



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina



Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurobiología

Papel de la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS) en el sistema vestibular del pollo durante el desarrollo embrionario. Un estudio electrofisiológico y de expresión génica

Tesis para obtener el grado de Licenciada en Biomedicina

Presenta

María Coral Aguilar Santos

Director de tesis y asesor metodológico

Dra. Amira del Rayo Flores Urbina

Puebla

Junio 2016



Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y estudios de posgrado por el apoyo otorgado mediante la beca de Proyectos VIEP2015 para la realización del proyecto

Índice

Resumen	III
Introducción	1
Antecedentes	1
Antecedentes generales.....	1
Generalidades del sistema vestibular	1
La célula ciliada vestibular.....	6
Transducción mecanoeléctrica.....	8
Neurotransmisión en el sistema vestibular.....	13
Neurotransmisión eferente.....	13
Neurotransmisión aferente.....	13
Embriología	14
Desarrollo del oído interno en vertebrados.....	14
Desarrollo del oído interno en el <i>Gallus domesticus</i>	18
Generalidades del NO	20
Antecedentes específicos.....	25
Interacción del receptor tipo NMDA con NO.....	25
Efectos del NO en el sistema nervioso	27
NO en el sistema vestibular.....	31
Planteamiento del problema	33
Objetivos	35
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos.....	35
Material y métodos	36
Solución para disección y registro electrofisiológico	36
Disección	36
Técnica de registro extracelular multiunitario	37
Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR).....	38
Extracción del ARNm	38
Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa.....	39

Electroforesis.....	41
Análisis estadístico	42
Resultados	43
Efecto de L-NOARG sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares	43
Efecto de 7-NI sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares	47
Ensayo de expresión génica	50
Discusión	54
Conclusiones	60
Referencias	61

Resumen

El óxido nítrico (NO) es una potente molécula presente en numerosos organismos con participación en mecanismos como el mantenimiento del tono vascular, la sinaptogénesis, la memoria y el aprendizaje entre otros; además, se ha comprobado su papel como inmuno y neuromodulador. Esta molécula está presente biológicamente en forma de gas y su vida media es de sólo unos pocos segundos, por lo que se le considera un mensajero autocrino o paracrino. A partir de L-Arginina se obtiene L-citrulina y NO por la acción de la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS del inglés Nitric Oxide Synthase) la cual, se encuentra presente en tres isoformas codificadas por genes diferentes y de localización diversa en todo el organismo estas son la NOSI, NOSII y NOSIII.

Durante la década de los 90, se produjo un auge en la investigación y se obtuvo el conocimiento de las vías de señalización en las que estaba involucrada NOS y su producto, el NO. En el sistema nervioso se conoce la participación de NO a través de la vía de activación del receptor ionotrópico a glutamato tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) con la consecuente activación de NOS y producción de NO, el cual es capaz de activar a la enzima Guanilato ciclasa (GC) y producir GMPc (guanosin monofosfato cíclico), o actuar directamente sobre su blanco. Durante el desarrollo embrionario el NO tiene un importante papel en el refinamiento de conexiones sinápticas.

Se sabe que en el sistema vestibular el principal neurotransmisor es el glutamato y se ha corroborado la presencia de NOSI y NOSIII en condiciones fisiológicas en el organismo adulto, sin embargo, se desconoce la participación de NOS durante el desarrollo embrionario de este antiguo sistema sensorial, y en específico, el papel que ejerce en la maduración y mantenimiento de la descarga basal que le otorga a este sistema significativas propiedades.

Por esto, en el presente trabajo se analiza la participación de la NOS en la modulación de la descarga espontánea de las aferentes vestibulares del pollo durante el desarrollo embrionario.

Empleando la técnica de registro extracelular multiunitario del nervio correspondiente al ámpula posterior vestibular en edades E15, E17, E19 y E21, se analizó la frecuencia de descarga espontánea y los cambios producidos por la administración de los inhibidores de NOS, L-NOARG y 7-NI. De acuerdo a lo observado en nuestros resultados la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares disminuyó de manera dependiente de la edad del animal y de la concentración empleada del fármaco, principalmente a partir de E17.

Para corroborar la existencia de NOS en el sistema vestibular se realizó un ensayo de expresión génica mediante la técnica de RT-PCR para determinar la presencia del ARNm de las tres isoformas, revelando la presencia de todas ellas con expresión diferencial a lo largo del desarrollo embrionario tanto en las crestas de los canales semicirculares (células ciliadas) como en los ganglios vestibulares (somatosomas de neuronas aferentes).

Se sugiere la idea de que la transcripción de NOS está siendo regulada a lo largo del desarrollo y que a través de estos mecanismos también se modula la traducción y actividad de la enzima.

Nuestros resultados indican que NOS está presente en el sistema vestibular en desarrollo modulando la descarga basal aferente a través de su producto, el NO, Esta modulación podría ser directa o indirecta, lo que podría ser dilucidado en trabajos posteriores empleando técnicas de estudio adicionales.

Introducción

Antecedentes

Antecedentes generales

Generalidades del sistema vestibular

Distintos trabajos científicos que trataban de localizar una función en determinada región cerebral, están basados en sujetos con lesiones específicas. Broca entre 1861 y 1864 analizó los cerebros de sujetos afásicos y observó en todos ellos una lesión en la tercera circunvolución frontal; posteriormente se estableció esta región como el área del lenguaje expresivo (Wong-Riles, 2001). En 1848, el famoso paciente de John Martyn Harlow, Phineas Gage, presentaba lesiones en la corteza prefrontal a las cuales se atribuyó su cambio de conducta y personalidad, dando a esta región un papel en las funciones cognitivas (Damasio et al, 1994). Este tipo de estudios, ya existentes en tiempos de Galeno y mencionados por Claude Bernard como experimentación por destrucción, era una de las formas más comunes de observación en las ciencias de la vida (Bernard & Granel, 1947); a esta debemos el descubrimiento de la función del sistema vestibular. En 1832 el investigador francés Marie Jean Pierre Flourens estudiaba el sistema auditivo, en ese entonces, integrado también por el vestíbulo en el oído interno. Mediante la remoción de los canales semicirculares de palomas, Flourens esperaba provocar y hallar fallas en la audición de estos animales, determinando así ciertas funciones de la sensación auditiva en el vestíbulo; sin embargo, lo que encontró no fue sino una falla a nivel de estabilidad y movimiento; las palomas presentaban movimientos anómalos de la cabeza y la pérdida del equilibrio postural. En ese momento Flourens infirió que aquella porción del oído interno participaba en el mantenimiento del equilibrio (Yildirim & Sarikcioglu, 2007; Duque-Parra, 2004). A partir de este momento inició una nueva línea de investigación del oído interno, en la que se pudieron establecer poco a poco los mecanismos físicos y químicos de la propiocepción de la cabeza y cuello. Sin embargo, después de más de 180 años, todavía no quedan completamente claras las vías que participan en la percepción inconsciente e involuntaria de nuestra posición en el espacio o en la formación de esta sensación, con el avance de nuevas tecnologías es claro que queda mucho por explorar en este campo y que,

una vez conocidas podrán adaptarse terapias para los defectos en ellas, además de satisfacer la infinita y natural curiosidad humana.

En general, el sistema nervioso utiliza tres fuentes de información sensitiva para el mantenimiento del equilibrio; la vista, la propiocepción del cuerpo y el sistema vestibular del oído interno (Kornhuber, 1974). La información adquirida nos mantiene balanceados e influye en cómo percibimos el espacio.

Residente en el hueso temporal, el llamado laberinto membranoso es un conjunto de ductos interconectados de paredes blandas que corresponden al oído interno. Este último es originado del ectodermo embrionario y se puede dividir en dos regiones especializadas en distintas funciones; la porción auditiva que se compone de la cóclea o caracol y la porción vestibular que corresponde al sistema del mismo nombre.

