusiones

1. Se mostro que la complejidad morfológica de la glía radial durante la primera semana del desarrollo es notoria que va desde una columna simple estratificada a los 3 dpf hasta la formación de la folia del cerebelo con el alargamiento de los procesos a los 5 dpf y morfologías más complejas a los 7 dpf.
2. El número de procesos, la longitud de los procesos y el área del soma aumenta con la edad, este proceso es similar al descrito en mamíferos. Al comparar las regiones del cerebelo en una misma edad se encuentran pocas diferencias: solo a los 3 dpf los somas de la región central tienen un tamaño mayor que los de la región lateral y a los 5 dpf los procesos del LCa son más largos que los de las otras regiones del cerebelo.
3. Se generó una línea de pez transgénico que expresa el indicador de calcio GCaMP6s en glía radial. Con este modelo, se encontró que hay diferencias en las propiedades de la dinámica de calcio entre diferentes zonas del cerebelo.
4. Las señales de calcio cambian con la edad: el número de eventos, la duración, la cinética de liberación del evento y la sincronización de los eventos de calcio aumentan con la edad, aunque hay un pico alto a los 5 dpf. Las ondas de calcio aparecen a los 5 dpf; también el número de eventos y de células que las forman, van aumentando con la edad, así como la distancia y velocidad de propagación.

5. Finalmente, el bloqueo de las uniones comunicantes elimina por completo las ondas de calcio, por lo que éstas dependen casi exclusivamente de la propagación de calcio intracelular a través de uniones comunicantes.

10. Perspectivas

1. Probar si están directamente relacionadas la morfología (procesos complejos) con los cambios en las señales de calcio.
2. Esclarecer el mecanismo que desencadena las ondas de calcio.
3. Descubrir el rol que tiene el calcio en eventos individuales a partir de un abordaje farmacológico.
4. Determinar si la glía radial responde a estímulos sensoriales.

11. Referencias

- Aizenberg, M., & Schuman, E. M. (2011). Cerebellar-Dependent Learning in Larval Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 31(24), 8708–8712.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6565-10.2011>
- Arellano, J. I., Morozov, Y. M., Micali, N., & Rakic, P. (2021). Radial Glial Cells: New Views on Old Questions. *Neurochemical Research*, 46(10), 2512–2524. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03296-z>
- Asakawa, K. (2009). The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *Methods*, 49(3), 275–281.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.01.004>
- Ashworth, R., Devogelaere, B., Fabes, J., Tunwell, R. E., Koh, K. R., De Smedt, H., & Patel, S. (2007). Molecular and Functional Characterization of Inositol Trisphosphate Receptors during Early Zebrafish Development. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 13984–13993.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700940200>
- Bae, Y. K., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., & Hibi, M. (2009). Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology*, 330(2), 406:426.
- Barykina, N. V., Subach, O. M., Piatkevich, K. D., Jung, E. E., Malyshev, A. Y., Smirnov, I. V., Bogorodskiy, A. O., Borshchevskiy, V. I., Varizhuk, A. M., Pozmogova, G. E., Boyden, E. S., Anokhin, K. V., Enikolopov, G. N., & Subach, F. V. (2017). Green fluorescent genetically encoded calcium

- indicator based on calmodulin/M13-peptide from fungi. *PLOS ONE*, 12(8), e0183757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183757>
- Beierlein, M., & Regehr, W. G. (2006). Brief Bursts of Parallel Fiber Activity Trigger Calcium Signals in Bergmann Glia. *Journal of Neuroscience*, 26(26), 6958–6967. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0613-06.2006>
- Bellot-Saez, A., Cohen, G., van Schaik, A., Ooi, L., W Morley, J., & Buskila, Y. (2018). Astrocytic modulation of cortical oscillations. *Scientific Reports*, 8(1), 11565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30003-w>
- Bennett, M. V. L., Spray, D. C., & Harris, A. L. (1981). Electrical Coupling in Development. *American Zoologist*, 21(2), 413–427. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.413>
- Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemin-Ménard, A., Afanassieff, M., Huissoud, C., Douglas, R. J., Kennedy, H., & Dehay, C. (2013). Precursor Diversity and Complexity of Lineage Relationships in the Outer Subventricular Zone of the Primate. *Neuron*, 80(2), 442–457. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.032>
- Burgess, H. A., & Granato, M. (2007). Sensorimotor Gating in Larval Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 27(18), 4984–4994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0615-07.2007>
- Buskila, Y., Bellot-Saez, A., & Morley, J. W. (2019). Generating Brain Waves, the Power of Astrocytes. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1125. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01125>
- Chang, W., Pedroni, A., Köster, R. W., Giacomello, S., & Ampatzis, K. (2021). Purkinje cells located in the adult zebrafish valvula cerebelli exhibit variable

functional responses. *Scientific Reports*, 11(1), 18408.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98035-3>

Charlton-Perkins, M. A., Sendler, E. D., Buschbeck, E. K., & Cook, T. A. (2017).

Multifunctional glial support by Semper cells in the *Drosophila* retina. *PLoS Genetics*, 13(5), e1006782. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006782>

Chatterjee, B., Chin, A. J., Valdimarsson, G., Finis, C., Sonntag, J. M., Choi, B. Y.,

Tao, L., Balasubramanian, K., Bell, C., Krufka, A., Kozlowski, D. J.,

Johnson, R. G., & Lo, C. W. (2005). Developmental regulation and

expression of the zebrafish connexin43 gene. *Developmental Dynamics*, 233(3), 890–906. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20426>

Chen, J., Poskanzer, K. E., Freeman, M. R., & Monk, K. R. (2020). Live-imaging of

astrocyte morphogenesis and function in zebrafish neural circuits. *Nature*

Neuroscience, 23(10), 1297–1306. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0703-x>

Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A.,

Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L.,

Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300.

<https://doi.org/10.1038/nature12354>

Clinton, B. K., Cunningham, C. L., Kriegstein, A. R., Noctor, S. C., & Martínez-

Cerdeño, V. (2014). Radial glia in the proliferative ventricular zone of the

embryonic and adult turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Neurogenesis*, 1(1), e970905. <https://doi.org/10.4161/23262125.2014.970905>

- Das, G. D. (1976). Differentiation of bergmann glia cells in the cerebellum: A golgi study. *Brain Research*, 110(2), 199–213. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90397-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90397-8)
- Denizot, A., Arizono, M., Nägerl, U. V., Soula, H., & Berry, H. (2019). Simulation of calcium signaling in fine astrocytic processes: Effect of spatial properties on spontaneous activity. *PLOS Computational Biology*, 15(8), e1006795. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006795>
- Dermietzel, R., Hertberg, E., Kessler, J., & Spray, D. (1991). Gap junctions between cultured astrocytes: Immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *The Journal of Neuroscience*, 11(5), 1421–1432. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-05-01421.1991>
- Di Virgilio, F., Fietrobon, D., & Pozzan, T. (1996). Chapter 12 The Basis of Intracellular Calcium Homeostasis in Eukaryotic Cells. En *Principles of Medical Biology* (Vol. 4, pp. 305–327). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2582\(96\)80099-7](https://doi.org/10.1016/S1569-2582(96)80099-7)
- Drapeau, P., Ali, D. W., Buss, R. R., & Saint-Amant, L. (1999). In vivo recording from identifiable neurons of the locomotor network in the developing zebrafish. *Journal of Neuroscience Methods*, 88(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00008-4)
- Ekström, P., Johnsson, C.-M., & Ohlin, L.-M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones: Proliferation Zones in Adult Teleost Brain. *Journal of Comparative Neurology*, 436(1), 92–110. <https://doi.org/10.1002/cne.1056>

- Epifantseva, I., & Shaw, R. M. (2018). Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(1), 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.018>
- Giaume, C., & Liu, X. (2012). From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. *Journal of Physiology-Paris*, 106(1–2), 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.09.001>
- Giaume, C., & Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 160–176.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.005>
- Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., & Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron–glia interaction: Parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neuroscience*, 2(2), 139–143.
<https://doi.org/10.1038/5692>
- Gruol, D. L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmähmann, J. D., & Shen, Y. (Eds.). (2016). *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24551-5>
- Guillem, A. M., Martínez-Lozada, Z., Hernández-Kelly, L. C., López-Bayghen, E., López-Bayghen, B., Calleros, O. A., Campuzano, M. R., & Ortega, A. (2015). Methylphenidate Increases Glutamate Uptake in Bergmann Glial Cells. *Neurochemical Research*, 40(11), 2317–2324.
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1721-z>

- Haas, B., Schipke, C. G., Peters, O., Söhl, G., Willecke, K., & Kettenmann, H. (2006). Activity-dependent ATP-waves in the Mouse Neocortex are Independent from Astrocytic Calcium Waves. *Cerebral Cortex*, 16(2), 237–246. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101>
- Hamling, K. R., Tobias, Z. J. C., & Weissman, T. A. (2015). Mapping the development of cerebellar Purkinje cells in zebrafish: Purkinje Cell Development in Zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 75(11), 1174–1188. <https://doi.org/10.1002/dneu.22275>
- Hashimoto, M., & Hibi, M. (2012). Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Development, Growth & Differentiation*, 54(3), 373–389. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01348.x>
- Heap, L. A. L., Vanwalleghem, G., Thompson, A. W., Favre-Bulle, I. A., & Scott, E. K. (2018). Luminance Changes Drive Directional Startle through a Thalamic Pathway. *Neuron*, 99(2), 293-301.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.013>
- Hibi, M., Matsuda, K., Takeuchi, M., Shimizu, T., & Murakami, Y. (2017). Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Development, Growth & Differentiation*, 59(4), 228–243. <https://doi.org/10.1111/dgd.12349>
- Hibi, M., & Shimizu, T. (2012). Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 282–301. <https://doi.org/10.1002/dneu.20875>
- Hoogland, T. M., Kuhn, B., Gobel, W., Huang, W., Nakai, J., Helmchen, F., Flint, J., & Wang, S. S.-H. (2009). Radially expanding transglial calcium waves in the

- intact cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3496–3501. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809269106>
- Houart, C. (2001). Zebrafish as an Experimental Organism. 2001, 5.
- Hsieh, J.-Y., Ulrich, B., Issa, F. A., Wan, J., & Papazian, D. M. (2014). Rapid development of Purkinje cell excitability, functional cerebellar circuit, and afferent sensory input to cerebellum in zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00147>
- Johnson, K., Barragan, J., Bashiruddin, S., Smith, C. J., Tyrrell, C., Parsons, M. J., Doris, R., Kucenas, S., Downes, G. B., Velez, C. M., Schneider, C., Sakai, C., Pathak, N., Anderson, K., Stein, R., Devoto, S. H., Mumm, J. S., & Barresi, M. J. F. (2016). Gfap-positive radial glial cells are an essential progenitor population for later-born neurons and glia in the zebrafish spinal cord. *Glia*, 64(7), 1170–1189. <https://doi.org/10.1002/glia.22990>
- Jurisch-Yaksi, N., Yaksi, E., & Kizil, C. (2020). Radial glia in the zebrafish brain: Functional, structural, and physiological comparison with the mammalian glia. *Glia*, 68(12), 2451–2470. <https://doi.org/10.1002/glia.23849>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kaslin, J., & Brand, M. (2016). The zebrafish cerebellum. En *Essentials of cerebellum and cerebellar disorders* (Part VIII; 1st ed., Vol. 56, pp. 411–421). Springer International Publishing. DOI 10.1007/978-3-319-24551-5_56
- Kaslin, J., Kroehne, V., Ganz, J., Hans, S., & Brand, M. (2017). Distinct roles of neuroepithelial-like and radial glia-like progenitor cells in cerebellar

regeneration. *Development*, dev.144907.

<https://doi.org/10.1242/dev.144907>

Kaufmann, A., Mickoleit, M., Weber, M., & Huisken, J. (2012). Multilayer mounting enables long-term imaging of zebrafish development in a light sheet microscope. *Development*, 139(17), 3242–3247.

<https://doi.org/10.1242/dev.082586>

Kawakami, K. (2007). Tol2: A versatile gene transfer vector in vertebrates.

Genome Biology, 8(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7>

Kiyoshi, C. M., Du, Y., Zhong, S., Wang, W., Taylor, A. T., Xiong, B., Ma, B., Terman, D., & Zhou, M. (2018). Syncytial isopotentiality: A system-wide electrical feature of astrocytic networks in the brain. *Glia*, 66(12), 2756–2769. <https://doi.org/10.1002/glia.23525>

Koziol, L. F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H., Ito, M., Manto, M., Marvel, C., Parker, K., Pezzulo, G., Ramnani, N., Riva, D., Schmahmann, J., Vandervert, L., & Yamazaki, T. (2014). Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition. *The Cerebellum*, 13(1), 151–177. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0511-x>

Krishnan, G., & Chatterjee, N. (2013). Detergent resistant membrane fractions are involved in calcium signaling in Müller glial cells of retina. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(8), 1758–1766.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.024>

Kuhn, B., Hoogland, T. M., & Wang, S. S.-H. (2011). Cerebellar Craniotomy for In Vivo Calcium Imaging of Astrocytes. *Cold Spring Harbor Protocols*,

2011(10), pdb.prot065805-pdb.prot065805.

<https://doi.org/10.1101/pdb.prot065805>

Lange, C., Rost, F., Machate, A., Reinhardt, S., Lesche, M., Weber, A., Kuscha, V., Dahl, A., Rulands, S., & Brand, M. (2020). Single cell sequencing of radial glia progeny reveals diversity of newborn neurons in the adult zebrafish brain. *Development*, 1855951. <https://doi.org/10.1242/dev.185595>

Lawrence, C. (2011). Advances in Zebrafish Husbandry and Management. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 104, pp. 429–451). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374814-0.00023-9>

Leung, L. C., Wang, G. X., Madelaine, R., Skariah, G., Kawakami, K., Deisseroth, K., Urban, A. E., & Mourrain, P. (2019). Neural signatures of sleep in zebrafish. *Nature*, 571(7764), 198–204. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1336-7>

Liebmann, M., Stahr, A., Guenther, M., Witte, O. W., & Frahm, C. (2013).

Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. *Neuroscience Letters*, 545, 40–45.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.013>

Lines, J., Martin, E. D., Kofuji, P., Aguilar, J., & Araque, A. (2020). Astrocytes modulate sensory-evoked neuronal network activity. *Nature Communications*, 11(1), 3689. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17536-3>

Liu, J., Salvati, K. A., & Baraban, S. C. (2021). In vivo calcium imaging reveals disordered interictal network dynamics in epileptic stxbp1b zebrafish. *iScience*, 24(6), 102558. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102558>

- Lo, J. (2003). 15,000 Unique Zebrafish EST Clusters and Their Future Use in Microarray for Profiling Gene Expression Patterns During Embryogenesis. *Genome Research*, 13(3), 455–466. <https://doi.org/10.1101/gr.885403>
- Manto, M., Gandini, J., Feil, K., & Strupp, M. (2020). Cerebellar ataxias: An update. *Current Opinion in Neurology*, 33(1), 150–160. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000774>
- Mashanov, V., & Zueva, O. (2018). Radial Glia in Echinoderms. *Developmental Neurobiology*, dneu.22659. <https://doi.org/10.1002/dneu.22659>
- Mathiesen, C., Brazhe, A., Thomsen, K., & Lauritzen, M. (2013). Spontaneous Calcium Waves in Bergman Glia Increase with Age and Hypoxia and may Reduce Tissue Oxygen. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(2), 161–169. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.175>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Matsui, H., Namikawa, K., Babaryka, A., & Koster, R. W. (2014). Functional regionalization of the teleost cerebellum analyzed in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11846–11851. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403105111>
- Mendez-Flores, O. G., Hernández-Kelly, L. C., Suárez-Pozos, E., Najimi, M., & Ortega, A. (2016). Coupling of glutamate and glucose uptake in cultured Bergmann glial cells. *Neurochemistry International*, 98, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.001>

- Meunier, R. (2012). Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic models in developmental biology: Zebrafish, 1970–2000. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 43(2), 522–531. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2011.11.013>
- Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Kohda, K., Yuzaki, M., Shimamoto, K., Tanaka, K., Kano, M., & Watanabe, M. (2017). Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(28), 7438–7443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617330114>
- Miyazawa, H., Okumura, K., Hiyoshi, K., Maruyama, K., Kakinuma, H., Amo, R., Okamoto, H., Yamasu, K., & Tsuda, S. (2018). Optical interrogation of neuronal circuitry in zebrafish using genetically encoded voltage indicators. *Scientific Reports*, 8(1), 6048. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23906-1>
- Morita, M., Higuchi, C., Moto, T., Kozuka, N., Susuki, J., Itofusa, R., Yamashita, J., & Kudo, Y. (2003). Dual Regulation of Calcium Oscillation in Astrocytes by Growth Factors and Pro-Inflammatory Cytokines via the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *The Journal of Neuroscience*, 23(34), 10944–10952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10944.2003>
- Mu, Y., Bennett, D. V., Rubinov, M., Narayan, S., Yang, C.-T., Tanimoto, M., Mensh, B. D., Looger, L. L., & Ahrens, M. B. (2019). Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior. *Cell*, 178(1), 27–43.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.050>

- Müller, T., Möller, T., Berger, T., Schnitzer, J., & Kettenmann, H. (1992). Calcium Entry Through Kainate Receptors and Resulting Potassium-Channel Blockade in Bergmann Glial Cells. *Science, New Series*, 256(5063), 1563–1566.
- Nett, W. J., Oloff, S. H., & McCarthy, K. D. (2002). Hippocampal Astrocytes In Situ Exhibit Calcium Oscillations That Occur Independent of Neuronal Activity. *Journal of Neurophysiology*, 87(1), 528–537.
<https://doi.org/10.1152/jn.00268.2001>
- Nimmerjahn, A., Mukamel, E. A., & Schnitzer, M. J. (2009). Motor Behavior Activates Bergmann Glial Networks. *Neuron*, 62(3), 400–412.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.019>
- Norton, A., Franse, K. F., Daw, T., Gordon, L., Vitiello, P. F., & Kinkel, M. D. (2019). *Larval Rearing Methods for Small-scale Production of Healthy Zebrafish*. 21.
- Nowakowski, T. J., Bhaduri, A., Pollen, A. A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Haeussler, M., Sandoval-Espinosa, C., Liu, S. J., Velmeshev, D., Ounadjela, J. R., Shuga, J., Wang, X., Lim, D. A., West, J. A., Leyrat, A. A., Kent, W. J., & Kriegstein, A. R. (2017). Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. *Science*, 358(6368), 1318–1323. <https://doi.org/10.1126/science.aap8809>
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Sandoval-Espinosa, C., & Kriegstein, A. R. (2016). Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron*, 91(6), 1219–1227.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.005>

- Ortega, A., & Olivares-Bañuelos, T. N. (2020). Neurons and Glia Cells in Marine Invertebrates: An Update. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 121. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00121>
- Parrock, S., Hussain, S., Issler, N., Differ, A.-M., Lench, N., Guarino, S., Oosterveld, M. J. S., Keijzer-Veen, M., Brilstra, E., van Wieringen, H., Konijnenberg, A. Y., Amin-Rasip, S., Dumitriu, S., Klootwijk, E., Knoers, N., Bockenbauer, D., Kleta, R., & Zdebik, A. A. (2013). KCNJ10 Mutations Display Differential Sensitivity to Heteromerisation with KCNJ16. *Nephron Physiology*, *123*(3–4), 7–14. <https://doi.org/10.1159/000356353>
- Perea, G. (2005). Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *25*(9), 2192–2203. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3965-04.2005>
- Plattner, H., & Verkhratsky, A. (2015). Evolution of calcium signalling. *Cell Calcium*, *57*(3), 121–122. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.02.007>
- Poulsen, R. E., Scholz, L. A., Constantin, L., Favre-Bulle, I., Vanwalleghem, G. C., & Scott, E. K. (2021). Broad frequency sensitivity and complex neural coding in the larval zebrafish auditory system. *Current Biology*, *31*(9), 1977–1987.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.103>
- Raj, B., Wagner, D. E., McKenna, A., Pandey, S., Klein, A. M., Shendure, J., Gagnon, J. A., & Schier, A. F. (2018). Simultaneous single-cell profiling of lineages and cell types in the vertebrate brain. *Nature Biotechnology*, *36*(5), 442–450. <https://doi.org/10.1038/nbt.4103>

- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *145*(1), 61–83.
<https://doi.org/10.1002/cne.901450105>
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., & Giaume, C. (2008). Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science*, *322*(5907), 1551–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1164022>
- 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. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmahmann, J. D. (2019). The cerebellum and cognition. *Neuroscience Letters*, *688*, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.005>
- Semyanov, A., Henneberger, C., & Agarwal, A. (2020). Making sense of astrocytic calcium signals—From acquisition to interpretation. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(10), 551–564. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0361-8>
- Sheets, L., Trapani, J. G., Mo, W., Obholzer, N., & Nicolson, T. (2011). Ribeye is required for presynaptic CaV1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells. *Development*, *138*(7), 1309–1319.
<https://doi.org/10.1242/dev.059451>
- Shigetomi, E., Bushong, E. A., Haustein, M. D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., Xu, J., Sofroniew, M. V., Ellisman, M. H., & Khakh, B. S. (2013). Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *Journal of*

General Physiology, 141(5), 633–647.

<https://doi.org/10.1085/jgp.201210949>

Shigetomi, E., Patel, S., & Khakh, B. S. (2016). Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling. *Trends in Cell Biology*, 26(4), 300–312.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.003>

Takeuchi, M., Matsuda, K., Yamaguchi, S., Asakawa, K., Miyasaka, N., Lal, P., Yoshihara, Y., Koga, A., Kawakami, K., Shimizu, T., & Hibi, M. (2015). Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. *Developmental Biology*, 397(1), 1–17.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.030>

Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Sakakibara, Y., Hayashi, T., Matsuda, K., Hara, Y., Tanegashima, C., Shimizu, T., Kuraku, S., & Hibi, M. (2017). Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum: Transcriptomes In zebrafish cerebellar neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 525(7), 1558–1585.

<https://doi.org/10.1002/cne.24114>

Tanaka, M. (2008). Lack of connexin43-mediated Bergmann glial gap junctional coupling does not affect cerebellar long-term depression, motor coordination, or eyeblink conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2.

<https://doi.org/10.3389/neuro.08.001.2008>

Than-Trong, E., & Bally-Cuif, L. (2015). Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system: Adult Radial Glia in Zebrafish. *Glia*, 63(8), 1406–1428. <https://doi.org/10.1002/glia.22856>

- Valls-Lacalle, Negre-Pujol, Rodríguez, Varona, Valera-Cañellas, Consegal, Martínez-González, & Rodríguez-Sinovas. (2019). Opposite Effects of Moderate and Extreme Cx43 Deficiency in Conditional Cx43-Deficient Mice on Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis. *Cells*, 8(10), 1299. <https://doi.org/10.3390/cells8101299>
- van der Heijden, M. E., Gill, J. S., & Sillitoe, R. V. (2021). Abnormal Cerebellar Development in Autism Spectrum Disorders. *Developmental Neuroscience*, 43(3–4), 181–190. <https://doi.org/10.1159/000515189>
- Van Dyck, A., Bollaerts, I., Beckers, A., Vanhunsel, S., Glorian, N., houcke, J., Ham, T. J., De Groef, L., Andries, L., & Moons, L. (2021). Müller glia–myeloid cell crosstalk accelerates optic nerve regeneration in the adult zebrafish. *Glia*, 69(6), 1444–1463. <https://doi.org/10.1002/glia.23972>
- Wallace, S. W., Singhvi, A., Liang, Y., Lu, Y., & Shaham, S. (2016). PROS-1/Prospero Is a Major Regulator of the Glia-Specific Secretome Controlling Sensory-Neuron Shape and Function in *C. elegans*. *Cell Reports*, 15(3), 550–562. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.051>
- Wang, W. E., Li, L., Xia, X., Fu, W., Liao, Q., Lan, C., Yang, D., Chen, H., Yue, R., Zeng, C., Zhou, L., Zhou, B., Duan, D. D., Chen, X., Houser, S. R., & Zeng, C. (2017). Dedifferentiation, Proliferation, and Redifferentiation of Adult Mammalian Cardiomyocytes After Ischemic Injury. *Circulation*, 136(9), 834–848. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024307>
- Weber, M., Mickoleit, M., & Huisken, J. (2014). Multilayer Mounting for Long-term Light Sheet Microscopy of Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 84, 51119. <https://doi.org/10.3791/51119>

- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron*, 43(5), 647–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.015>
- Wixon, J. (2000). *Danio rerio, the zebra@sh*. 7.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X., & Fan, X. (2013). Bergmann Glia Function in Granule Cell Migration During Cerebellum Development. *Molecular Neurobiology*, 47(2), 833–844. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8405-y>
- Yamada, K., & Watanabe, M. (2002). Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anatomical Science International*, 77(2), 94–108. <https://doi.org/10.1046/j.0022-7722.2002.00021.x>
- Zdebik, A. A., Mahmood, F., Stanescu, H. C., Kleta, R., Bockenbauer, D., & Russell, C. (2013). Epilepsy in kcnj10 Morphant Zebrafish Assessed with a Novel Method for Long-Term EEG Recordings. *PLoS ONE*, 8(11), e79765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079765>
- Zupanc, G. K. H., Hinsch, K., & Gage, F. H. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 488(3), 290–319. <https://doi.org/10.1002/cne.20571>

12. Apéndice

Tabla A1. Comparación de la morfología celular de la glía radial

3dpf				
Características	Prueba Mann-Whitney	Diferencia	Valor (P)	Significancia
Área del soma	Central vs. lateral	-2.6	.049	*
Longitud de los procesos	Central vs. lateral	-1.2	.790	ns
Número de procesos	Central vs. lateral	0.0	.094	ns

5dpf				
Características	Comparación múltiple Tukey's	Diferencia	Ajuste valor (P)	Significancia
Área del soma	CCe vs. Va	1.444	0.994	ns
	EG vs. Va	0.4621	>0.999	ns
	LCa vs. Va	7.371	0.549	ns
	EG vs. CCe	-0.9823	0.998	ns
	LCa vs. CCe	5.927	0.728	ns
	LCa vs. EG	6.909	0.601	ns
Longitud de los procesos	Va vs. CCe	-11.36	0.2422	ns
	Va vs. EG	-5.476	0.7343	ns
	Va vs. LCa	-15.46	0.0309	*
	CCe vs. EG	5.888	0.7747	ns
	CCe vs. LCa	-4.095	0.9159	ns
	EG vs. LCa	-9.983	0.2965	ns
Número de procesos	CCe vs. Va	-0.4638	0.1065	ns
	EG vs. Va	0.3308	0.3927	ns

LCa vs. Va	0.08882	0.9708	ns
EG vs. CCe	0.7946	0.0028	**
LCa vs. CCe	0.3750	0.2862	ns
LCa vs. EG	-0.4196	0.2227	ns

7 dpf

Características	Comparación múltiple Dunn's	Diferencia	Ajuste valor (P)	Significancia
Área del soma	CCe vs. Va	-3.743	>0.9999	ns
	EG vs. Va	-4.676	>0.9999	ns
	LCa vs. Va	-6.520	>0.9999	ns
	EG vs. CCe	-0.9333	>0.9999	ns
	LCa vs. CCe	-2.777	>0.9999	ns
	LCa vs. EG	-1.844	>0.9999	ns
Longitud de los procesos	Va vs. CCe	29.58	0.1330	ns
	Va vs. EG	1.005	>0.9999	ns
	Va vs. LCa	9.071	>0.9999	ns
	CCe vs. EG	-28.58	0.1775	ns
	CCe vs. LCa	-20.51	0.7859	ns
	EG vs. LCa	8.066	>0.9999	ns
Número de procesos	CCe vs. Va	-4.147	>0.9999	ns
	EG vs. Va	-0.2408	>0.9999	ns
	LCa vs. Va	-8.585	0.9772	ns
	EG vs. CCe	3.906	>0.9999	ns
	LCa vs. CCe	-4.438	>0.9999	ns
	LCa vs. EG	-8.344	>0.9999	ns

dpf: días postfertilización, CCe: cuerpo del cerebelo, Va: válvula del cerebelo, EG: eminencia *grauularis*, LCa: lóbulo caudal del cerebelo, ns: no significancia.

Tabla A2. Comparación de las señales de calcio de la glía radial por edad

Características	Campo	Comparación múltiple Kruskal Wallis	SS	DF	MS	Chi-sq	Valor (P)
Número de eventos	1	3, 5, 7 dpf	1.6X10 ⁶	2	7.99X10 ⁵	31.80	1.25X10 ⁻⁷
	2	3, 5, 7 dpf	4.9X10 ⁶	2	2.44X10 ⁶	24.64	4.46X10 ⁻⁶
	1vs2	c1-3-5-7 vs c2-3-5-7	2.9X10 ⁷	5	5.68X10 ⁶	63.36	2.46X10 ⁻¹²
Amplitud	1	3, 5, 7 dpf	1.1X10 ⁶	2	5.62X10 ⁵	22.95	1.04X10 ⁻⁵
	2	3, 5, 7 dpf	9.16X10 ⁶	2	4.58X10 ⁵	4.71	0.095
	1vs2	c1-3-5-7 vs c2-3-5-7	5.48X10 ⁷	5	1.10X10 ⁷	125.06	1.04X10 ⁻²⁵
Duración	1	3, 5, 7 dpf	1.95X10 ⁶	2	9.73X10 ⁵	45.99	1.03X10 ⁻¹⁰
	2	3, 5, 7 dpf	1.41X10 ⁶	2	7.06X10 ⁵	7.59	0.0225
	1vs2	c1-3-5-7 vs c2-3-5-7	3.01X10 ⁷	5	6.01X10 ⁶	74.10	1.44X10 ⁻¹⁴
Cinética de liberación	1	3, 5, 7 dpf	1.06X10 ⁶	2	5.28X10 ⁵	26.38	1.87X10 ⁻⁶
	2	3, 5, 7 dpf	6.98X10 ⁵	2	3.49X10 ⁵	4.29	0.12
	1vs2	c1-3-5-7 vs c2-3-5-7	1.22X10 ⁷	5	2.44X10 ⁶	33.54	2.94X10 ⁻⁶
Sincronía	1	3, 5, 7 dpf	2.60X10 ⁷	2	1.30X10 ⁷	360.66	4.82X10 ⁻⁷⁹
	2	3, 5, 7 dpf	1.95X10 ⁷	2	9.74X10 ⁶	227.86	3.31X10 ⁻⁵⁰
	1vs2	c1-3-5-7 vs c2-3-5-7	1.84X10 ⁸	5	3.69X10 ⁷	586.15	1.99X10 ⁻¹²⁴

dpf: días postfertilización, c1: campo 1, c2: campo 2, edad comparada: 3, 5 y 7 dpf.