En especial, este sistema vestibular detecta las aceleraciones lineales y angulares de la cabeza (pero no su velocidad y posición) (Fernández Tresguerres, 2010) a través de un conjunto de cinco órganos receptores ubicados en el laberinto óseo que delinea al llamado laberinto membranoso. Por lo tanto, el sistema vestibular se compone de un laberinto izquierdo y uno derecho que se complementan funcionalmente y cuya disposición es simétrica especular (Kandel et al, 2000).

El espacio que rodea el laberinto membranoso y que subyace al laberinto óseo contiene un fluido, la perilinfa, que actúa absorbiendo o suavizando choques, su composición es muy similar a la del líquido cefalorraquídeo, cuya característica principal es que contiene concentraciones relativamente altas del ion sodio (Na^+) y bajas de potasio (K^+) (Kiernan, 2000). En su interior el laberinto membranoso contiene un fluido denominado endolinfa, producido por un epitelio de células oscuras que rodean al epitelio sensorial vestibular; a diferencia de la perilinfa este fluido es rico en K^+ (145 mmol/L) pero pobre en Na^+ (5 mmol/L) y Calcio (Ca^{++}) (Eatock & Lysakowski, 2006; Zenner & Gummer, 1996).

El área vestibular del laberinto membranoso puede subdividirse funcionalmente en una parte estática; representada por el utrículo y el sáculo, dos órganos que detectan las aceleraciones lineales de la cabeza en sentido vertical y horizontal respectivamente, de manera preferente pero no exclusiva (Kiernan, 2000; Fernández Tresguerres, 2010), así

como la inclinación de la cabeza (Eatock & Lysakowski, 2006), y una parte cinética; consiste en tres conductos semicirculares que detectan las aceleraciones angulares de la cabeza en disposición tridimensional por lo que los conductos están situados casi ortogonalmente. Cada uno de estos cinco órganos posee una estructura receptora en cuya base se hallan células ciliadas, que se encargan de la transducción de estímulos mecánicos en eléctricos (Kandel et al, 2000; Kiernan, 2000; Zenner & Gummer, 1996).

Todo el perímetro del laberinto membranoso está formado por monocapas de células epiteliales, no obstante, existen algunas regiones donde se diferencia un tipo celular especializado en el transporte de iones y agua para el mantenimiento de la composición endolinfática, a través de la secreción activa de iones (Lévêque et al, 2009). Estas células, llamadas células oscuras, presentan núcleo apical y se fijan al epitelio encarando a la endolinfa directamente, proyectando hacia este sitio microvellosidades de distintas longitudes. Su función es comparada a la del epitelio transportador de iones en el sistema tubular renal, plexo ciliar o plexo coroideo. Entre las células oscuras y el epitelio simple también se puede distinguir una capa de células cilíndricas que contienen gránulos secretorios: las células de transición que participan también en el mantenimiento osmótico mediante la reabsorción de cationes (Lowestein, 1974).

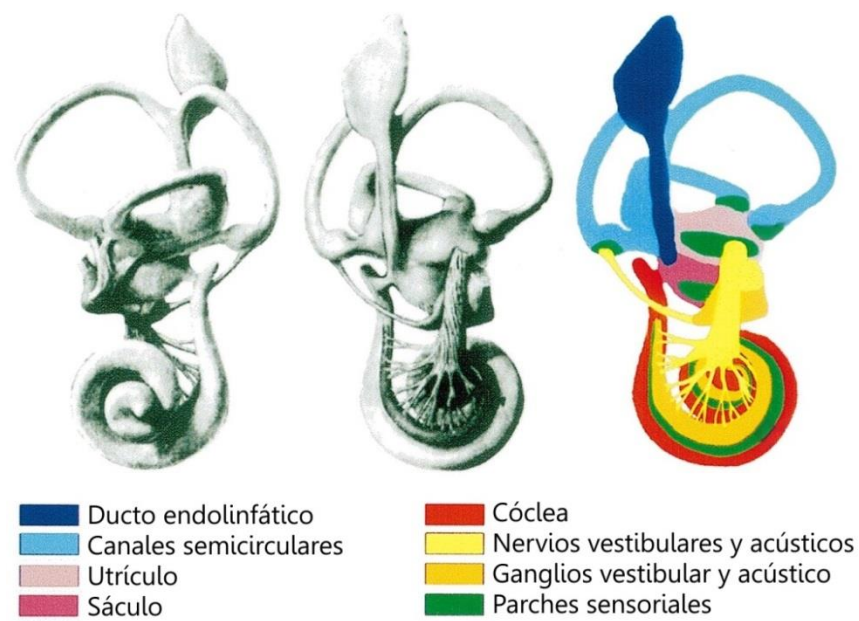


Figura 1. Anatomía funcional del oído interno de mamífero. Tomado y modificado de Torres & Giráldez, 1998.

Los tres conductos semicirculares comienzan y desembocan en el utrículo, mientras que el sáculo está en relación con la cóclea por el canalis reuniens. El utrículo y el sáculo se unen por medio del conducto endolinfático que se forma de la unión de un ducto en la cara interna del utrículo con otro que sale de la cara interna del sáculo. El conducto endolinfático termina en la porción posterior del laberinto óseo formando al saco endolinfático (Ganong, 2010; Latarjet, 2004).

El utrículo y sáculo son dilataciones del laberinto membranoso revestidos por epitelio cuboidal simple que está sostenido por una fina capa de tejido conjuntivo, y que se rodea del espacio perilinfático. Cada uno de estos órganos posee como estructura sensitiva especializada a la mácula (Kiernan, 2000). La mácula utricular está en el piso del utrículo y en paralelo con la base del cráneo, mientras que la sacular se dispone en forma semivertical (tiene forma sigmoidea) sobre la pared medial del sáculo. Cada mácula contiene células de soporte y ciliadas, la punta de cilios y kinocilios de estas últimas están incrustadas en la membrana otolítica, una matriz de consistencia gelatinosa en la que están incrustados cristales de carbonato de calcio, a los cuales se les conoce como otolitos, otoconias, estatolitos o estatoconias, este componente exclusivo de las máculas debido a su mayor gravedad específica en comparación con la perilinfa o líquido extracelular, tienen la capacidad de responder al movimiento lineal y fuerzas de gravedad (Fernández Tresguerres, 2010; Ganong, 2010). Dentro de la mácula se incluye la estriola que se considera el límite funcional y morfológico para la detección de las aceleraciones lineales en toda dirección en el espacio, organizando la orientación relativa de los kinocilios de las células mecanorreceptoras en cientos de grupos ovoides (Eatock & Songer, 2011), las cuales poseen un vector de polarización funcional (Fernández Tresguerres, 2010; Highstein et al, 2004). Morfológicamente, la estriola ordena la superficie de la mácula en una zona estriolar y otra extraestriolar (Eatock & Lysakowski, 2006).

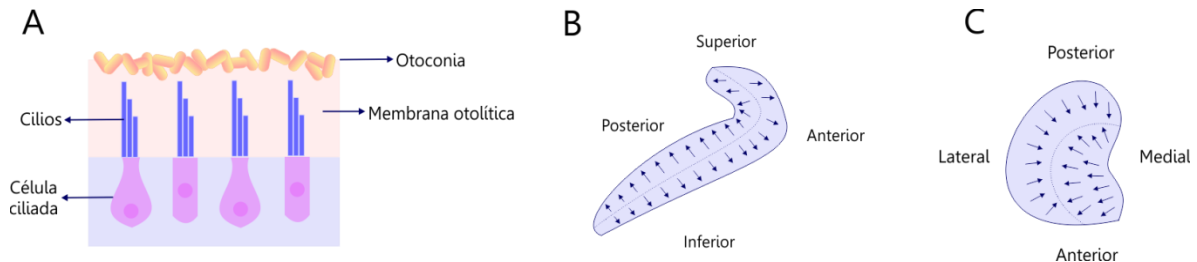


Figura 2. Órganos otolíticos. Estructura de los receptores otolíticos. A. Se observan proyecciones de las células ciliadas a la membrana otolítica. Existe una polarización bidimensional de las células ciliadas característica para la mácula sacular (B) y la mácula utricular (C). Tomado y editado de Wong-Riles, 2001.