Tabla A3. Comparación de las señales de calcio de la glía radial entre campos

Características	Campo	Comparación múltiple		Grupo 1	Grupo 2	Diferencia	Valor (P)	Significancia
Número de eventos	1	3 dpf	5 dpf	7.88	59.67	111.46	0.0190	*
		3 dpf	7 dpf	-92.76	-42.46	7.83	0.1174	ns
		5 dpf	7 dpf	-144.61	-102.13	-59.65	0.0000	***
	2	3 dpf	5 dpf	-235.18	-155.91	-76.64	0.0000	***
		3 dpf	7 dpf	-248.85	-165.54	-82.23	0.0000	***
		5 dpf	7 dpf	-68.06	-9.63	48.80	0.9210	ns
	1 vs 2	3 dpf	3 dpf	98.76	295.86	492.93	0.0003	***
		5 dpf	5 dpf	-236.78	-104.48	27.83	0.2149	ns
		7 dpf	7 dpf	43.91	176.92	309.93	0.0021	*
Amplitud	1	3 dpf	5 dpf	-156.42	-104.92	-53.43	0.0000	***
		3 dpf	7 dpf	-113.79	-62.80	-11.81	0.0109	*
		5 dpf	7 dpf	0.18	42.12	84.07	0.0488	*
	2	3 dpf	5 dpf	-119.84	-42.40	35.04	0.4047	ns
		3 dpf	7 dpf	-73.03	9.11	91.24	0.9635	ns
		5 dpf	7 dpf	-7.28	51.51	110.29	0.0998	ns
	1 vs 2	3 dpf	3 dpf	-623.89	-427.44	-230.99	0.0000	***
		5 dpf	5 dpf	-339.74	-211.30	-82.86	0.0000	***
		7 dpf	7 dpf	-425.12	-289.62	-154.51	0.0000	***
Duración	1	3 dpf	5 dpf	-193.47	-143.65	-93.83	0.0000	***
		3 dpf	7 dpf	-134.29	-85.26	-36.22	0.0001	***
		5 dpf	7 dpf	17.94	58.40	98.86	0.0021	*
	2	3 dpf	5 dpf	-137.59	-59.21	19.16	0.1795	ns
		3 dpf	7 dpf	-79.79	3.31	86.41	0.9952	ns
		5 dpf	7 dpf	4.56	62.52	120.49	0.0308	*
	1 vs 2	3 dpf	3 dpf	-561.81	-365.22	-168.63	0.0000	***
		5 dpf	5 dpf	-131.80	-3.97	123.87	1.0000	ns
		7 dpf	7 dpf	-235.58	-102.55	30.47	0.2391	ns

Cinética de liberación	1	3 dpf	5 dpf	-155.96	-106.84	-57.72	0.0000	***
		3 dpf	7 dpf	-110.18	-61.41	-12.64	0.0089	*
		5 dpf	7 dpf	5.65	45.43	85.21	0.0203	*
	2	3 dpf	5 dpf	-142.50	-66.58	9.35	0.0994	ns
		3 dpf	7 dpf	-138.42	-58.22	21.98	0.2046	ns
		5 dpf	7 dpf	-47.50	8.36	64.22	0.9345	ns
	1 vs 2	3 dpf	3 dpf	-334.33	-143.06	48.21	0.2710	ns
		5 dpf	5 dpf	-20.19	101.97	224.13	0.1637	ns
		7 dpf	7 dpf	-156.87	-27.75	101.37	0.9902	ns
Sincronía	1	3 dpf	5 dpf	-469.57	-411.08	-352.60	0.0000	***
		3 dpf	7 dpf	-505.31	-447.70	-390.08	0.0000	***
		5 dpf	7 dpf	-82.27	-36.61	9.05	0.1447	ns
	2	3 dpf	5 dpf	-415.54	-359.55	-303.57	0.0000	***
		3 dpf	7 dpf	-292.66	-237.13	-181.61	0.0000	***
		5 dpf	7 dpf	72.81	122.42	172.02	0.0000	***
	1 vs 2	3 dpf	3 dpf	-0.51	-0.35	-0.20	0.0000	***
		5 dpf	5 dpf	-0.39	-0.27	-0.15	0.0000	***
		7 dpf	7 dpf	-0.06	0.05	0.17	0.0008	***

Valor $P < 0.05^*$, 0.01^{**} , 0.001^{***} , dpf: días postfertilización.

Tabla A4. Comparación de las señales de calcio normoxia vs heptanol

Características	Mann-Whitney	Promedio	SD	Z	Valor (P)	Significancia
Número de eventos	control vs heptanol	6.5×10^6	1.2×10^5	49.33	0	****
Amplitud	control vs heptanol	7.1×10^6	1.3×10^5	23.39	0	****
Duración	control vs heptanol	6.5×10^6	1.2×10^5	5.89	1.9×10^{-9}	***
Cinética de liberación	control vs heptanol	5.7×10^6	1.1×10^5	6.35	1.0×10^{-10}	***
Sincronía	control vs heptanol	6.95×10^6	1.2×10^5	53.49	0	****

α 0.05*, $p < 0.001$ *** 0****, SD: desviación estándar, Z: valor z.

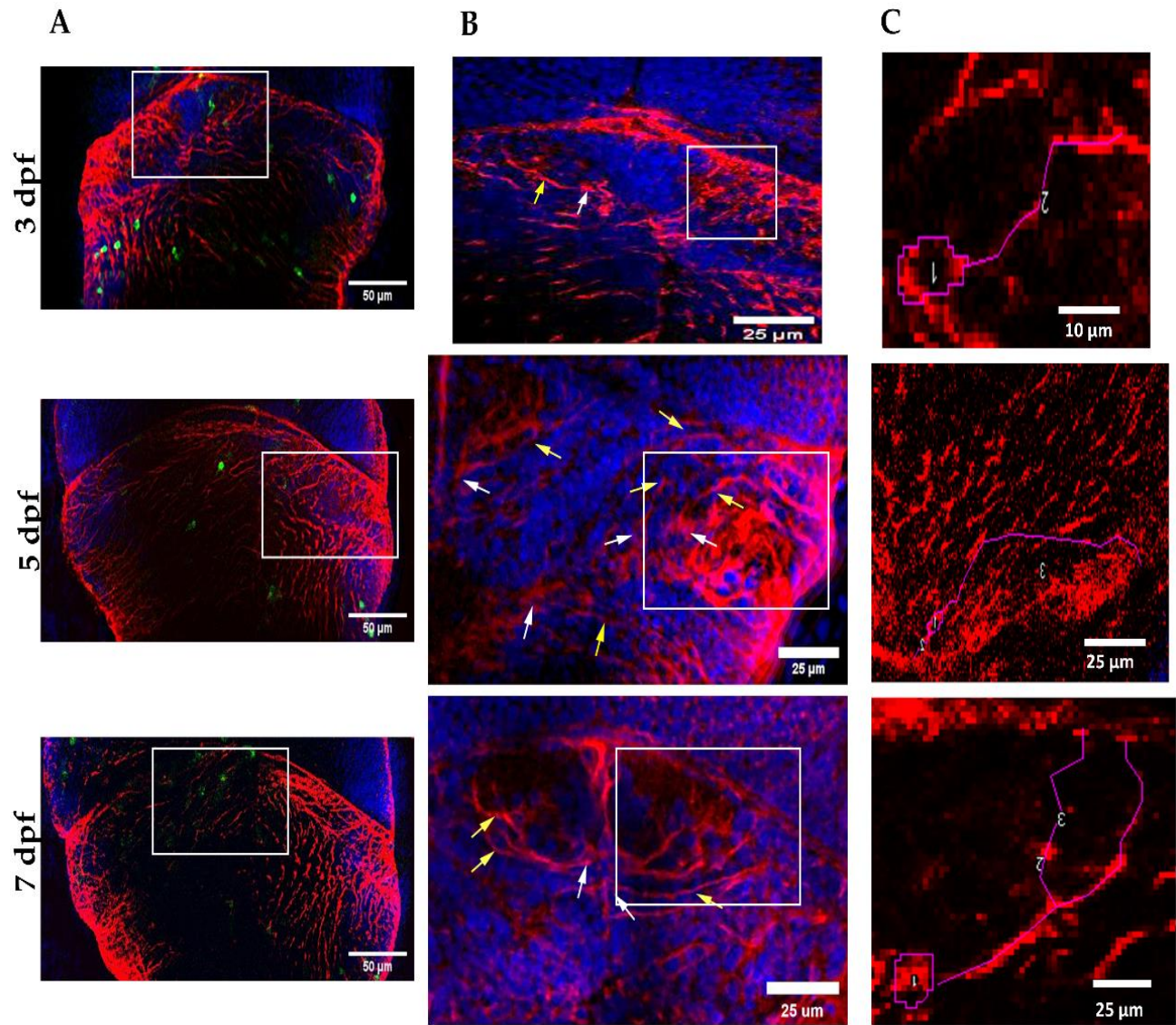


Figura A1. Glía radial y núcleos del cerebelo en pez cebra. **A.** Reconstrucción z-stack todo el cerebelo. Células gliales (GFAP⁺-rojo) y núcleos (DAPI-azul). **B.** Acercamiento (área-rectángulo A) a una región del cerebelo las flechas blancas indican el área del soma, las flechas amarillas señalan el proceso. **C.** Acercamiento celular (área-rectángulo B) GFAP⁺ el círculo indica la posición del soma y la línea delgada sigue el proceso en una reconstrucción 3D a través de z-stack.

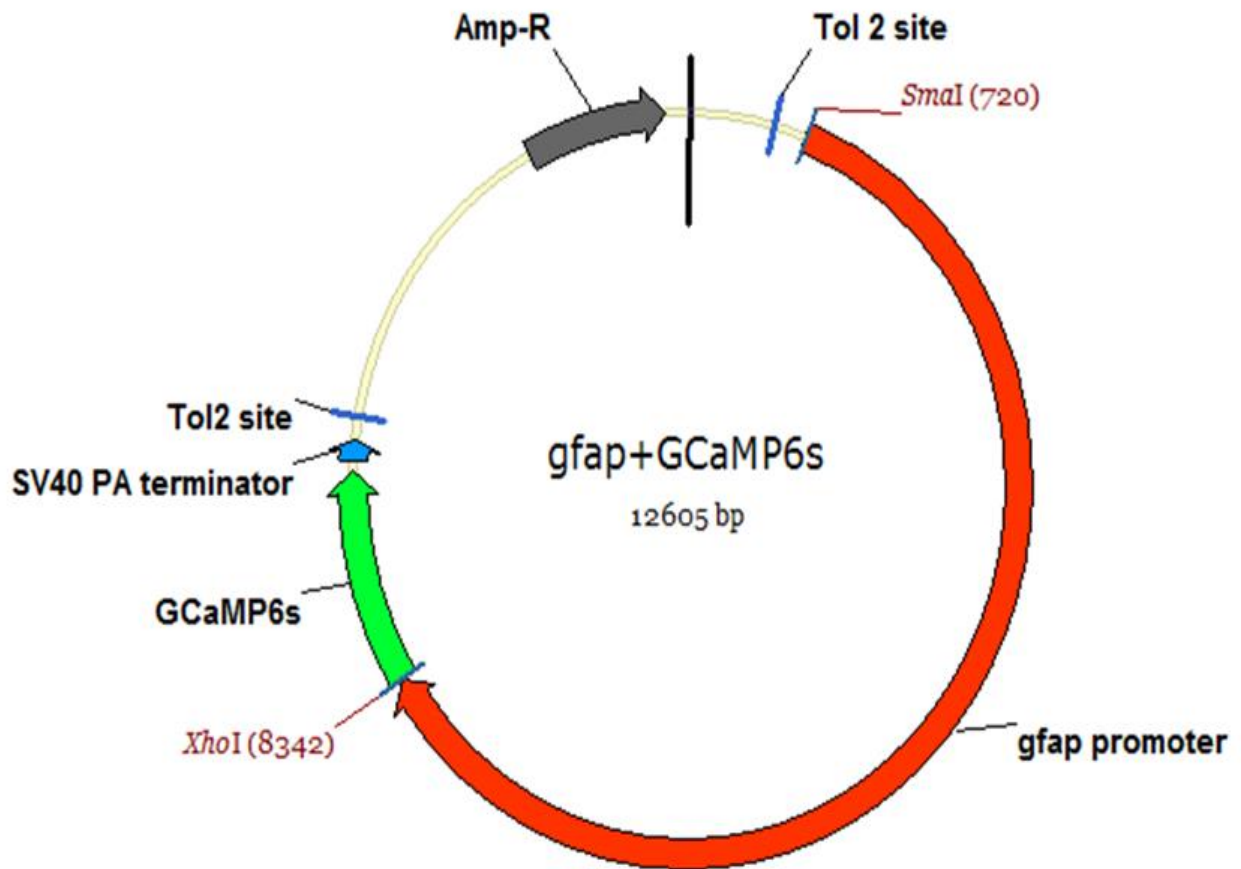


Figura A2. Mapa completo del plásmido pTol2-gfap-GCaMP6s.

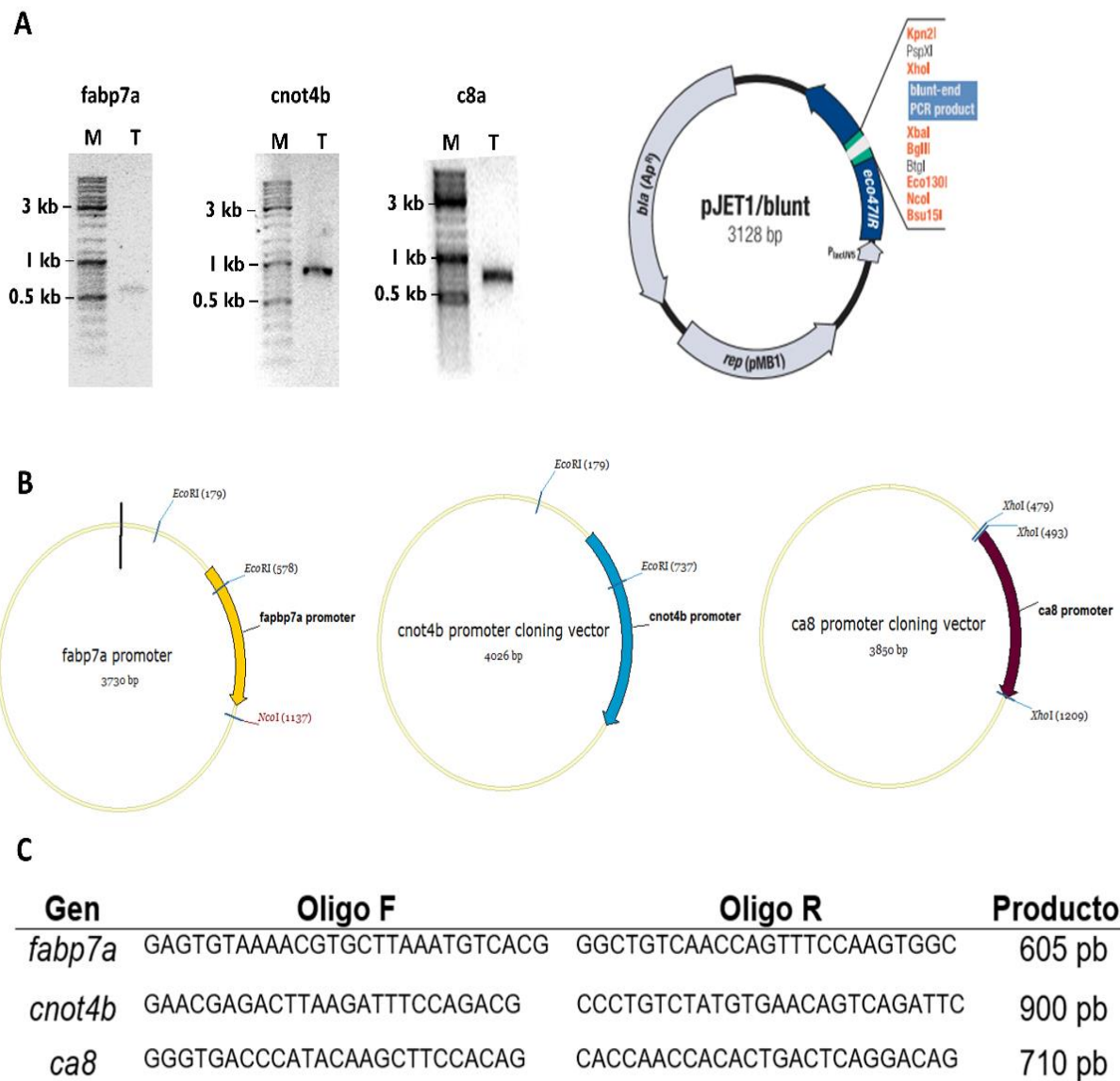


Figura A3. Clonación de promotores gliales a partir de DNA genómico. **(A)** Imágenes de los resultados del PCR de los promotores *fabp7a*, *cnot4b* y *ca8* (.60kb, 0.90 kb y 0.71 kb). Derecha: Plásmido host. **(B)** Mapas completos de cada promotor. **(C)**. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada promotor. M: marcador de peso molecular, T: producto de PCR, kb: kilobases, P: plásmido completo.



Article

Calcium Signaling in the Cerebellar Radial Glia and Its Association with Morphological Changes during Zebrafish Development

Elizabeth Pereida-Jaramillo , Gabriela B. Gómez-González , Angeles Edith Espino-Saldaña and Ataúlfo Martínez-Torres *

Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Campus UNAM Juriquilla, Queretaro CP76230, Mexico; elizabeth.pereida@comunidad.unam.mx (E.P.-J.); gabebyre@gmail.com (G.B.G.-G.); espinoedi@unam.mx (A.E.E.-S.)

* Correspondence: ataulfo@unam.mx; Tel.: +52-442-238-1064

Abstract: Radial glial cells are a distinct non-neuronal cell type that, during development, span the entire width of the brain walls of the ventricular system. They play a central role in the origin and placement of neurons, since their processes form structural scaffolds that guide and facilitate neuronal migration. Furthermore, glutamatergic signaling in the radial glia of the adult cerebellum (i.e., Bergmann glia), is crucial for precise motor coordination. Radial glial cells exhibit spontaneous calcium activity and functional coupling spread calcium waves. However, the origin of calcium activity in relation to the ontogeny of cerebellar radial glia has not been widely explored, and many questions remain unanswered regarding the role of radial glia in brain development in health and disease. In this study we used a combination of whole mount immunofluorescence and calcium imaging in transgenic (gfap-GCaMP6s) zebrafish to determine how development of calcium activity is related to morphological changes of the cerebellum. We found that the morphological changes in cerebellar radial glia are quite dynamic; the cells are remarkably larger and more elaborate in their soma size, process length and numbers after 7 days post fertilization. Spontaneous calcium events were scarce during the first 3 days of development and calcium waves appeared on day 5, which is associated with the onset of more complex morphologies of radial glia. Blockage of gap junction coupling inhibited the propagation of calcium waves, but not basal local calcium activity. This work establishes crucial clues in radial glia organization, morphology and calcium signaling during development and provides insight into its role in complex behavioral paradigms.



Citation: Pereida-Jaramillo, E.; Gómez-González, G.B.; Espino-Saldaña, A.E.; Martínez-Torres, A. Calcium Signaling in the Cerebellar Radial Glia and Its Association with Morphological Changes during Zebrafish Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13509. <https://doi.org/10.3390/ijms222413509>

Academic Editor: Nadia Soussi-Yanicostas

Received: 14 October 2021

Accepted: 12 December 2021

Published: 16 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: calcium waves; cerebellum; GECl; GFAP; Tol2

1. Introduction

The cerebellum is involved in sensorimotor processing function, and recent evidence also suggests its role in cognition and emotion [1,2]. Damage to the cerebellum may result in a series of motor disturbances, such as ataxia, and it has been argued that cerebellar dysfunction contributes to non-motor conditions, including autism [3–5]. Considering all the clinical implications of cerebellar function and that its defects can induce motor and other neurological conditions by interacting with diverse brain areas, there is emerging interest in studying the development and functional organization of the cerebellum.

The overall organization and cell types of the cerebellum are highly conserved from fish to mammals [6–8]. Radial glia cells are evolutionarily conserved embryonic neural stem cells that, in the adult cerebellum, remain as Bergmann glia [9,10]. The somas of the radial glia are aligned along the Purkinje cell layer, and, during early development, they extend thin processes toward the pia through which new neurons migrate to the cortical surface [11]. Radial glia cells are also transformed into multiciliate ependymal cells, and in adult fish they remain as neural stem cells [12,13].

Despite the fundamental role of radial glia for cerebellar development and function, little attention has been paid to their morphological and functional changes during early fish development. In contrast, more information has been gathered about the neuronal component. For example, neuronal differentiation in the fish cerebellum begins at 3 days post fertilization (dpf) and layered stratification occurs at 5 dpf [14]. At 4–7 dpf, Purkinje cells process sensory stimuli, such as light and touch, and at 5 dpf, larvae start to hunt and capture prey [15]. In addition, between 6–8 dpf, complex behaviors linked to learning movement are already encoded in the cerebellum [16]. Zebrafish is an attractive experimental model for understanding morphological and functional changes of cells during early brain development, and many studies in this model have focused on the organization and function of neurons and neuronal circuits [8,17]. However, since the discovery that the adult zebrafish brain repairs lesions after injury by inducing radial glia proliferation, new interest in the functional characteristics of these cells has emerged [18–20].

Similar to astrocytes, radial glia cells present calcium events called calcium waves that spread across several cells [21–23]. Calcium waves occur spontaneously, but require the expression of several key molecular components: the gap junction protein connexin 43, P2Y1 ATP receptors and intracellular inositol-3-phosphate mediated calcium release [24,25]. In the mouse embryo brain cortex, calcium waves from radial glia increase their frequency during neurogenesis, and, when calcium waves are blocked, ventricular zone cell proliferation is reduced [23]. In the adult mammal cerebellum, Bergmann glia shows concerted calcium activity during locomotor performance [26]. In addition, soluble substances, such as growth factors, positively regulate calcium waves, whereas inflammatory cytokines disrupt them [27].

Astrocytes and radial glia sense and modulate neuronal activity, indicating that neurons and glia reciprocally communicate [28,29]. While the origin and functional characteristics of calcium signaling are constantly investigated, the functional consequences for neuronal and glial circuits remain poorly understood. In this study, we constructed a transgenic zebrafish that expresses the genetically encoded calcium sensor GCaMP6s in radial glia to study the ontogenic appearance of calcium signaling during larval cerebellar development. The results showed that cerebellar radial glia display spontaneous calcium elevations even before neuronal circuit formation, and higher calcium activity coincided with an increase in radial glia morphological complexity. Finally, we show that pharmacological blockage of gap junctions inhibits the propagation of calcium waves.

2. Results

2.1. Distribution of Radial Glia in the Larval Zebrafish Cerebellum

To monitor the morphological changes of cerebellar radial glia during zebrafish development, we focused on larvae at 3, 5 and 7 dpf. GFAP-labeled radial glia cells were surveyed in optical sections obtained by confocal microscopy (N = 5 larvae per age). For reference, we divided the cerebellum into three sections: dorsal, medial, and ventral (Figure 1). At 3 dpf, most of the radial glia cells were vertically aligned along the antero-posterior axis and homogeneously distributed along the cerebellum (Figure 1B). The radial glia somas faced the inner-posterior side of the cerebellum, while their end-feet were pointed toward the anterior part, where they formed a continuum reaching the anterior edge of the cerebellar lobe. The ventricle is evident in the most dorsal section of the cerebellum. In the hindbrain, the radial glia somas faced the dorsal side, while the processes projected toward the ventral section (Figure 1B). In contrast, at 5 and 7 dpf (Figure 1), when the corpus cerebelli (CCe) and the auricle were already present, the radial glia cells adopted diverse morphologies. Radial glia distribution was similar between 5 and 7 dpf. At these times, the valvula cerebelli (Va) presented radial glia with long and dense processes aligned along the midline (Figure 1B). At 7 dpf, in the dorsal and medial section, the radial glia somas were located along the midline and projected their process to the lateral section, thus defining the caudal region of the Va (Figure 1B, yellow asterisks).

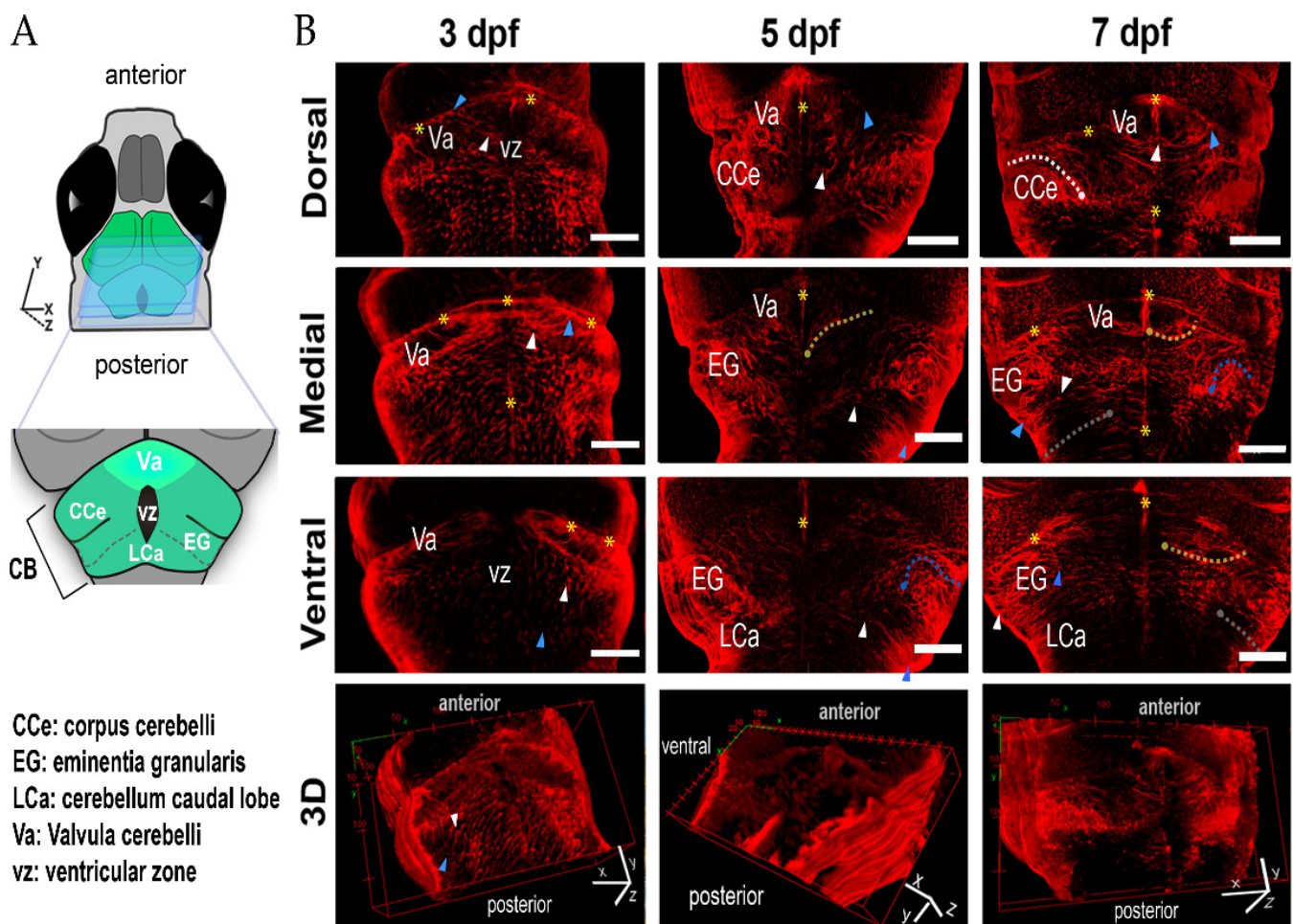


Figure 1. Radial glia cells during zebrafish development. (A) The scheme shows the regions of the cerebellum in the confocal images to the right. (B) Three representative optical sections of GFAP-labeled cerebella; radial glia are presented for each age: dorsal medial and ventral; the lower panels show the corresponding 3D reconstructions. In each plane, a representative soma (white arrowhead) and its end-feet (blue arrowhead) are depicted. Yellow asterisks indicate the midline and the continuum formed by the radial glia end-feet of the Va and CCe. Dashed lines show the trajectories of the radial glia processes. The position of the soma is indicated by a dot of the same color: Va, yellow dashed line; CCe, white dashed line; EG, blue dashed line; LCa, gray dashed line; dfp, days post fertilization; scale bars, 50 μm .

In the bilateral CCe, radial glia cells were aligned along the medial-lateral axis (Figure 1B, 7 dpf, upper panel, white dashed line). The somas were in the dorsal CCe and slightly bent inwardly while projecting toward the ventral section. In the medial section of the eminentia granularis (EG), the radial glia somas were tightly organized, and their processes bent inwardly (Figure 1B, blue dashed line), while, in the ventral EG, the radial glia somas were situated in the medial section and the processes were straight. At 7 dpf, in the caudal lobule (LCa), the radial glia cell morphology was homogeneous, with somas localized dorsally and straight processes projected ventrally (Figure 1B, gray dashed line).

2.2. Morphometric Analysis of Radial Glia during Development

Individual radial glia cells were analyzed to determine their morphology at 3, 5 and 7 dpf based on the GFAP labeling ($n = 64\text{--}70$ cells per group, $N = 5$ larvae, Figure 2A). To classify the different morphologies, we identified the number of processes per cell, the length of each process and the soma area. The cerebellum was divided into two regions at 3 dpf (lateral and central). At 5 and 7 dpf, we assessed the distribution of the morphologies in relation to the four regions of the cerebellum: Va, CCe, EG and LCa. The descriptive statistics obtained at different ages are summarized in Table 1, and the

descriptive statistics per cerebellar region at each analyzed age are shown in Table 2. The comparison between the morphologies among the different cerebellar regions at each analyzed age did not show significant differences in most cases (total statistical results are shown in Supplementary Table S1), indicating little variability in radial glia morphology at these ages (Figure 2B). However, we found some exceptions: at 3 dpf, the soma area was larger in the radial glia from the lateral zone than from the central zone ($21 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ vs. $26 \pm 2.0 \mu\text{m}^2$, respectively), and, at 5 dpf, the process length was larger in the LCa than in the Va ($67.7 \pm 4.7 \mu\text{m}$ vs. $52.3 \pm 3.3 \mu\text{m}$).