Los tres conductos semicirculares son anterior, posterior y lateral (también llamado horizontal). Los conductos semicirculares anterior y posterior están en planos verticales, mientras que el conducto semicircular lateral presenta una inclinación hacia abajo y atrás en un ángulo de 30° al plano horizontal. Los conductos semicirculares de los dos lados forman pares espaciales; los conductos laterales están en el mismo plano, mientras que el conducto anterior de un lado se corresponde con el conducto posterior del lado opuesto (Kiernan, 2000).

Antes de entrar en el utrículo cada conducto posee una dilatación llamada ámpula, dentro de esta se encuentra la estructura receptora llamada cresta ampular, cada cresta al igual que la mácula contiene células de soporte y ciliadas pero no otolitos (Zenner & Gummer, 1996); las proyecciones de las células ciliadas están encapsuladas en un tabique gelatinoso de mucopolisacáridos y queratina que recibe el nombre de cúpula, mientras que sus bases se hallan en contacto íntimo con las fibras aferentes del par craneal VIII de la división vestibular (Kiernan, 2000).

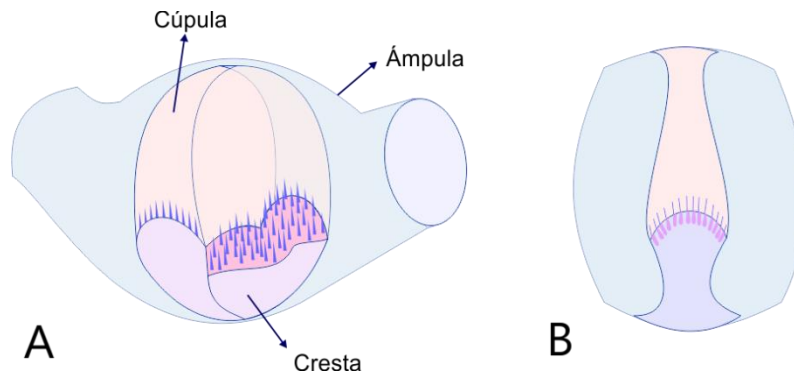


Figura 3. Dilatación del canal semicircular. A. El ámpula, representada como si fuera transparente para observarla en su totalidad. B. El ámpula en sección transversal, se pueden observar las células ciliadas con el kinocilio únicamente. Tomado y modificado de Parker, 1980.

La célula ciliada vestibular

En cada órgano sensorial del vestíbulo podemos identificar por su morfología dos tipos de células ciliadas mecanorreceptoras; las células ciliadas tipo I que tienen forma de botella con su núcleo localizado basalmente, y las tipo II con cuerpo cilíndricos y núcleo medial (Ganong, 2010; Zenner & Gummer, 1996).

La superficie apical de ambos tipos celulares presenta proyecciones de estereocilios y un solo kinocilio. Los estereocilios (de 50-100 por cada célula) están compuestos de filamentos de actina y poseen un estrechamiento en su base que disminuye su resistencia mecánica a la inclinación. Sus puntas se unen por puentes de proteína que parecen intervenir en el mecanismo de transducción. El único kinocilio presente consiste en un sistema de microtúbulos de nueve pares periféricos, un par central y nueve tripletes periféricos en la base de anclaje.

Los estereocilios más alejados de kinocilio son más cortos y se van haciendo progresivamente más altos a medida que se acercan, se distribuyen en forma hexagonal en la superficie apical de la célula y el kinocilio ocupa un vértice en dicha estructura (Fernández Tresguerres, 2010). En las células ciliadas de los conductos semicirculares laterales el kinocilio está en dirección al utrículo, mientras que en los conductos anterior y posterior está orientado en la dirección contraria. En las máculas, el kinocilio difiere su orientación en toda la superficie (Kiernan, 2000; Fernández Tresguerres, 2010).

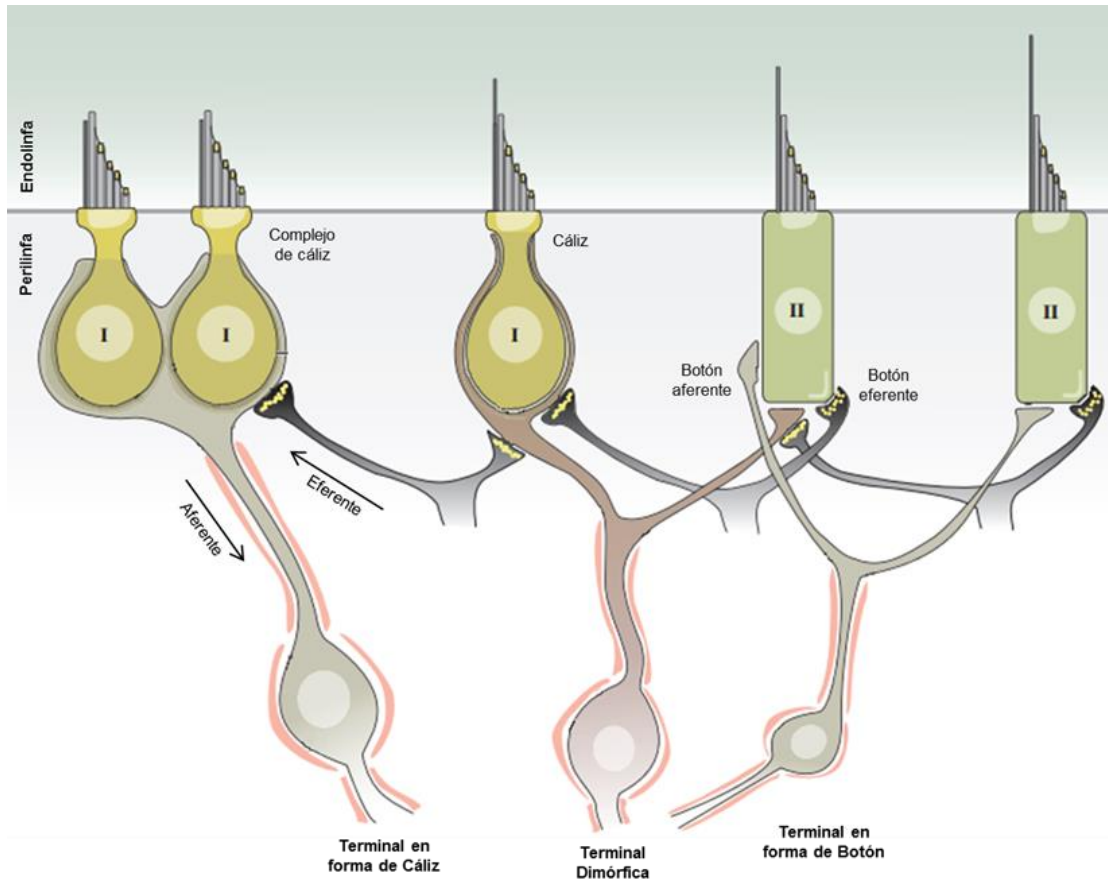


Figura 4. Células ciliadas vestibulares. Este esquema muestra la clasificación de las aferentes vestibulares correspondientes con la morfología de las células ciliadas. Las fibras grises representan a las terminales eferentes. Se observa una unión de punta entre los estereocilios. Tomado y modificado de Eatock & Songer, 2011.

En cuanto a su distribución, en la superficie macular de reptiles y aves las células tipo I son predominantes en la zona estriolar, sin embargo, en mamíferos también se pueden encontrar cantidades significativas en la zona extraestriolar (Eatock & Lysakowski, 2006). Se sabe que las células tipo I predominan en la región superior de la cresta ampular y las tipo II están presentes mayoritariamente en la región inferior, aunque no están claros los límites (Welsch, 2008).