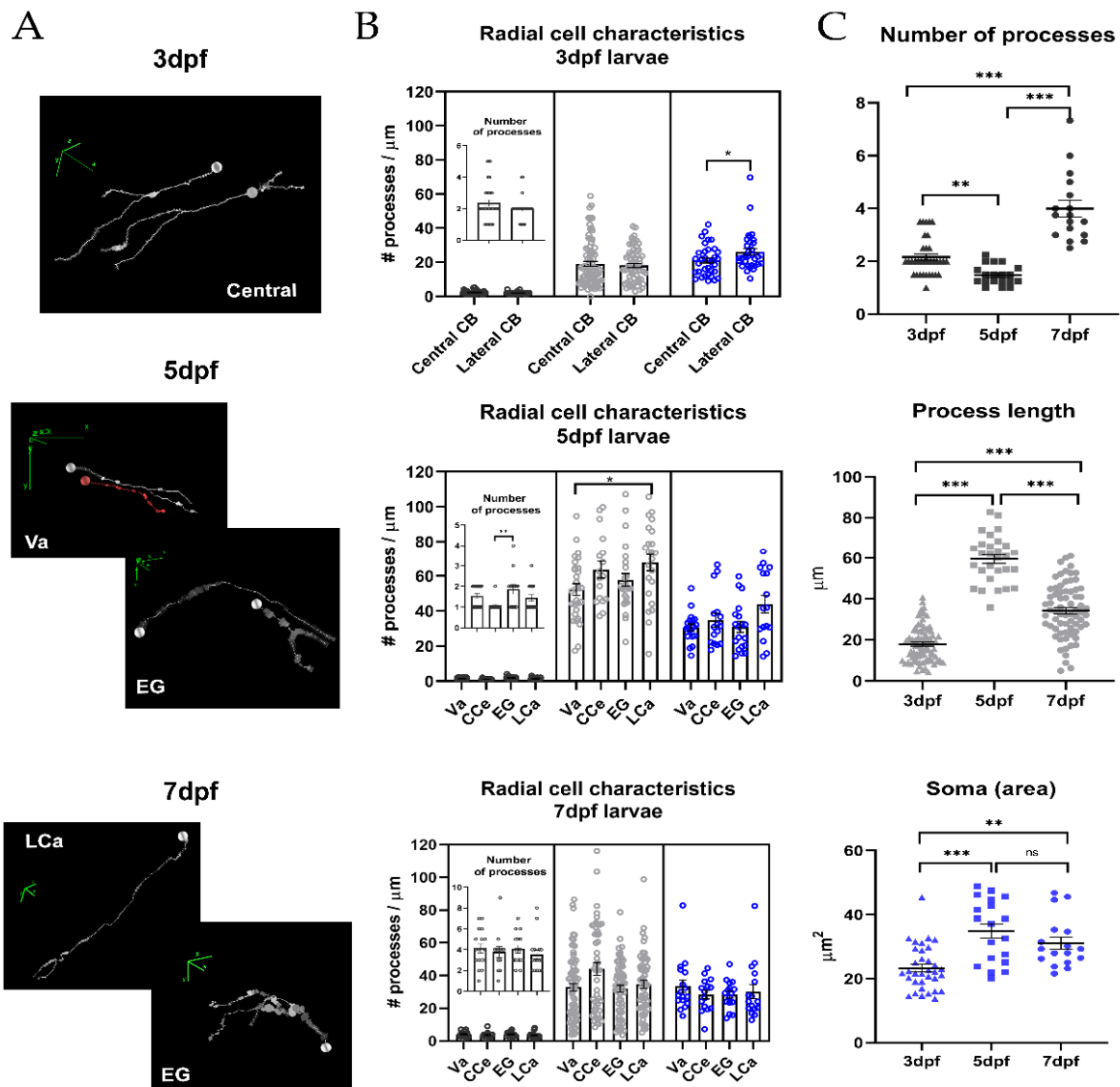


Figure 2. Morphometric characteristics of radial glia during cerebellar development. (A) Representative 3D reconstructions of radial glia randomly selected from different regions at 3, 5 and 7 dpf. The concentric rings along the process represent the spatial orientation and thickness of the process; in these representations, nuclei are indicated by a sphere, the processes in white and red lines and direction of the axis (x, y and z, green lines) (B) Nested graph showing the number (black dots), length (gray dots) of processes and soma area (blue dots, inset) in the different cerebellar regions at 3, 5 and 7 dpf (Va, CCe, EG and LCa; N = 5–7 larvae per stage). For simplification, only statistically significant differences are presented; cell somas at 3 dpf: central vs. lateral, $21 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ vs. $26 \pm 2.0 \mu\text{m}^2$, Mann–Whitney U test, (p -value 0.049 *, α 0.05), process length at 5 dpf: Va vs. LCa, $52.3 \pm 3.3 \mu\text{m}$ vs. $67.7 \pm 4.7 \mu\text{m}$, ANOVA–Tukey (p -value 0.0309 *, α 0.05). (C) Graphs comparing the characteristics of radial glia from the whole cerebellum between the three ages evaluated (Kruskal–Wallis Test, Dunn’s post hoc, α 0.05, p -value: 0.1 (ns), 0.05 *, 0.01 **, <0.001 ***), graphs show mean \pm SEM (see Table 2 for descriptive statistics).

Table 1. Characteristics of radial glia cells during cerebellar development.

Age	Number of Processes	Process Length (μm)	Area of Soma (μm^2)
3 dpf	2.16 ± 0.12	17.89 ± 0.97	23.28 ± 1.19
5 dpf	1.48 ± 0.09	59.53 ± 2.17	34.87 ± 2.27
7 dpf	3.99 ± 0.31	34.37 ± 1.56	31.13 ± 1.90

Table 2. Characteristics of radial glial cells in the cerebellum.

Age	Number of Processes		Process Length (μm)		Area of Soma (μm^2)	
3 dpf	Lateral ¹	Central ¹	Lateral ¹	Central ¹	Lateral ¹	Central ¹
	2.35 ± 0.20	1.97 ± 0.12	19.10 ± 1.50	18.10 ± 1.24	21.00 ± 1.51	26.20 ± 2.03
5 dpf	Va ¹	CCe ¹	Va ¹	CCe ¹	Va ¹	CCe ¹
	52.2 ± 0.12	63.6 ± 0.06	30.7 ± 3.3	34.8 ± 4.9	21.2 ± 3.0	22.7 ± 4.1
	EG ¹	LCa ¹	EG ¹	LCa ¹	EG ¹	LCa ¹
	57.70 ± 0.23	67.7 ± 0.16	31.0 ± 3.7	43.9 ± 4.7	21.7 ± 3.4	28.9 ± 5.2
7 dpf	Va ¹	CCe ¹	Va ¹	CCe ¹	Va ¹	CCe ¹
	4.12 ± 0.43	3.77 ± 0.53	32.9 ± 2.4	44.1 ± 3.9	33.5 ± 3.8	28.4 ± 2.6
	EG ¹	LCa ¹	EG ¹	LCa ¹	EG ¹	LCa ¹
	4.06 ± 0.37	3.50 ± 0.44	32.1 ± 2.1	34.7 ± 2.5	28.4 ± 2.2	30.3 ± 4.4

¹ Cerebellar region analyzed.

Due to the fast growth rate during the early stages of development, we found a remarkable variability in radial glia morphologies in all the parameters at 3, 5 and 7 dpf (adjusted p -value, α 0.05, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc test, Table 1, Figure 2C). A rapid increase in the cell soma area and process length from 3 (soma $17.89 \pm 0.97 \mu\text{m}^2$; process length $23.28 \pm 1.19 \mu\text{m}$) to 5 dpf (soma $59.53 \pm 2.17 \mu\text{m}^2$; process length $34.87 \pm 2.27 \mu\text{m}$) (p -value, <0.001 ***), in both) was followed by a significant reduction in the process length at 7 dpf ($31.13 \pm 1.90 \mu\text{m}$) compared to 5 dpf ($34.87 \pm 2.27 \mu\text{m}$) (p -value, <0.001 ***). We also observed that the cell soma area was reduced from 5 dpf ($59.53 \pm 2.17 \mu\text{m}^2$) to 7 dpf ($34.37 \pm 1.56 \mu\text{m}^2$) (p -value, >0.99 , ns). Interestingly, the number of processes per radial glia decreased from an average of $2.16 \pm 0.12 \mu\text{m}$ (at 3 dpf) to $1.48 \pm 0.09 \mu\text{m}$ at 5 dpf (p -value, 0.007 **), and twice fold to $3.99 \pm 0.31 \mu\text{m}$ at 7 dpf (p -value, <0.001 ***).

2.3. Calcium Signaling in Radial Glia during Development

After we established that the radial glia increased their morphological complexity during the first days of development, we assessed if this complexity was accompanied by differences in calcium activity. In order to record the activity, we used high-speed fluorescence microscopy in agar-embedded larvae with radial glia expression of GCaMP6s (Supplementary Figure S1) and at 5 and 7 dpf we divided the cerebellum into two regions: the dorsal region (field 1), where the somas and processes of the EG, CCe and LCa are located, and the ventral region (field 2), where somas and few processes of the Va and EG are located. At 3 dpf only the CCe and Va were evident, and the activity was recorded in fields 1 and 2 (Supplementary Figure S2).

Figure 3A shows sample fluorescence images of basal calcium activity during a period of 4.16 min in field 1 and field 2 at 5 dpf. Most of the changes in activity were detected in the cell somas (white dashed line), although some processes showed activity as well (red arrowheads). Thus, our set-up effectively detected basal calcium activity in the whole cerebellum of the paralyzed fish. Regions of interest were detected with the astrocyte quantification and analysis (AQuA) software, and the radial glia soma and processes were covered with a random color mask (Supplementary Figure S2).

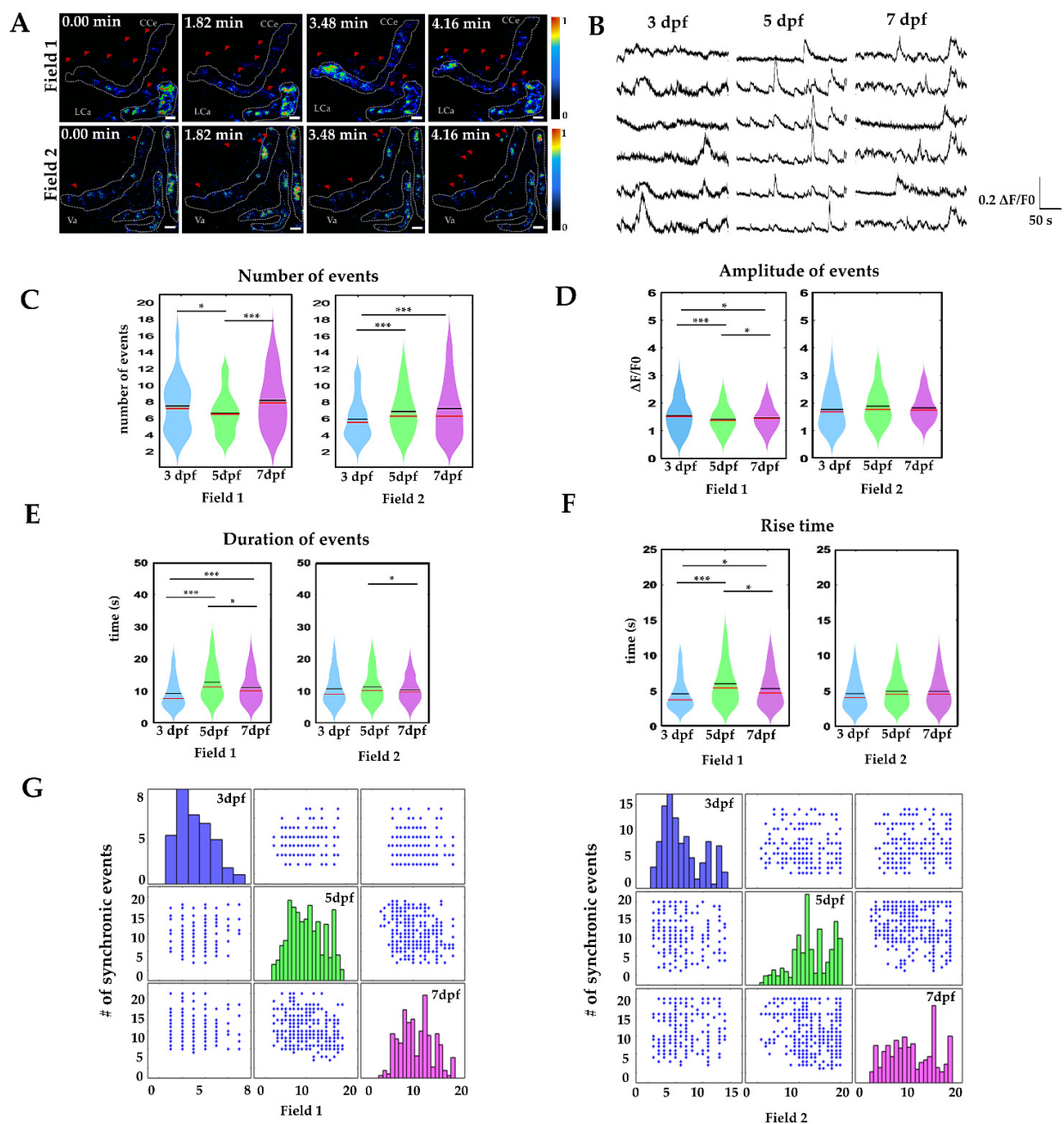


Figure 3. Calcium signalling during cerebellar development. (A) Calcium imaging in the lateral cerebellum at 5 dpf. A white dashed line delimits the radial glia somas; red arrowheads indicate activity in radial glia processes. (B) Sample recordings of calcium activity ($\Delta F/F_0$ during 4.16 min, at 3, 5 and 7 dpf in field 1). (C) Number of calcium events in 4.16 min. (D) Amplitude of calcium events ($\Delta F/F_0$). (E) Duration of calcium events (in seconds). (F) Rise time of calcium events (in seconds). The boxplots show data distribution, mean values (black line) and media (red line). Nonparametric statistics, Kruskal–Wallis test, α 0.05, p -value < 0.05 *, p -value < 0.001 **, p -value < 0.0001 ***. (G) Number of synchronic calcium events at 3 dpf, 5 dpf, 7 dpf (blue, green and magenta bars, respectively, scatter plot of x columns against y axes). For these experiments, at least 6 larvae per age and per field were recorded. Calcium events recorded per field 3 dpf $n = 200$, 5 dpf, $n = 750$, 7 dpf $n = 400$; scale bar 20 μm .

Changes in fluorescence over time ($\Delta F/F_0$) were obtained from time-lapse movies (Figure 3A,B) and multiple comparisons between groups were performed. First, we found that, at 3 dpf, the number of calcium events in fields 1 and 2 was significantly different ($7.4 \pm 0.36/4$ min vs. $5.50 \pm 0.23/4$ min, p -value < 0.001 ***), at 5 dpf no difference was found between the number of events in fields 1 and 2, ($6.15 \pm 0.21/4$ min vs.

6.79 ± 0.13/4 min), and, at 7 dpf, the number of calcium events was again significantly different between fields 1 and 2 (8.4 ± 0.26/4 min vs. 7.29 ± 0.21/4 min, p -value < 0.05 *). Then we compared the calcium events between stages. We noticed an increase in the number of events from 5 to 7 dpf (field 1: 3 dpf, 7.4 ± 0.36/4 min vs. 5 dpf, 6.15 ± 0.21/4 min p -value < 0.05 * vs. 7 dpf, 8.43 ± 0.26/4 min p -value > 0.05 ns, and field 2: 3 dpf, 5.50 ± 0.23/4 min vs. 5 dpf, 6.79 ± 0.13/4 min vs. 7 dpf, 7.29 ± 0.21 p -value = 0.001 ***, Figure 3C).

Next, we determined amplitude variations over time, duration and rise time of the calcium events. We found that, in field 1, the calcium event amplitude was larger at 5 dpf (1.65 ± 0.04 ΔF/F0) and 7 dpf (1.48 ± 0.03 ΔF/F0) than at 3 dpf (1.34 ± 0.06 ΔF/F0) p -value < 0.05 * and <0.001 ***, while, in field 2, the amplitude remained constant (3 dpf 1.77 ± 0.04 ΔF/F0, 5 dpf 1.83 ± 0.02 ΔF/F0, 7 dpf 1.73 ± 0.02 ΔF/F0, Figure 3D). The duration of the calcium events was longer in field 2 than in field 1 at 3 dpf (field 1: 6.94 ± 0.47 s vs. field 2: 10.46 ± 0.46 s, p -value < 0.001 ***) however, the durations were similar between fields at 5 dpf (field 1: 11.38 ± 0.43 s vs. field 2: 11.25 ± 0.24 s) and at 7 dpf (field 1: 9.27 ± 0.35 s vs. field 2: 9.96 ± 0.24 s) p -value > 0.05 ns. The duration of calcium events was different between analyzed ages in field 1. A sharp increase was observed from 3 to 5 dpf, followed by a reduction at 7 dpf (field 1: 3 dpf, 6.94 ± 0.47 s vs. 5 dpf, 11.38 ± 0.43 s and 7 dpf, 9.27 ± 0.35 s p -value < 0.001 ***; Figure 3E). We next explored the rise time of the calcium events. We did not find differences between rise time in field 1 and field 2 at 3 dpf (2.64 ± 0.19 s vs. 3.05 ± 0.15 s). The rise time was faster in field 1 at 3 dpf (2.64 ± 0.19 s) compared to 5 dpf (4.11 ± 0.18 s) p -value < 0.001 *** and 7 dpf (3.40 ± 0.15 s) p -value < 0.05 *. In contrast, we did not find differences in rise time in field 2 (3 dpf, 3.05 ± 0.15 s; 5 dpf, 3.38 ± 0.08 s; 7 dpf, 3.38 ± 0.11 s; Figure 3F).

Finally, to understand how the dynamics of calcium oscillations changed during development, we determined the interactions between the number of simultaneous calcium transient events over time in field 1 and field 2 at 3, 5 and 7 dpf. At 3 dpf, few synchronized events occurred during the recording time (an average of 3 and 6 events in field 1 and 2, respectively) which occurred between 1–2 pairs of radial glia cells in field 1, and about 3–4 radial glia cells in field 2. At 5 dpf, the synchronization events were more frequent in field 1, which showed an average of 10 events with 2–10 synchronized radial glia cells, while field 2 showed a peak of 18 events with 20 synchronized radial glia cells. At 7 dpf, synchronized radial glia cells, were slightly higher than at 5 dpf. In field 1 the peak of synchronized activity consisted of 20 events in which 16 radial glia cells were synchronized, while, in field 2, the peak of synchronized activity was of 10 events in which 20 radial glia cells were synchronized (Figure 3G). These data indicate that the calcium events and their synchronization to form functional networks correlate with the development of morphological complexity in radial glia cells.

2.4. Calcium Waves in the Developing Cerebellum

Calcium elevations appear spontaneously affecting neural circuits and vasculature. In mammals, calcium waves propagate through radial glia in the embryonic ventricular zone in response to electrical or mechanical stimuli [23]. After we showed that many calcium events occur spontaneously in the developing cerebellum in zebrafish, we evaluated their synchronization to generate calcium waves.

Using time-lapse calcium imaging, we observed spontaneous calcium activity in the radial glia in field 1 occurring in small cell clusters at 3 dpf. At this age, 46 events per minute were observed in 149.5 ± 2.25 cells and the activity spread only to small cell clusters (no more than 4.94 μm). Calcium waves were effectively detected from 5 dpf in the cerebellum. At this age, 735.79 events per minute were observed and 2391.30 ± 39.24 cells on average were synchronized to form a calcium wave. Unexpectedly, the calcium activity was reduced at 7 dpf to 453.74 events per minute and 1474.70 ± 7.6 cells synchronized to form a calcium wave. Figure 4 shows raster plots of the events detected per age; the plots show evidence of the synchronized events of multiple cells during the recording time.

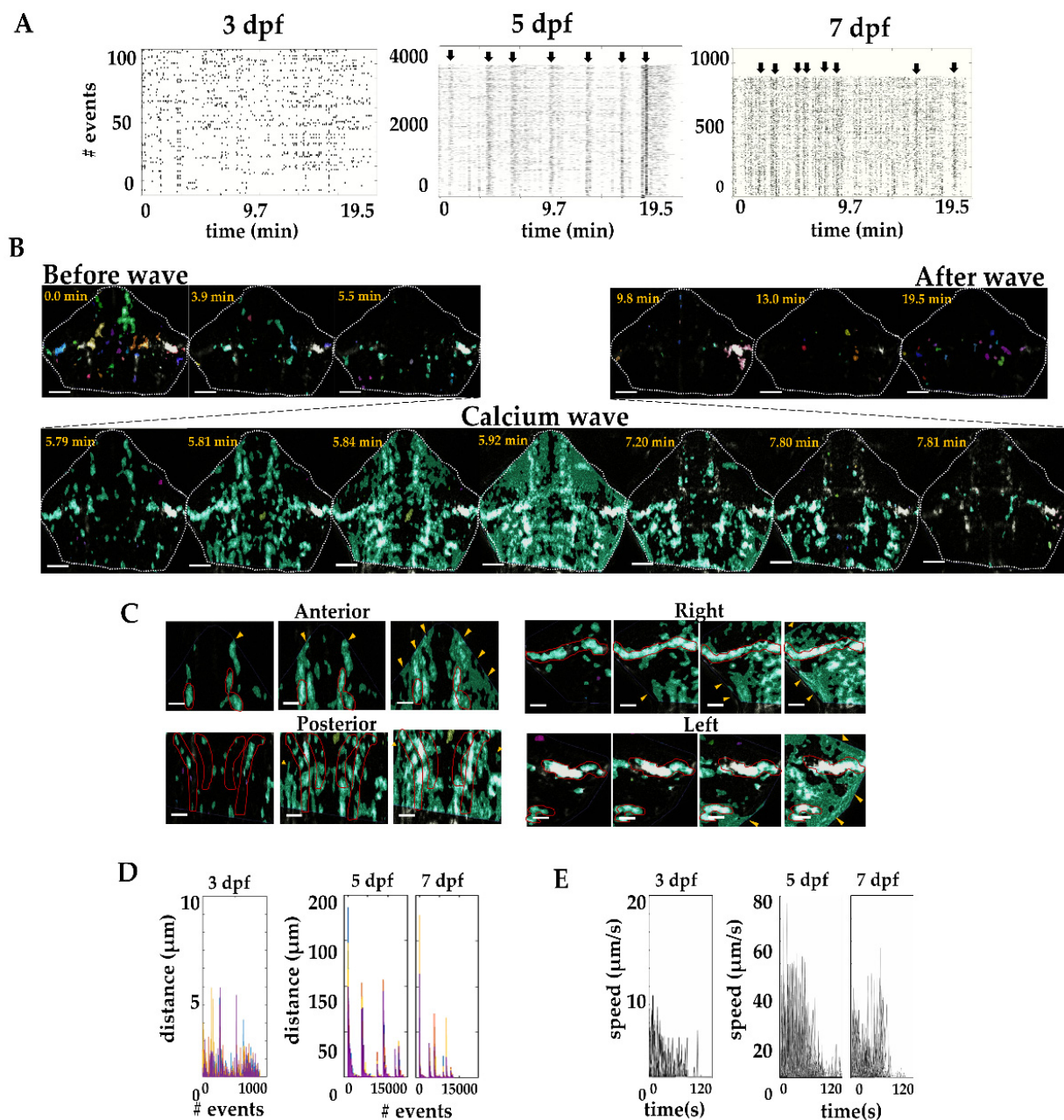


Figure 4. Calcium waves in the cerebellum. (A) Calcium events at 3, 5, and 7 dpf (each region of interest is aligned in time and each event is represented by a black dot, black arrows indicate the waves). (B) A calcium wave at 5 dpf. The calcium waves spread from the most posterior region of the cerebellum to the anterior region (white dashed line delineates the cerebellum). (C) Sample images of calcium activity spreading within radial glia in the lateral regions (left-right) and anterior and posterior regions. Red lines indicate the mid area where the radial glia somas are located, and yellow arrowheads indicate the pial surface where the terminal end-feet of the radial glia are located. (D) Spreading distance of calcium waves (as shown in (A)). At 5 and 7 dpf, only about 2% of the events propagated to form a calcium wave. (E) Calcium wave speed at 3, 5 and 7 dpf. 3 dpf, $n = 897$; 5 dpf, $n = 14348$; 7 dpf, $n = 8848$. $N = 6$ larvae per age. Scale bar 50 and 20 μm .

The spread of calcium waves was directional. They first started in the most posterior end of the cerebellum and spread to the anterior region (Figure 4B). Indeed, calcium waves seem to be global events that start in the hindbrain, pass through the cerebellum and continue to the midbrain (Supplementary Video S1); however, in this report, we focused only on the events recorded in the cerebellum. In this region, the calcium activity was first detected in the somas of the radial glia, then it spread to the cell processes reaching the end-feet at the pial surface. Eventually the activity disappeared, first from the processes

and finally from the soma (Figure 4C) before a new wave arrived. To further classify the characteristics of the calcium activity during cerebellar development, we divided the events in three groups: (a) non-spreading events ($<20 \mu\text{m}$), (b) short-distance spreading events ($20\text{--}60 \mu\text{m}$), and (c) long-distance spreading events ($> 60 \mu\text{m}$). At 3 dpf, all the events detected were non-spreading events (897 events $4.29 \pm 0.48 \mu\text{m}$ distance). However, at 5 dpf 127, events spread were short distance $32.21 \pm 10.46 \mu\text{m}$ and, 3437 events spread long distance ($138.71 \pm 18.75 \mu\text{m}$); these calcium waves propagated with low frequency, but recruited most of the cells of the cerebellum. Finally, at 7 dpf 8820 events were non-spreading events ($0.21 \pm 0.01 \mu\text{m}$), 25 events spread were short distance ($30.34 \pm 1.77 \mu\text{m}$) and 2500 events spread long distance ($101.65 \pm 19.20 \mu\text{m}$) (Figure 4D). The velocity of the events fluctuated over time, the maximal velocity at 3 dpf was $10 \mu\text{m/s}$ and increased at 5 and 7 dpf to around $40\text{--}60 \mu\text{m/s}$ (Figure 4E). Collectively, our data show patterns of calcium activity associated with the developmental morphological complexity of radial glia in the cerebellum.

2.5. Effect of Gap Junction Blockage on Calcium Waves

Many different models have been proposed to understand the molecular components that give rise to calcium waves. Cell coupling via gap junctions is central to explaining the formation of calcium waves, since gap junctions are permeable to small molecules, including calcium and inositol-3-phosphate [23,30–32]. Thus, we analyzed the spread of calcium waves after exposing the fish to heptanol, a well-known gap junction blocker [33]. As in the previous section, the calcium events were analyzed with AQUA software ($N = 6$ larvae per condition Figure 5A).

Basal cerebellar calcium activity of a fish treated with $500 \mu\text{M}$ heptanol for 30 min is shown in Supplementary Video S2, and Figure 5 shows sample images selected from the same video to illustrate maximal calcium wave spread in controls (Figure 5A panel 1) and short-distance propagation in heptanol treated fish (Figure 5A panel 2). This series of images shows that heptanol severely affects the dimensions of the calcium wave activity as compared to a non-treated fish, strongly suggesting the role of gap junctions in the propagation of calcium waves. Further analysis of the dynamics of calcium waves showed differences in synchrony of calcium events (Figure 5B, control $21.96 \pm 0.10/19.5 \text{ min}$ vs. heptanol $3.62 \pm 0.06/19.5 \text{ min}$, $p\text{-value} < 0.00001$ ****), number of events (Figure 5C, control $35 \pm 0.17/19.5 \text{ min}$ vs. heptanol $4.77 \pm 0.11/19.5 \text{ min}$, $p\text{-value} < 0.00001$ ****), amplitude of events (Figure 5D, control $2.34 \pm 0.01 \Delta\text{F}/\text{F}_0$ vs. heptanol $1.57 \pm 0.02 \Delta\text{F}/\text{F}_0$ $p\text{-value} < 0.00001$ ****), the duration of events (Figure 5E, control $13.32 \pm 0.08 \text{ s}$ vs. $13.09 \pm 0.37 \text{ s}$, $p\text{-value} < 0.0001$ ***) and rise time (Figure 5F, control $4.03 \pm 0.02 \text{ s}$ vs. heptanol $4.95 \pm 0.12 \text{ s}$, $p\text{-value} < 0.0001$ ***)).

Heptanol severely affected the spread of calcium waves, since treated fish only showed non-spreading activity (1467 events $2.89 \pm 1.75 \mu\text{m}$), in contrast to untreated fish, which showed all three kinds of activities: non-spreading events ($14,188$ events $0.43 \pm 0.02 \mu\text{m}$), short-distance events (127 events $32.21 \pm 10.46 \mu\text{m}$) and 33 long-distance events ($138.71 \pm 18.75 \mu\text{m}$) Figure 5G.

Synchronic calcium events were eliminated by heptanol treatment as shown in Figure 5B,H, where black arrows indicate synchronic events in control condition; however, no events were detected under heptanol treatment. This plot also shows evidence of the reduction of the number of calcium events induced by heptanol, where 75 events per minute were detected in 244 ± 7.6 cells, in contrast to the control, in which 735 events per minute were detected in 2391 ± 39.24 cells. Finally, the maximal speed of calcium events was reduced from $40\text{--}60 \mu\text{m/s}$ in control fish to $15\text{--}25 \mu\text{m/s}$ in heptanol treated fish (Figure 5I). These data indicate that, at 5 dpf, gap junctions are fundamental for propagation of calcium waves and, upon heptanol-induced blockage, most of the activity detected comes from intracellular calcium stores.