En 1956 Wersäll describió diferencias en la inervación dada por las aferentes hacia los dos tipos de células ciliadas; los axones periféricos de las neuronas bipolares, cuyos somas se localizan en el ganglio vestibular o de Scarpa pierden su envoltura de mielina antes de entrar en la base del neuroepitelio, e inervan a las células tipo I envolviéndolas por su base con una terminal en cáliz y las de tipo II con terminales esféricas pequeñas (Eatock & Lysakowski, 2006). Cada fibra puede inervar a una o varias células sensoriales tanto de tipo

I como de tipo II, de ahí que se clasifican en tres grupos: con terminal en cáliz, con terminales de botón y terminales dimórficas que poseen ambos tipos (Kiernan, 2000; Fernández Tresguerres, 2010; Eatock & Songer, 2011). Se describió que en la periferia las fibras aferentes en cáliz son simples mientras que en el centro inervan de dos a cuatro células ciliadas tipo I; las aferentes en botón predominan en la zona periférica (Eatock & Songer, 2011). Se presentan fibras eferentes que terminan en la membrana basolateral de las células ciliadas tipo II, así como en las fibras aferentes con forma de cáliz o botón (Eatock & Lysakowski, 2006). También se observan terminales periféricas sobre las células receptoras tipo I de tipo eferentes que provienen de los núcleos vestibulares y que controlan la sensibilidad de dichos mecanorreceptores (Eatock & Lysakowski, 2006; Highstein et al, 2004).

Los cuerpos celulares de las fibras eferentes provienen mayoritariamente de un núcleo adyacente a los vestibulares en tallo cerebral, pero también pueden provenir de las células de Purkinje en cerebelo (Lévêque et al, 2009). Las poblaciones de fibras aferentes poseen distintas propiedades dependiendo la especie animal que se estudie. En mamíferos, las zonas periféricas de los órganos sensoriales poseen un tipo de descarga muy regular, y este es más abundante que la descarga irregular de las zonas centrales. Cada tipo celular responde preferencialmente a estimulación de ciertas frecuencias entre 0 y 20 Hz (Eatock & Songer, 2011).

Transducción mecanoeléctrica

Los estereocilios de cada célula están conectados por varios tipos de uniones extracelulares cuyo objetivo es acoplarlos en la respuesta a un estímulo mecánico (Eatock & Lysakowski, 2006). Existen uniones laterales en lo largo de los estereocilios y uniones de punta que tienen un filamento central rodeado por glicocáliz; conectan la punta de un estereocilio con el costado del inmediato más alto.

Durante el reposo, la célula ciliada se encuentra en equilibrio con la perilinfa que rodea su porción basolateral, manteniendo un potencial de equilibrio de -60 mV aproximadamente, sin embargo, bajo ciertas condiciones y para el proceso de transducción, se crea un nuevo potencial con respecto a la región apical de la célula, la que se encuentra inmersa en endolinfa; esto resulta en un flujo hacia el interior de la célula ciliada de iones que permite

su despolarización produciendo un potencial receptor que permitirá liberar el neurotransmisor en la sinapsis con la fibra aferente, el cual es principalmente glutamato (Fernández Tresguerres, 2010; Zenner & Gummer, 1996; Highstein et al, 2004).

De manera más detallada, para explicar el proceso de transducción se ha propuesto la participación de canales de transducción mecano-eléctrica (MET; Mechano-electrical transduction) localizados en las antes mencionadas uniones de punta e identificados mediante técnicas de mapeo de flujo de corriente transductora. Estos canales están acoplados al movimiento relativo entre los estereocilios adyacentes por las uniones de punta, este movimiento produce el estiramiento o estrechamiento que directamente interfiere en el estado del canal. Bajo condiciones de reposo las uniones de punta están sujetas a cierta tensión. La flexión de los estereocilios en dirección al kinocilio (deflexión positiva) produce un estiramiento y la apertura de los canales; por lo tanto la despolarización de la célula ciliada, aunque estos canales no discriminan y permiten el paso de cationes monovalente se ha encontrado que el K^+ y Ca^{++} son especialmente permeables. En correspondencia una flexión en dirección opuesta (deflexión negativa) lleva a su hiperpolarización (Fernández Tresguerres, 2010; Highstein et al, 2004; Frings & Bradley, 2006).

Esta despolarización permite que en la zona basolateral de la célula ciliada se activen canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, permitiendo el influjo de este catión con la consecuente liberación de neurotransmisor mediante el proceso de exocitosis. Es importante destacar el sistema de exocitosis de listón o en inglés “ribbon”, ya que permite la asociación de vesículas sinápticas y canales de Ca^{++} , permitiendo así una rápida respuesta y una corta latencia del estímulo, pues el neurotransmisor se libera de manera constitutiva. Podemos identificar en las células ciliadas tipo I listones de menor tamaño y forma redondeada y en ciliadas tipo II, estructuras elongadas (Eatock & Songer, 2011).

El glutamato liberado actúa sobre las aferentes modificando su descarga. Las aferentes vestibulares primarias presentan una descarga tónica que aumenta cuando las células ciliadas se despolarizan y disminuye ante su hiperpolarización. La aceleración angular horizontal de la cabeza, por ejemplo, a la izquierda, hace que todo el laberinto gire en conjunto pero la endolinfa tiende a permanecer estacionaria y se opone a la rotación por sus

propiedades inerciales (Parker, 1980). Este movimiento inclina la cúpula en las ámpulas de los conductos semicirculares laterales y mientras los estereocilios del ámpula izquierda tienen una deflexión positiva, los del ámpula derecha tienen una deflexión negativa (Fernández Tresguerres, 2010; Zenner & Gummer, 1996; Parker, 1980).

La despolarización inicial produce un potencial receptor con la capacidad de viajar por toda la célula hasta llegar a la porción basolateral donde se activan canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, que clásicamente promueve la adhesión de vesículas sinápticas en la membrana celular que contienen neurotransmisor y la exocitosis de las mismas al espacio sináptico (Kiernan, 2000; Fernández Tresguerres, 2010; Wong-Riles, 2001). La hiperpolarización se lleva a cabo por una disminución de la entrada de cationes debida al acortamiento de los puentes de proteína de las uniones en los estereocilios. De esta manera se disminuye la exocitosis de las vesículas y por lo tanto, la tasa de disparos de las aferentes (Kiernan, 2000; Fernández Tresguerres, 2010).