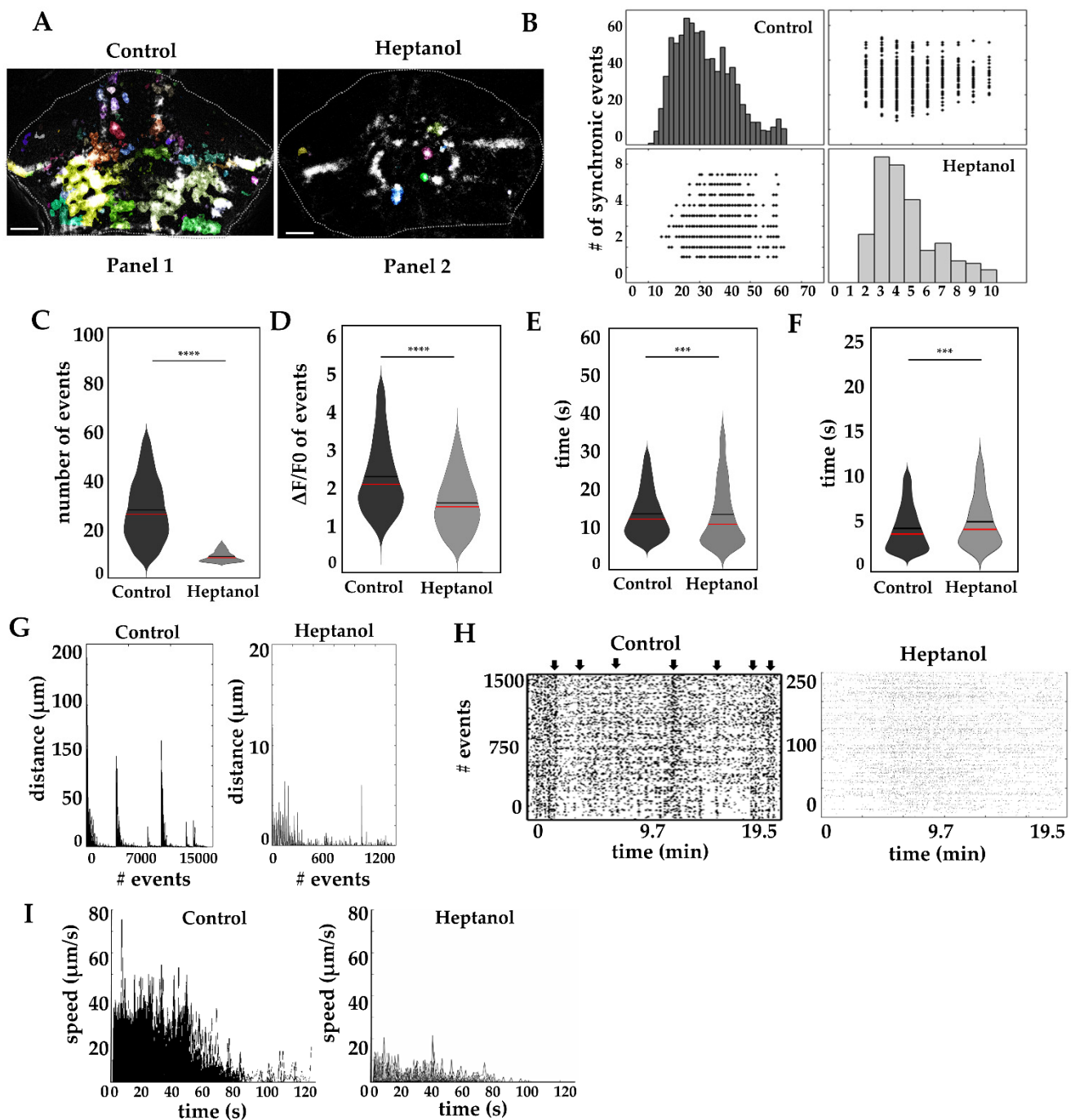


Figure 5. Calcium waves disruption in radial glia. (A) Calcium events in fish cerebellum after heptanol treatment (events with changes in fluorescence are shown with a multicolor mask, and the white dashed line delineates the cerebellum). Panel 1, long-distance spreading in control cerebellum, Panel 2 non-spreading events in heptanol treated fish. (B) Synchronic calcium events are reduced by heptanol treatment (black and gray bars, control and heptanol respectively). Scatter plot of x columns against y axes (C) Number of calcium events in 19.5 min. (D) Amplitude ($\Delta F/F_0$). (E) Duration (in seconds). (F) Rise time (in seconds). (G) Propagation distance (in μm) of calcium events. (H) Raster plots of calcium waves (each region of interest is aligned in time and each event is represented by a black dot, black arrows indicate the time of occurrence of a calcium wave). (I) Maximal speed of calcium waves ($\mu\text{m/s}$). The box plots show data mean values (black line), media (red line) and data distribution. Non-parametric statistics, Mann–Whitney U test, α 0.05, p -value < 0.0001 ***, 0.00001 ****. All recordings were obtained from 5 dpf larvae. 6 larvae were recorded for each condition. Calcium events recorded in control fish $n = 14,348$ and in heptanol $n = 1467$. Scale bar in A 50 μm .

3. Discussion

By employing a combination of morphometric analysis and live-cell calcium activity in zebrafish, we have identified critical events in the development of cerebellar radial glia. Specifically, we show that the morphology complexity of radial glia is related to the appearance of synchronic calcium events and calcium waves. We found that, at 3 dpf, most of the radial glia cells had two short processes and a small soma; in addition, calcium events were scarce, brief and did not propagate across cells. At 5 dpf, somas and processes were larger and calcium events began to appear and were more frequent and lasted longer. At 7 dpf, the cell processes retracted; however, there were more processes per radial glial cells while the calcium events remained constant.

Radial glial cells have been largely studied in the context of the origin of the complex primate brain cortex, where several morphological subtypes have been identified [34–37]. Our study shows that radial glia of the developing zebrafish cerebellum radically changes between 3 and 7 dpf. At 3 dpf, these cells are homogeneously distributed with their somas aligned along the midline and their processes project ventrally. Then, with the emergence of the CCE and the auricle at 5 dpf, new radial glial cells occupy these areas and reorganize due to an increase in the size of the cerebellum. At 7 dpf, the radial glia somas are aligned along the midline, but their processes project laterally. In this regard, it has been shown that spatiotemporal gene expression trajectories during maturation of human telencephalon gives rise to diverse radial glial cell types related to temporally and spatially restricted trajectories [38]. It will be interesting to determine how the transcriptomic landscape of zebrafish radial glia cells evolve during early development and how it compares to the juvenile and adult transcriptomic profiles [19,39].

The emergence of the morphological complexity of radial glia cell processes is temporally related to the origin of calcium activity. Gap junction coupling through somas and processes of neighboring cells is functional when the cerebellar cells layers are formed at 5 dpf. At this age, the somas and processes lengths almost doubled from 3 dpf, although the number of processes was transiently reduced (Figure 2). We found that the structures that form the cerebellum (field 1 and field 2) showed differences in their calcium activity, which might be related to different neuronal activity.

The expression of the basic molecular components that give rise to calcium communication in astrocytes and radial glia is already present at 3 dpf [40–42]; however, the activity is mostly local. Interestingly, the duration of calcium events at 5 dpf in the cerebellum (11.38 ± 0.43 s) is similar to that of astrocytes in the hindbrain at 6 dpf (12 ± 5 s) [43]. Calcium transmission is relevant for the generation and migration of new neurons during development [44,45], and here we have generated a model to study the involvement of calcium waves during early development, with the potential for applications in the study of neuropathogenic models.

4. Materials and Methods

4.1. Zebrafish Housing Care

Adults zebrafish (TABWIK) were used at 28 °C and under 14:10 light-dark cycles. The fish were bred and housed as reported before [46,47]. Protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Institute of Neurobiology, UNAM (Protocol number. 95A approved on April 2016).

4.2. Molecular Biology

Plasmid pTol2-gfap-GCaMP6s (Supplementary Figure S1A) was generated by substituting the elav13 promoter of pTol2-elav13-GCaMP6s (Addgene plasmid #59531 Watertown, MA, USA) for the gfap promoter form p5E-gfap (Addgene plasmid #75024, Watertown, MA, USA) by direct cloning using the Xho I (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Sal I (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) restriction sites.

4.3. Generation of the Tg (*pTol2-gfap-GCaMP6s*)

Adult zebrafish were mated and the embryos collected in E3 medium (Hank's medium with-HEPEs pH 7.4). Embryos were injected at 1-cell stage with 0.5–1.0 mixture 25 pg mRNA transposase and 25 pg DNA of plasmid (*pTol2-gfap-GCaMP6s*), 0.01% phenol red and then dissolved the mixture in 10 mM KCl (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) [48,49].

After 24 h post-injection, embryos were screened under an epifluorescence microscope. Positive embryos were bred and, after 3–4 months, adults were mated to obtain the F1 offspring. F1 were screened by epifluorescence and genotyped by PCR (Supplementary Figure S2B,C). (Primers forward CTCGAGAACGTCTATATCAAGGCCG and reverse TCACTTCGCTGTCATCATTGTACA).

4.4. Whole Mount Immunohistochemistry

We used a modified protocol as reported in [50]. Briefly, 1% tricaine (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) were added to larvae at 3, 5 and 7 dpf for 10 min. Then, the larvae were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) overnight at 4 °C, transferred to a glass container, washed for 5 min with phosphates-buffered saline (PBS) pH 7.4, then washed with ddH₂O and permeabilized for 5 min in ice-cold acetone (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Blocking solution (PBS with 2% goat serum (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) was added and incubated for 2 h at room temperature and washed 5 times for 10 min with PBS/BSA1% (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) at room temperature. Primary antibody anti-GFAP (1:250, #GTX128741 GeneTex, Irvine, CA, USA) was added and incubated for 3 days at 4 °C. Then, larvae were washed 7 times for 10 min with PBS at room temperature. Secondary antibody anti-rabbit Alexa fluor 594 (1:500, #AB150080 Abcam, Cambridge, UK) was added and incubated for 2 days at 4 °C. Larvae were washed 7 times for 10 min with PBS at room temperature. DAPI (1:5000, D1306 Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) was added and incubated for 1 h and then washed 7 times for 10 min with PBS at room temperature. Larvae were incubated in 25, 50, 75 and 100% glycerol (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) for 20 min and finally, stored at 4 °C.

4.5. Confocal Imaging

For confocal images, whole larvae were mounted in slices with 2% low melting agarose (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) in dorsal position and observed under Confocal Zeiss 780 LSM microscope (Plan-Apochromat 1 mm Korr DIC 25X, 0.8 NA). The lasers used were Argon A488, DPSS 561-10 and Chameleon Ultra-Ti:Sapphire 690-1064. For whole cerebellum imaging, a z-stack of 50–65 µm was processed with an interval of 1.3 µm for 1024 × 1024 pixels.

4.6. Morphological Analysis

Confocal z-stack (50–65 µm depth) from the caudal encephalon were processed using ImageJ/FIJI software (2.35 version, Bethesda, MD, USA) [51]. The regions of interest of the cerebellum were cropped, and the autofluorescence emitted by the skin and outer layer was removed by applying the tool “erase” of FIJI in every z-plane. Later, the GFAP-labeled and DAPI signals were split and processed independently. The GFAP-labeled background was subtracted (rolling ball radius, 60–70 pixels) and the general contrast increased by 0.1% saturated pixels. The local contrast was enhanced (CLAHE function, block size: 150–200, slope: 2) and the unsharp mask filter was applied (radius 1.0 mask weight 6.0). In the case of the DAPI signal, only the unsharp mask filter was applied. Finally, to visualize the radial glia during development, z-stacks were divided into three zones (ventral, medial and dorsal) and each one projected in a single plane (max intensity mode). The 3D reconstructions were built with the z-stacks processed using the 3D viewer plugin of FIJI.

To determine the characteristics of radial glia according to the GFAP-labeled signal, we used the segmented line tool to draw the processes through pre-processed z-stacks and the freehand tool to draw the soma. Following this, each element was converted into a

region of interest (ROI Manager Tool of FIJI). Total area and number and length of processes were determined (with the Measure Tool of FIJI) and the results were organized by dpf and cerebellar region [52].

4.7. Statistical Analysis of Radial Glial Cell Morphology

Descriptive statistics (mean, SD, SEM) of cell morphological parameters from larvae at 3, 5, and 7 dpf were obtained from $N = 5$ larvae per age. The difference between groups was determined by the Kruskal–Wallis test, followed by a post hoc Dunn's multiple comparisons test. Differences between cerebellar region per age, were determined by a one-way ANOVA test followed by Tukey's post hoc test. Finally, differences between central and lateral regions at 3 dpf were assessed by the Mann–Whitney U test. In all cases, we used an alpha, 0.05; results are reported as mean \pm SEM, while p -value significance is reported as 0.10 (ns), 0.01 *, 0.002 **, >0.001 ***. The different statistical tests were chosen based on the type of distribution, variance homogeneity and number of samples.

4.8. In Vivo Calcium Imaging

The transgenic line (Tg gfap-GCaMP6s) was used for calcium images. Adults were mated and the embryos collected in E3 medium (pH 7.4). Pigmentation was avoided by adding 75 μ M phenyl urea (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) at 6 h postfertilization. Embryos were paralyzed with 0.5 mM tubocurarine (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) at 3 dpf or 2 mM tubocurarine at 5 and 7 dpf for 10–15 min [53,54]. For imaging, embryos were mounted in melted 2% low melting agarose (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) at 35 °C in a concave slide covered with 100 μ L of E3 with tubocurarine [55,56].

For in vivo calcium imaging, an Olympus BX51W microscope was used (water-immersion objective 20 \times , 0.8 NA); the LED source was X-Cite XLED1 Excelitas Technologies at 465 nm, at 6% of power. The fish were kept in the dark at 26 °C during image acquisition. The fish were adapted for 20 min before recordings started. The videos were recorded at 2.55 or 4 Hz in fields 1 and 2 (Micromanager program with high resolution camera pco.edge 4.2, Kelheim, Germany).

4.9. In Vivo Pharmacological Blockage of Gap Junctions

5 dpf larvae were mounted in low melting agarose (2%), then 500 μ M Heptanol (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) freshly prepared was added for 30 min before image recordings. The fish were kept in the dark at 26 °C during image acquisition and images acquired at 2.55 Hz, 19.5 min. After finishing the recordings, the fish were returned to a water tank and the heart beat and blood flow were monitored for least 1 h; those with no activity were excluded from analysis.

4.10. Analysis and Statistics of Calcium Imaging

ImageJ/FIJI software was used to subtract background (Rolling ball radius 12 pixels) and the Turboreg (rigid body) plugin was used for motion correction. The cerebellum fields were selected as regions of interest. The changes in fluorescence in somas and processes were detected by an automated astrocyte quantitative analysis (AQuA) software program (<https://github.com/yu-lab-vt/AQuA> (accessed on June 2021)) [43] and a Matlab (version R2020a, United States) script was used for analysis (Supplementary Tables S2 and S3). A nonparametric Kruskal–Wallis test was applied to assess whether samples originated from the same distribution at $\alpha = 0.05$, followed by a comparison of the medias and their SEM with a multicomparison test $\alpha = 0.05$; p -values were 0.05 *, 0.01 ** and 0.0001 ***. Differences between control and heptanol blocking test were determined by the Mann–Whitney U test at $\alpha = 0.05$; p -values were <0.0001 ***, <0.00001 ****. For each parameter, the mean and SEM were reported (Supplementary Tables S4 and S5). $N = 6$ larvae per age for each field (field 1 and field 2, at 4 Hz for 4.16 min). $N = 6$ per age in field 1 at 2.55 Hz (19.5 min). $N = 6$ for heptanol blocking test in field 1 at 2.55 Hz (19.5 min).

5. Conclusions

In this study, we focused on the relationship between the calcium events and morphological complexity of radial glia in the zebrafish cerebellum during early development. Radial glia were likely to be involved in many physiological processes that include their interaction with neurons and vasculature that, in turn, are associated with a variety of neurological diseases. We show that the morphological complexity of radial glia during the first week of development is remarkable, since it goes from simple stratified columns at 3 dpf to complex morphologies and interactions at 7 dpf. This transformation is related to increase in calcium activity from local signals that recruit a limited number of cells at 3 dpf to widespread calcium events and the appearance of calcium waves at 5 dpf, whose activity is inhibited by blocking gap junctions.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222413509/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, E.P.-J. and A.M.-T.; methodology, E.P.-J. and G.B.G.-G.; formal analysis, A.M.-T., E.P.-J. and G.B.G.-G.; investigation, E.P.-J., G.B.G.-G., A.E.E.-S. and A.M.-T.; resources, A.M.-T.; data curation, E.P.-J.; writing—original draft preparation, E.P.-J.; writing—review and editing, E.P.-J., G.B.G.-G., A.E.E.-S. and A.M.-T.; visualization, E.P.-J., G.B.G.-G., A.E.E.-S. and A.M.-T.; supervision, A.M.-T.; project administration, A.M.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: CONACYT Ciencia Básica No. A1S7659 and PAPIIT-DGAPA UNAM No. IN204520 to AMT.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Instituto de Neurobiología—Universidad Nacional Autónoma de México (protocol number 95A, approved April 2016).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: <https://github.com/epereida/dataset>.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge Elsa Nydia Hernández Ríos from the INB Microscopy facility, Adriana Gonzalez from proteogenomic facility, José Martín García Servín and María A. Carbajo Mata from the university laboratory of animal science, Carlos Sair Flores and Marina Ramírez for their technical assistance, and Michael Conrad Jeziorski kindly edited the manuscript. This work was supported by CONACYT Ciencia Básica A1S7659 and PAPIIT-DGAPA UNAM IN204520. Elizabeth Pereida Jaramillo is a PhD student of Programa de Doctorado en Investigación Biomédica Básica, Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a fellowship from CONACYT (446622).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Koziol, L.F.; Budding, D.; Andreasen, N.; D'Arrigo, S.; Bulgheroni, S.; Imamizu, H.; Ito, M.; Manto, M.; Marvel, C.; Parker, K.; et al. Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition. *Cerebellum* **2014**, *13*, 151–177. [CrossRef]
2. Schmammann, J.D. The Cerebellum and Cognition. *Neurosci. Lett.* **2019**, *688*, 62–75. [CrossRef]
3. Manto, M.; Gandini, J.; Feil, K.; Strupp, M. Cerebellar Ataxias: An Update. *Curr. Opin. Neurol.* **2020**, *33*, 150–160. [CrossRef] [PubMed]
4. van der Heijden, M.E.; Gill, J.S.; Sillitoe, R.V. Abnormal Cerebellar Development in Autism Spectrum Disorders. *Dev. Neurosci.* **2021**, *43*, 181–190. [CrossRef]
5. Wang, S.S.-H.; Kloth, A.D.; Badura, A. The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. *Neuron* **2014**, *83*, 518–532. [CrossRef] [PubMed]
6. Hashimoto, M.; Hibi, M. Development and Evolution of Cerebellar Neural Circuits. *Dev. Growth Differ.* **2012**, *54*, 373–389. [CrossRef] [PubMed]
7. Hibi, M.; Matsuda, K.; Takeuchi, M.; Shimizu, T.; Murakami, Y. Evolutionary Mechanisms That Generate Morphology and Neural-Circuit Diversity of the Cerebellum. *Dev. Growth Differ.* **2017**, *59*, 228–243. [CrossRef]
8. Matsui, H.; Namikawa, K.; Babaryka, A.; Koster, R.W. Functional Regionalization of the Teleost Cerebellum Analyzed in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11846–11851. [CrossRef]
9. Jurisch-Yaksi, N.; Yaksi, E.; Kizil, C. Radial Glia in the Zebrafish Brain: Functional, Structural, and Physiological Comparison with the Mammalian Glia. *Glia* **2020**, *68*, 2451–2470. [CrossRef]

10. Takeuchi, M.; Matsuda, K.; Yamaguchi, S.; Asakawa, K.; Miyasaka, N.; Lal, P.; Yoshihara, Y.; Koga, A.; Kawakami, K.; Shimizu, T.; et al. Establishment of Gal4 Transgenic Zebrafish Lines for Analysis of Development of Cerebellar Neural Circuitry. *Dev. Biol.* **2015**, *397*, 1–17. [[CrossRef](#)]
11. Hamling, K.R.; Tobias, Z.J.C.; Weissman, T.A. Mapping the Development of Cerebellar Purkinje Cells in Zebrafish: Purkinje Cell Development in Zebrafish. *Dev. Neurobiol.* **2015**, *75*, 1174–1188. [[CrossRef](#)]
12. Kaslin, J.; Kroehne, V.; Ganz, J.; Hans, S.; Brand, M. Distinct Roles of Neuroepithelial-like and Radial Glia-like Progenitor Cells in Cerebellar Regeneration. *Development* **2017**, *144*, 1462–1471. [[CrossRef](#)]
13. Than-Trong, E.; Bally-Cuif, L. Radial Glia and Neural Progenitors in the Adult Zebrafish Central Nervous System: Adult Radial Glia in Zebrafish. *Glia* **2015**, *63*, 1406–1428. [[CrossRef](#)]
14. Bae, Y.K.; Kani, S.; Shimizu, T.; Tanabe, K.; Nojima, H.; Kimura, Y.; Higashijima, S.; Hibi, M. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Dev. Biol.* **2009**, *330*, 406–426. [[CrossRef](#)]
15. Hsieh, J.-Y.; Ulrich, B.; Issa, F.A.; Wan, J.; Papazian, D.M. Rapid Development of Purkinje Cell Excitability, Functional Cerebellar Circuit, and Afferent Sensory Input to Cerebellum in Zebrafish. *Front. Neural Circuits* **2014**, *8*, 147. [[CrossRef](#)]
16. Aizenberg, M.; Schuman, E.M. Cerebellar-Dependent Learning in Larval Zebrafish. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8708–8712. [[CrossRef](#)]
17. Hibi, M.; Shimizu, T. Development of the Cerebellum and Cerebellar Neural Circuits. *Dev. Neurobiol.* **2012**, *72*, 282–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ekström, P.; Johnsson, C.-M.; Ohlin, L.-M. Ventricular Proliferation Zones in the Brain of an Adult Teleost Fish and Their Relation to Neuromeres and Migration (Secondary Matrix) Zones: Proliferation Zones in Adult Teleost Brain. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *436*, 92–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lange, C.; Rost, F.; Machate, A.; Reinhardt, S.; Lesche, M.; Weber, A.; Kuscha, V.; Dahl, A.; Rulands, S.; Brand, M. Single Cell Sequencing of Radial Glia Progeny Reveals Diversity of Newborn Neurons in the Adult Zebrafish Brain. *Development* **2020**, *147*, dev185595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zupanc, G.K.H.; Hinsch, K.; Gage, F.H. Proliferation, Migration, Neuronal Differentiation, and Long-Term Survival of New Cells in the Adult Zebrafish Brain. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *488*, 290–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Semyanov, A.; Henneberger, C.; Agarwal, A. Making Sense of Astrocytic Calcium Signals—From Acquisition to Interpretation. *Nat. Rev. Neurosci.* **2020**, *21*, 551–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shigetomi, E.; Patel, S.; Khakh, B.S. Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 300–312. [[CrossRef](#)]
23. Weissman, T.A.; Riquelme, P.A.; Ivic, L.; Flint, A.C.; Kriegstein, A.R. Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron* **2004**, *43*, 647–661. [[CrossRef](#)]
24. Denizot, A.; Arizono, M.; Nägerl, U.V.; Soula, H.; Berry, H. Simulation of Calcium Signaling in Fine Astrocytic Processes: Effect of Spatial Properties on Spontaneous Activity. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1006795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nett, W.J.; Oloff, S.H.; McCarthy, K.D. Hippocampal Astrocytes In Situ Exhibit Calcium Oscillations That Occur Independent of Neuronal Activity. *J. Neurophysiol.* **2002**, *87*, 528–537. [[CrossRef](#)]
26. Nimmerjahn, A.; Mukamel, E.A.; Schnitzer, M.J. Motor Behavior Activates Bergmann Glial Networks. *Neuron* **2009**, *62*, 400–412. [[CrossRef](#)]
27. Morita, M.; Higuchi, C.; Moto, T.; Kozuka, N.; Susuki, J.; Itofusa, R.; Yamashita, J.; Kudo, Y. Dual Regulation of Calcium Oscillation in Astrocytes by Growth Factors and Pro-Inflammatory Cytokines via the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 10944–10952. [[CrossRef](#)]
28. Lines, J.; Martin, E.D.; Kofuji, P.; Aguilar, J.; Araque, A. Astrocytes Modulate Sensory-Evoked Neuronal Network Activity. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3689. [[CrossRef](#)]
29. Perea, G. Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 2192–2203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hoogland, T.M.; Kuhn, B.; Gobel, W.; Huang, W.; Nakai, J.; Helmchen, F.; Flint, J.; Wang, S.S.-H. Radially Expanding Transglial Calcium Waves in the Intact Cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3496–3501. [[CrossRef](#)]
31. Mathiesen, C.; Brazhe, A.; Thomsen, K.; Lauritzen, M. Spontaneous Calcium Waves in Bergman Glia Increase with Age and Hypoxia and May Reduce Tissue Oxygen. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2013**, *33*, 161–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Plattner, H.; Verkhratsky, A. Evolution of Calcium Signalling. *Cell Calcium* **2015**, *57*, 121–122. [[CrossRef](#)]
33. Liu, J.; Salvati, K.A.; Baraban, S.C. In Vivo Calcium Imaging Reveals Disordered Interictal Network Dynamics in Epileptic *Stxbp1b* Zebrafish. *iScience* **2021**, *24*, 102558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Arellano, J.I.; Morozov, Y.M.; Micali, N.; Rakic, P. Radial Glial Cells: New Views on Old Questions. *Neurochem. Res.* **2021**, *46*, 2512–2524. [[CrossRef](#)]
35. Betizeau, M.; Cortay, V.; Patti, D.; Pfister, S.; Gautier, E.; Bellemin-Ménard, A.; Afanassieff, M.; Huissoud, C.; Douglas, R.J.; Kennedy, H.; et al. Precursor Diversity and Complexity of Lineage Relationships in the Outer Subventricular Zone of the Primate. *Neuron* **2013**, *80*, 442–457. [[CrossRef](#)]
36. Nowakowski, T.J.; Pollen, A.A.; Sandoval-Espinosa, C.; Kriegstein, A.R. Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron* **2016**, *91*, 1219–1227. [[CrossRef](#)]
37. Rakic, P. Mode of Cell Migration to the Superficial Layers of Fetal Monkey Neocortex. *J. Comp. Neurol.* **1972**, *145*, 61–83. [[CrossRef](#)]

38. Nowakowski, T.J.; Bhaduri, A.; Pollen, A.A.; Alvarado, B.; Mostajo-Radji, M.A.; Di Lullo, E.; Haeussler, M.; Sandoval-Espinosa, C.; Liu, S.J.; Velmeshv, D.; et al. Spatiotemporal Gene Expression Trajectories Reveal Developmental Hierarchies of the Human Cortex. *Science* **2017**, *358*, 1318–1323. [[CrossRef](#)]
39. Raj, B.; Wagner, D.E.; McKenna, A.; Pandey, S.; Klein, A.M.; Shendure, J.; Gagnon, J.A.; Schier, A.F. Simultaneous Single-Cell Profiling of Lineages and Cell Types in the Vertebrate Brain. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 442–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ashworth, R.; Devogelaere, B.; Fabes, J.; Tunwell, R.E.; Koh, K.R.; De Smedt, H.; Patel, S. Molecular and Functional Characterization of Inositol Trisphosphate Receptors during Early Zebrafish Development. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 13984–13993. [[CrossRef](#)]
41. Chatterjee, B.; Chin, A.J.; Valdimarsson, G.; Finis, C.; Sonntag, J.M.; Choi, B.Y.; Tao, L.; Balasubramanian, K.; Bell, C.; Krufka, A.; et al. Developmental Regulation and Expression of the Zebrafish Connexin43 Gene. *Dev. Dyn.* **2005**, *233*, 890–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lo, J. 15,000 Unique Zebrafish EST Clusters and Their Future Use in Microarray for Profiling Gene Expression Patterns During Embryogenesis. *Genome Res.* **2003**, *13*, 455–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chen, J.; Poskanzer, K.E.; Freeman, M.R.; Monk, K.R. Live-Imaging of Astrocyte Morphogenesis and Function in Zebrafish Neural Circuits. *Nat. Neurosci.* **2020**, *23*, 1297–1306. [[CrossRef](#)]
44. Gu, X.; Spitzer, N.C. Distinct Aspects of Neuronal Differentiation Encoded by Frequency of Spontaneous Ca²⁺ Transients. *Nature* **1995**, *375*, 784–787. [[CrossRef](#)]
45. Scemes, E.; Duval, N.; Meda, P. Reduced Expression of P2Y₁ Receptors in Connexin43-Null Mice Alters Calcium Signaling and Migration of Neural Progenitor Cells. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 11444–11452. [[CrossRef](#)]
46. Lawrence, C. Advances in Zebrafish Husbandry and Management. In *Methods in Cell Biology*; Elsevier: Cambridge, MA, USA, 2011; Volume 104, pp. 429–451. ISBN 978-0-12-374814-0.
47. Norton, A.; Franse, K.F.; Daw, T.; Gordon, L.; Vitiello, P.F.; Kinkel, M.D. Larval Rearing Methods for Small-Scale Production of Healthy Zebrafish. *East. Biol.* **2019**, *2019*, 21.
48. Kawakami, K.; Patton, E.E.; Orger, M. Zebrafish: Methods and Protocols. In *Methods in Molecular Biology*; Springer: New York, NY, USA, 2016; Volume 1451, ISBN 978-1-4939-3769-1.
49. Kawakami, K. Tol2: A Versatile Gene Transfer Vector in Vertebrates. *Genome Biol.* **2007**, *8*, S7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Sheets, L.; Trapani, J.G.; Mo, W.; Obholzer, N.; Nicolson, T. Ribeye Is Required for Presynaptic CaV1.3a Channel Localization and Afferent Innervation of Sensory Hair Cells. *Development* **2011**, *138*, 1309–1319. [[CrossRef](#)]
51. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]
52. Kaslin, J.; Brand, M. The Zebrafish Cerebellum. In *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 56, pp. 411–421. ISBN 978-3-319-24551-5.
53. Miyazawa, H.; Okumura, K.; Hiyoshi, K.; Maruyama, K.; Kakinuma, H.; Amo, R.; Okamoto, H.; Yamasu, K.; Tsuda, S. Optical Interrogation of Neuronal Circuitry in Zebrafish Using Genetically Encoded Voltage Indicators. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6048. [[CrossRef](#)]
54. Parrock, S.; Hussain, S.; Issler, N.; Differ, A.-M.; Lench, N.; Guarino, S.; Oosterveld, M.J.S.; Keijzer-Veen, M.; Brilstra, E.; van Wieringen, H.; et al. KCNJ10 Mutations Display Differential Sensitivity to Heteromerisation with KCNJ16. *Nephron Physiol.* **2013**, *123*, 7–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kaufmann, A.; Mickoleit, M.; Weber, M.; Huisken, J. Multilayer Mounting Enables Long-Term Imaging of Zebrafish Development in a Light Sheet Microscope. *Development* **2012**, *139*, 3242–3247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Weber, M.; Mickoleit, M.; Huisken, J. Multilayer Mounting for Long-Term Light Sheet Microscopy of Zebrafish. *J. Vis. Exp.* **2014**, 51119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]