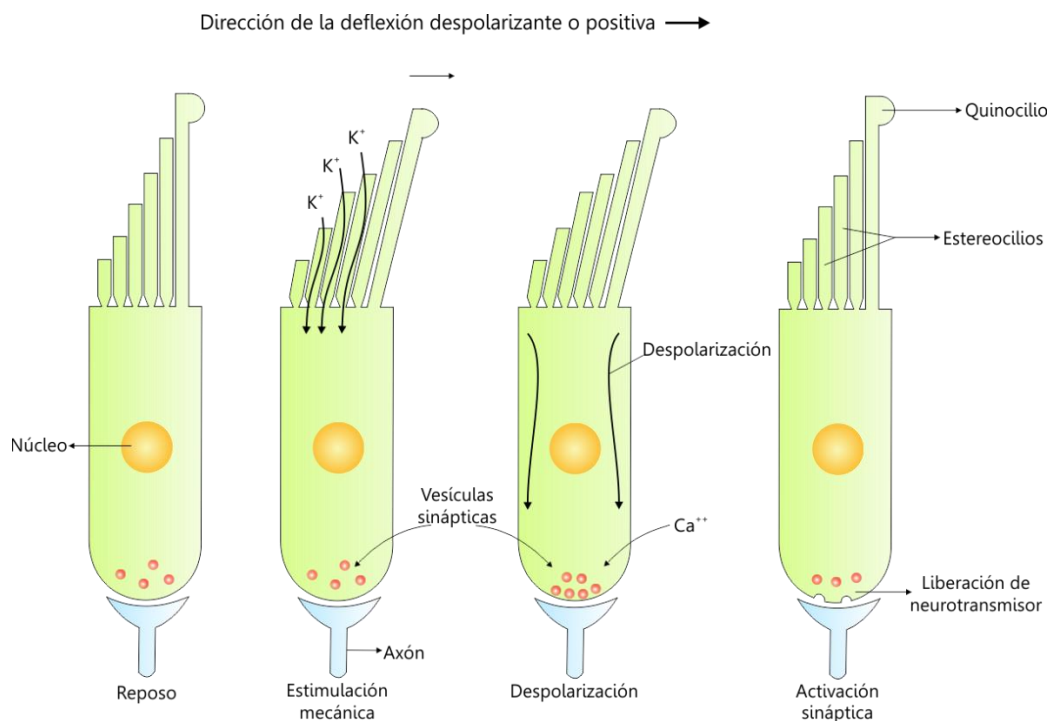


Figura 5. Despolarización de la célula ciliada. Tomado y modificado de Gómez Rivera, 2004. Un estímulo mecánico desplaza los cilios en dirección al kinocilio, esto produce la apertura de canales catiónicos inespecíficos y el paso del ion K^+ que está altamente concentrado en la endolinfa. Esto resulta en la despolarización de la célula y la apertura de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje. El influjo de este último ion a la célula produce la fusión de vesículas en la membrana con consecuente liberación de neurotransmisor hacia la sinapsis con la terminal aferente.

Para el utrículo y sáculo, la mayor gravedad específica de la membrana otolítica con respecto a la endolinfa permite a la mácula responder a movimientos rápidos de inclinación, aceleración y desaceleración de la cabeza (Kiernan, 2000; Wong-Riles, 2001). Las máculas utriculares izquierda y derecha se comportan de manera recíproca, lo mismo que las máculas saculares (Zenner & Gummer, 1996).

El nervio vestibular que lleva las aferentes primarias vestibulares posee cinco ramas separadas provenientes de cada órgano receptor, estas se combinan en dos divisiones al salir del laberinto. La división superior del nervio vestibular contiene aferentes de ámpulas de los conductos anterior y lateral así como de la mácula utricular. La división inferior contiene aferentes de la mácula sacular y del ámpula del conducto posterior (Wong-Riles, 2001).

Después, una rama central sale del ganglio vestibular y entra a la porción lateral del tallo cerebral y se bifurca en dos fascículos formados por axones de diferente diámetro, una porción termina en el complejo nuclear vestibular y el resto va directamente al cerebelo a través del pedúnculo cerebeloso inferior.

Se reconocen cuatro núcleos vestibulares; el núcleo vestibular lateral que consiste en su mayoría de neuronas multipolares grandes con dendritas muy ramificadas, axones muy largos y cuerpos de Nissl prominentes, y los núcleos vestibulares superior, medial e inferior los cuales consisten en células de tamaño pequeño y medio (Kiernan, 2000; Wong-Riles, 2001). Ramas aferentes de los núcleos superior, medial e inferior así como algunas directamente del ganglio vestibular llegan al lóbulo floculo nodular (vestíbulo-cerebelo), en sentido inverso, fibras aferentes del vestíbulo-cerebelo terminan por todo el complejo nuclear vestibular. Algunas fibras cerebelo-vestibulares son inhibitorias (células de Purkinge) y otras excitatorias (de los núcleos de Fastigio). El papel del cerebelo en el mantenimiento del equilibrio se ejerce sobre todo a través de las vías de los núcleos vestibulares hacia la médula espinal (Wong-Riles, 2001).

El tracto vestíbuloespinal es ipsilateral y se origina de manera exclusiva del núcleo lateral, las fibras descienden en el bulbo raquídeo dorsal al núcleo olivar inferior y continúan en el funículo ventral de la médula espinal. Las fibras vestibuloespinales terminan en la parte

medial del cuerpo ventral (lámina VIII y partes de la lámina VII de Rexed) de forma más abundante en las intumescencias cervical y lumbosacra. Este tracto es de gran importancia en la regulación del tono muscular. La estimulación del núcleo vestibular lateral causa la excitación de neuronas motoras que inervan los músculos extensores de la extremidad inferior ipsilateral mientras que los flexores de inhiben (Wong-Riles, 2001), así, al controlar las extremidades y el tronco se impide que el cuerpo caiga durante una aceleración translatoria (este mecanismo es parte de las llamadas funciones multimodales) (Zenner & Gummer, 1996).

Las fibras de cada núcleo vestibular medial se proyectan hacia la línea media y se cruzan en el componente caudal del fascículo longitudinal medial descendente cerca del piso del cuarto ventrículo. Las fibras continúan en la parte medial del funículo ventral en la médula espinal e influyen sobre las motoneuronas cervicales y por lo tanto en los movimientos de cuello y cabeza. El componente ascendente del fascículo longitudinal medial (adyacente a la línea media en el puente y mesencéfalo) conecta los núcleos vestibulares con los núcleos de los nervios abductor, troclear, y oculomotor y con los núcleos accesorios del oculomotor en el mesencéfalo. Estas fibras ascendentes pueden ser directas o contralaterales y participan en el movimiento de los ojos coordinados con los de la cabeza (Zenner & Gummer, 1996; Parker, 1980).

El sistema vestibular actúa sobre todo en el tallo cerebral, cerebelo y médula espinal, pero también hay una vía importante hacia la corteza cerebral. La vía ascendente de los núcleos vestibulares es predominantemente contralateral. El relevo talámico para la proyección cortical, se piensa que está en la división medial del núcleo ventral posterior. Se piensa que el campo cortical vestibular contribuye con información para uso de la regulación motora superior y para la orientación espacial consciente, pero no está identificada el área apropiada con certeza (Wong-Riles, 2001).

Neurotransmisión en el sistema vestibular

Neurotransmisión eferente

Se sugiere que en el sistema vestibular, las fibras eferentes podrían extender el rango dinámico de la respuesta aferente, y funcionar en mecanismos de neuroprotección. Mediante estudios de inmunohistoquímica, electrofisiología, y farmacología se estableció que el mayor neurotransmisor liberado en las sinapsis eferentes es acetilcolina (ACh). El efecto de la ACh puede llevar a un incremento en la descarga aferente a través de un receptor muscarínico o a su decremento a través de un receptor aun no bien determinado (Guth et al, 1998).

Neurotransmisión aferente

Las fibras aferentes vestibulares pueden clasificarse de acuerdo a la tasa y la regularidad de su descarga. Existen fibras de descarga regular o irregular. Las fibras irregulares presentan un axón de diámetro más grueso con respecto a las regulares, además de poseer terminaciones dimórficas o en cáliz. Su respuesta es de tipo fásico-tónico y tienen una alta sensibilidad a fuerzas angulares y lineales, por último, presenta un bajo umbral y respuestas amplias ante estimulación eferente y galvánica (Lysakowski & Goldberg, 2004).

Por otro lado las fibras de descarga regular presentan terminales dimórficas y de botón, responden de manera tónica, tienen una baja sensibilidad a las fuerzas angulares y lineales y sus respuestas son menores a las observadas en las fibras irregulares por estimulación eferente. Estas fibras son de alto umbral y respuestas cortas ante estimulación galvánica (Lysakowski & Goldberg, 2004).

La transmisión aferente vestibular depende principalmente del neurotransmisor excitatorio glutamato, se sabe que durante la sinaptogénesis entre las células ciliadas y las fibras aferentes mecanismos glutamatérgicos tienen un papel importante; los receptores a glutamato tipo NMDA se pueden identificar en embrión de ratón de E11; se reporta también la presencia transitoria del receptor tipo AMPA (γ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-ácido propiónico). Comenzando la sinaptogénesis del ganglio vestibular, hacia E15, se identifica la subunidad GluR2 del receptor tipo AMPA (Eatock & Hurley,

2003). En nuestro laboratorio se ha observado el papel de NMDA en la regulación de la descarga basal de las aferentes vestibulares del pollo en desarrollo y durante la estimulación mecánica, produciendo un aumento en la frecuencia de descarga que es dependiente de la edad, teniendo un mayor efecto en edades cercanas a la eclosión, además se corroboró la presencia de las subunidades del receptor tipo NMDA: NR1, NR2B y NR3A (Ramírez Ramírez, 2014).

Galindo et al en 2013, mediante métodos de electrofisiología pudieron comprobar la participación del ATP en la maduración del sistema vestibular de pollo. En su trabajo concluyen que la activación de los receptores purinérgicos P2X y P2Y incrementa la actividad espontánea vestibular de manera dependiente de la edad y la dosis, concluyendo que ATP parece modular dicha actividad.

Un neurotransmisor que cada vez adquiere mayor credibilidad es el ácido gama amino butírico o GABA, pues se ha reportado la maquinaria de su síntesis en el sistema vestibular (células ciliadas, ganglio vestibular y fibras nerviosas). Aunque este transmisor realiza la mayor parte de su acción a través de la inhibición; se ha descubierto que durante el desarrollo y las primeras etapas después del nacimiento, GABA podría actuar como un neuromodulador incrementando la frecuencia de disparo de las aferentes vestibulares, esto se explica debido a un cambio en el gradiente de Cl^- (Cortés et al, 2013).

Embriología

Desarrollo del oído interno en vertebrados

En 1906 se realiza la primera descripción del desarrollo del oído interno en embriones humanos, el cual no difiere mucho entre vertebrados superiores (Streeter, 1906), sin embargo, la mayor parte de la investigación actual sobre los mecanismos moleculares implicados en la maduración del sistema vestibular y auditivo se realiza en animales de experimentación.

Durante la gestación de todos los vertebrados emergen gradualmente los componentes del oído interno, tanto de la porción auditiva (cóclea o papila basilar) como de la vestibular (canales semicirculares, sáculo, utrículo) incluyendo el ducto y saco endolinfáticos

(Bissonnette & Fekete, 1996). La primera fase del proceso es la proliferación de células que luego han de diferenciarse formando así al oído interno maduro (Torres & Giráldez, 1998).

Durante la formación del sistema nervioso, justo después del cierre del tubo neural, el oído interno comienza a desarrollarse a partir de una superficie gruesa del ectodermo llamada placoda ótica que se encuentra cercana al rombencéfalo (León et al, 2004; Bissonnete & Fekete, 1996; Bryant et al, 2002), vecina a los somitas 3 a 6 (Torres & Giráldez, 1998). Esta región lleva a cabo interacciones con el tubo neural, mesodermo y ectodermo adyacente (Wu & Oh, 1996) para comenzar su invaginación, convirtiéndose entonces en copa ótica; eventualmente se cierra y desprende de la capa ectodérmica formando la vesícula ótica u otocisto.

La vesícula ótica está delineada por epitelio pseudoestratificado capaz de desarrollarse en el oído interno maduro (León et al, 2004; Torres & Giráldez, 1998). El utrículo y los canales semicirculares se forman del área dorsal del otocisto, mientras que el sáculo, la lagena y otros órganos vestibulares y auditivos adicionales se forman del área ventral (León et al, 2004; Wu & Oh, 1996). Algunos neuroblastos (célula embrionaria que se convertirá en neurona) se desprenden de la pared ventromedial y anteroventrolateral del otocisto dando origen al ganglio craneal VIII (Wu & Oh, 1996).

La formación de los canales semicirculares en los vertebrados superiores sucede a partir de la evaginación de un saco de epitelio del otocisto dorsal que progresivamente aproxima sus paredes hasta formar un disco plano; su parte central forma una placa de fusión delgada que progresivamente desaparece para completar la formación del canal semicircular dejando un conducto que permanece continuo al resto de la estructura del oído interno (Bissonnette & Fekete, 1996). En los vertebrados inferiores esta evaginación forma proyecciones en forma de dedo hacia el lumen del otocisto. Los canales anterior y posterior son los primeros en fusionarse mientras que el canal horizontal es el último (León et al, 2004).

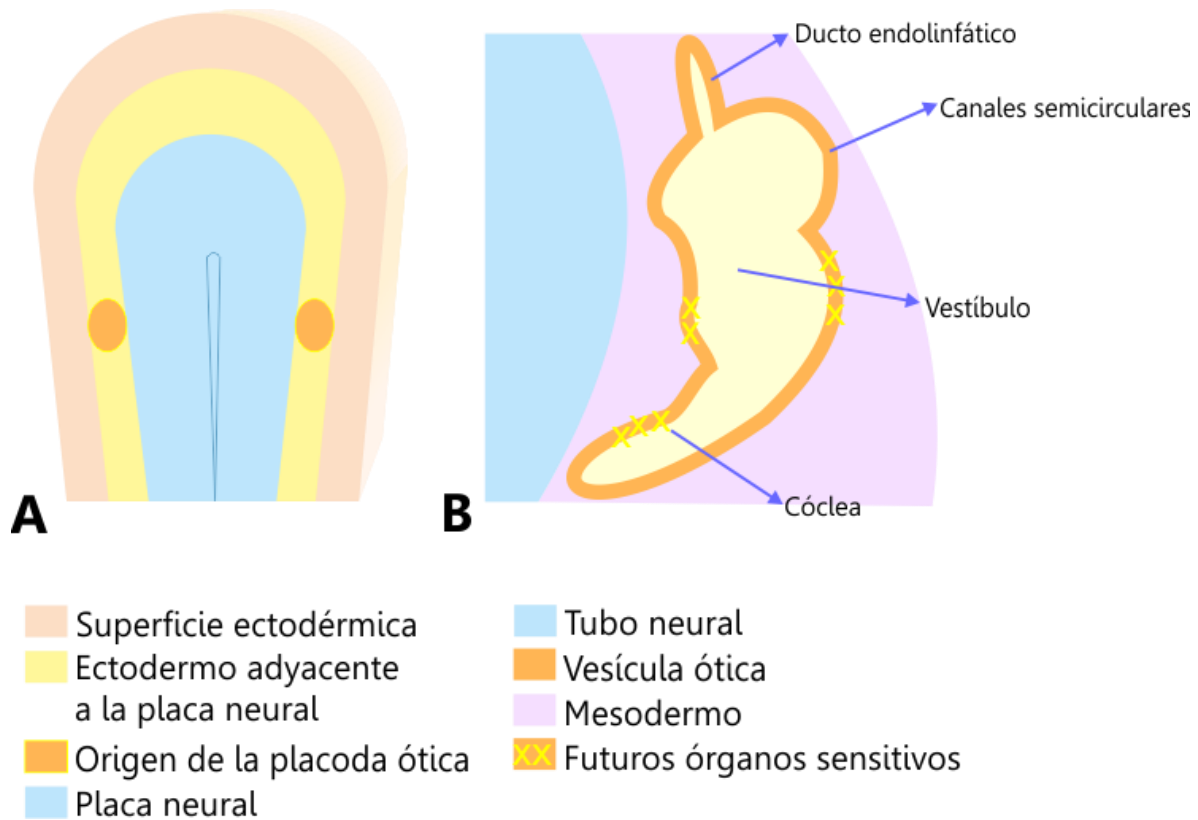


Figura 6. Esquema del desarrollo del oído interno de vertebrados. A. Vista superior de la mitad anterior del embrión temprano, se indica la localización de la placa ótica. B. Representación de la sección transversa del embrión a nivel ótico, diferenciación de la vesícula ótica y primordios de las diferentes regiones anatómicas. Tomado y modificado de Torres & Giráldez, 1998.

Durante el desarrollo del oído interno las células del otocisto llevan a cabo vías envueltas en muerte celular programada o proliferación para su supervivencia. La expresión de genes en esta etapa codifican factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de adhesión, factores de transcripción y neurotransmisores (León et al, 2004; Torres & Giráldez, 1998). Dentro de los factores de supervivencia y proliferación encontramos al factor de crecimiento parecido a insulina I (IGF-I) el cual es un factor de supervivencia que de manera independiente o en combinación con neurotropinas protege a la célula del daño ototóxico y la muerte celular; una disminución de IGF-I aumenta el grado de apoptosis (León et al, 2004).

En lo que se refiere a factores proapoptóticos existe especial atención al factor de crecimiento neural (NGF) y su receptor de baja afinidad p75NTR, el cual se ha identificado

como uno de los más fuertes inductores de muerte celular durante el desarrollo temprano del oído interno mediante la activación de proteólisis ya sea dependiente o independiente de caspasas (León et al, 2004).

Muchos genes mantienen su expresión a lo largo de todo el desarrollo de oído interno, aunque alguno de estos se vuelven específicos para ciertas regiones, participando en la diferenciación morfológica y funcional (Torres & Giráldez, 1998).

Las células del ganglio vestibular surgen antes que las del ganglio auditivo. Sin embargo de forma inicial los dos ganglios forman una sola estructura la cual, se va separando conforme avanza el desarrollo en los ganglios coclear y vestibular (Torres & Giráldez, 1998). La diferenciación del epitelio sensorial requiere la inervación de estos ganglios, por lo que sus proyecciones hacen contacto con la pared de la vesícula ótica volviéndola gruesa y representando el primordio de los órganos sensoriales (León et al, 2004). Se ha observado que al emerger y comenzar a diferenciarse los órganos sensoriales del oído interno se presenta la proteína morfogénica del hueso (BMP4), una proteína perteneciente a la familia del gen del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la cual estaría regulando el desarrollo de las células ciliadas y de soporte (Wu & Oh, 1996), también participando en otras vías como modulador para la formación de estructuras accesorias (Bryant et al, 2002).

Con ciertas diferencias entre especies, en el proceso de desarrollo de los cilios en las células del órgano sensorial transcurren los siguientes eventos; un brote de estereocilios salen de la superficie apical de la célula ciliada organizándose alrededor de un kinocilio central, cabe destacar que la longitud de todos los estereocilios es la misma. Posteriormente el kinocilio migra hacia uno de los extremos de la superficie de la célula y a partir de este momento se comienza a generar la elongación y el patrón descendente que caracteriza la organización de los estereocilios con respecto al kinocilio. Por último, las raíces de los estereocilios forman la placa cuticular y se establece el número final de proyecciones (Bryant et al, 2002).

Para que se lleve a cabo la inervación del oído interno, es esencial la formación de los ganglios la cual eventualmente conducirá inervación hacia los órganos sensitivos y

seleccionará únicamente los contactos sinápticos necesarios para el correcto funcionamiento del sistema. Se ven envueltas en estos mecanismos diversas neurotrofinas capaces de estimular la división celular en los ganglios, el crecimiento de proyecciones de estas células y determinar la supervivencia o eliminación de células y conexiones (Torres & Giráldez, 1998).

Desarrollo del oído interno en el *Gallus domesticus*

En las aves, específicamente en el pollo (*Gallus domesticus*), el periodo de gestaciones de veintidós días, durante los cuales se desarrolla el sistema vestibular; primeramente con cambios morfológicos y finaliza con aumento del tamaño del laberinto óseo y membranoso.

En pollo hacia el estadio 14HH (de 50-53 hrs de desarrollo), la placoda ótica comienza a evaginar (Hamburger & Hamilton, 1951). Mediante indicadores moleculares se ha observado que el orden de generación de los órganos sensoriales en el pollo es el siguiente: primero la cresta anterior, la posterior seguido de la mácula sacular, después la cresta lateral, papila basilar y lagena. Por último la mácula uticular (Wu & Oh, 1996).

Muchas neurotrofinas son marcadores de las fases iniciales de diferenciación en los diferentes elementos del oído interno durante los primeros días de gestación (E1-E4); dentro de estas se incluyen BMP4, Msx-1 para la crestas y la lagena, y p75NGFR sólo para las crestas(E4), Lunatic Fringe y Num entre otros (Wu & Oh, 1996).

En el tercer día de embrión (E3) se ha formado el otocisto, aunque se demuestran cambios en su forma hacia E4, cuando es posible observar una protuberancia dorsal y una ventral además de un hueco que se convertirá en el ducto endolinfático.

La protuberancia ventral continúa expandiéndose ventral y medialmente, para formar el ducto coclear, que contendrá a la papila basilar y la lagena.

Para E5 se pueden observar una expansión dorsal en el que se distinguirán un brote lateral que dará origen al canal semicircular de mismo nombre y un brote dorsal para los canales semicirculares anterior y posterior, este último delinearé su límite para cada canal hacia E6 (Bissonnette & Fekete, 1996; Wu & Oh, 1996).

Al inicio de E6 se inicia la expansión del ducto endolinfático para formar el saco endolinfático y durante los siguientes dos días este se alarga y posiciona medialmente para permanecer dorsal al cuarto ventrículo (Bellaris, 1998).

También en E6 se produce una rápida formación de los canales semicirculares con el proceso antes mencionado para los vertebrados; en orden de formación: el canal posterior y superior simultáneamente y al final el lateral en E6.5. Para esta etapa todavía no tienen su disposición ortogonal. El lumen de cada conducto es continuo y termina en la porción ventral del otocisto, la cual se convertirá en el utrículo (Bellaris, 1998).

La cresta ampular aparece primero como una simple protuberancia de cada canal antes de que la placa de fusión desaparezca, a lo largo de E6 se formarán indentaciones apicales para su maduración. En el pollo los cambios de altura y grosor de los estreocilios no suceden simultáneamente (Bryant et al, 2002).

El canal posterior y lateral van acercándose a su posición final en E9, el canal posterior forma un bucle sobre el canal lateral hacia E7, mientras que el canal lateral adquiere su posición formal de E7 a E9.

Para E9 el saco endolinfático ya tiene la forma más redondeada y grande. Y en el ducto coclear serán visibles los primordios del tegmentum vasculosum. Para esta edad la mayoría de los componentes membranosos del oído interno están formados, por lo que de E9 a E18 el principal cambio observado es el crecimiento del sistema. El eje dorso-ventral crece a una tasa de 0.47 mm/día, el eje medio-lateral crece 0.32 mm/día y el anteroposterior 0.35 mm/día (Bissonnette & Fekete, 1996).

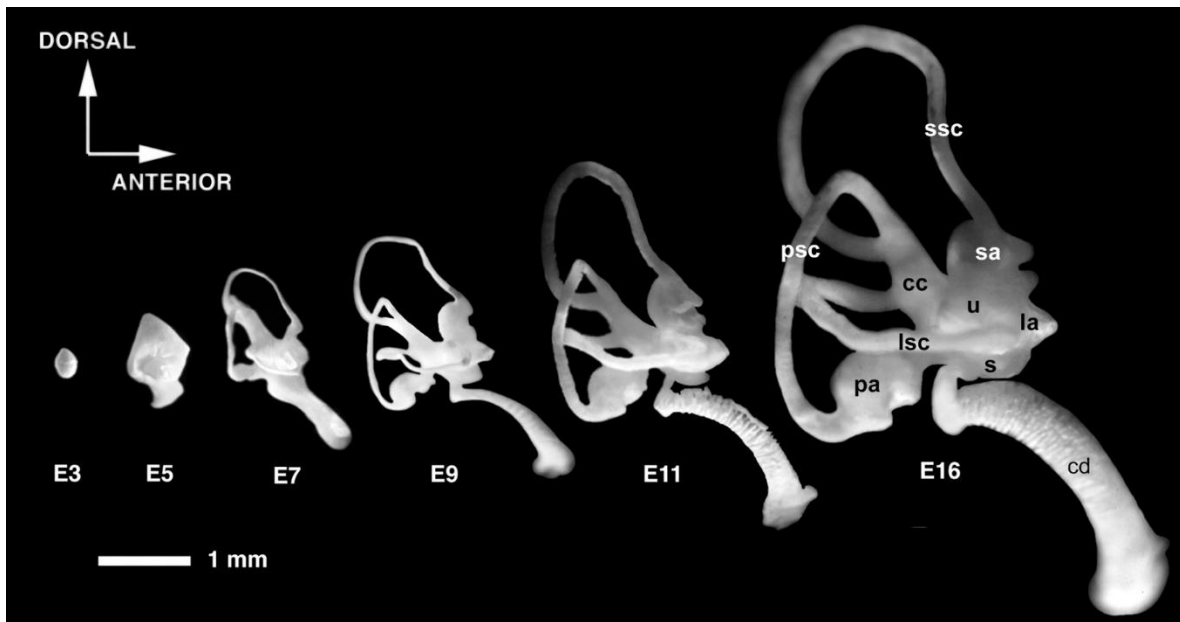


Figura 7. Morfogénesis del oído interno de pollo. Ha sido llenado con un tinte opaco; son mostradas vistas laterales. CC, Cruz común; la, ámpula lateral; lsc, canal semiirregular lateral; psc, canal semiirregular posterior; sa, ámpula superior; ssc, canal semiirregular anterior; u, utrículo. Tomado de Bissonnette & Fekete, 1996.

Generalidades del NO

El NO es un radical libre diatómico gaseoso, aunque de vida media muy corta, es reconocido por su actividad como segundo mensajero en distintos sistemas biológicos, como son el cardiovascular, renal, pulmonar, endocrino e inmunológico (Cooper & Roth, 2003). Fue descubierto en 1980 por Furchgott y Zawadzki como factor relajante derivado del endotelio (FRDE) y aunque se desconocía su naturaleza se sugirió que este componente podría ser algún compuesto nitrogenado, pues muchos años atrás estos compuestos comenzaron a utilizarse en pacientes para producir la respuesta vasodilatadora de FRDE, sin embargo, fue hasta 1987 cuando Moncada confirmó que este factor era NO, dando paso a una nueva etapa en la investigación, pues era el primer gas sintetizado en el organismo y con función biológica descubierto (de Berrazueta, 1999).

El NO es muy soluble en compuestos apolares y altamente lipofílico, debido a esta propiedad se piensa que la membrana celular podría actuar como un tipo de reservorio, ya que se ha evidenciado la presencia de NO alrededor de toda la membrana plasmática de células que poseen la maquinaria para su síntesis (Cooper & Roth, 2003; Rodrigo, 2009).

La concentración de NO en sistemas biológicos va de 10-400 nM y su vida media de apenas 3 a 5 segundos (Lancaster, 1996), sin embargo, su constante de difusión en agua generalmente es de $2-4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, este valor es directamente proporcional a la temperatura, a 37°C se calcula que este valor es de $3.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ y probablemente los límites de expansión de este gas se encuentre entre 0.3 y 0.4 mm (Anniko, 2000). El NO, por tanto, puede actuar localmente por su fácil difusión no distribuyéndose homogéneamente en el espacio, por lo que se considera ideal para actuar como un mensajero paracrino o autocrino (Rodrigo, 2009; Frammer, 2013). Además este gas puede atravesar las membranas biológicas sin la necesidad de algún receptor específico y actuar sobre las enzimas citosólicas rápidamente (Lancaster, 1996).

El NO es sintetizado a partir de la L-arginina por una enzima, la NOS, con tres variantes clasificadas en constitutivas o inducibles; se conocen dos isoformas del primer grupo y una del segundo, que a su vez están nombradas por su presencia en distintos tejidos, sin embargo esta última categorización puede ser arbitraria debido a que todas ellas hoy en día se han encontrado en una gran variedad de tejidos (Rodrigo, 2009; Marletta, 1993).

Dentro del grupo de las NOS constitutivas se incluyen la neural (nNOS o NOS tipo I), una enzima de localización citosólica descubierta primeramente en un amplio número de estructuras del sistema nervioso central y la endotelial (eNOS o NOS tipo III), que se puede encontrar en estado soluble o asociada a membrana (Marletta, 1993); para ambas la actividad es dependiente de Ca^{++} y calmodulina. Mientras que la única NOS inducible (iNOS o NOS tipo II) no es dependiente de Ca^{++} sino de la activación por ciertas citosinas (Rodrigo, 2009; Viant et al, 1998).

La NOS activa es una enzima dimérica, cuya unión depende de la presencia de hidrobiopterina (BH_4) (Li & Poulos, 2004). La NOS puede ser encontrada en su forma activa ya sea de forma soluble o anclada a la membrana a través de proteínas como CAPON (a través de dominios PDZ), PSD95 (asociando la enzima a con el receptor tipo NMDA). Además, la actividad de las NOS puede ser regulada positiva o negativamente por fosforilación, por la presencia de BH_4 y por la concentración de Ca^{++} intracelular (Li & Poulos, 2005; Zhou & Zhu, 2009).

Usando líneas celulares de humano, rata y ratón ha sido posible localizar los tres genes que codifican para las distintas NOS. El gen para la NOS tipo I, está localizado en el cromosoma humano 12 (12q24.2), el que codifica NOS tipo II está en el cromosoma 7 y, finalmente el gen de NOS tipo III se encuentra en el cromosoma 17. Cabe destacar que estos tres genes comparten aproximadamente un 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Rodrigo, 2009). Las NOS pueden ser modificadas y reguladas de manera post-traducciona con fosforilación o acilación con miristato o palmitato, y puede asociarse con otras proteínas solubles o del citoesqueleto (Murad, 2006). Las principales características de las NOS se muestran en la siguiente tabla:

	<i>Tipo</i>	<i>Gen que la codifica</i>	<i>Localización</i>	<i>Actividad regulada por</i>
<i>Constitutivas</i>	NOSI (155kD)	12	Sistema nervioso Músculo esquelético Islotes pancreáticos Endotelio respiratorio Tracto gastrointestinal Glándulas adrenales Mácula densa en riñón	Complejo Ca ⁺⁺ /calmodulina
	NOSIII (125 kD)	17	Endotelio vascular Sistema nervioso Plaquetas Miocitos cardiacos Placenta	Complejo Ca ⁺⁺ /calmodulina, proteínas de choque térmico

<i>Inducible</i>	NOSII	7	Macrófagos	Citocinas,
	(125 kD)		Músculo liso	lipopolisacárido
			Endotelio vascular	bacteriano
			Hipocampo	
			Cerebelo	
			Corteza	
			Hepatocitos	

Tabla 1. Clasificación de las NOS. Datos de Rodrigo, 2009; Förstermann & Sessa, 2012 y Murad, 2006.

Utilizando L-arginina, la NOS libera L-citrulina y NO, es esencial la participación del complejo Ca⁺⁺/calmodulina. La enzima posee sitios de unión para nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótico (FMN) y para el grupo hemo (hierro protoporfirina IX). La enzima actúa sobre la L-arginina, NADPH y oxígeno molecular, siendo estos los sustratos y utiliza como cofactores FAD y FMN, además se requiere la presencia de BH₄ (Knowles & Moncada, 1994).

La reacción lleva a cabo dos eventos de monooxigenización. Primero se incorpora un átomo de O₂ (oxígeno molecular) a la L-arginina, al mismo tiempo otro átomo se reduce y forma agua, obteniéndose N^ω-hidroxi-L-arginina (NOH-L-Arg). Después un electrón de NADPH, uno de NOH-L-Arg y el O₂ en forma de dioxígeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, lo que facilita la incorporación del oxígeno molecular y la separación del enlace de carbono-nitrógeno, el complejo Ca⁺⁺/calmodulina facilita el flujo de electrones en esta fase (Förstermann & Sessa, 2012). FAD y FMN funcionan como transportadores de electrones. Finalmente se libera un átomo de nitrógeno y L-citrulina. Un átomo de O₂ se reduce y forma agua mientras que otro se une al nitrógeno y forma el NO. La síntesis de NO es inhibido por CO (Marletta, 1993), además distintos derivados de la L-arginina pueden actuar como inhibidores competitivos de este proceso (Rodrigo, 2009; Viant et al, 1998). Mientras que las NOS constitutivas producen NO en concentraciones

nanomolares, la NOSII lo hace en concentraciones micromolares (Heinrich & Helling, 2012).

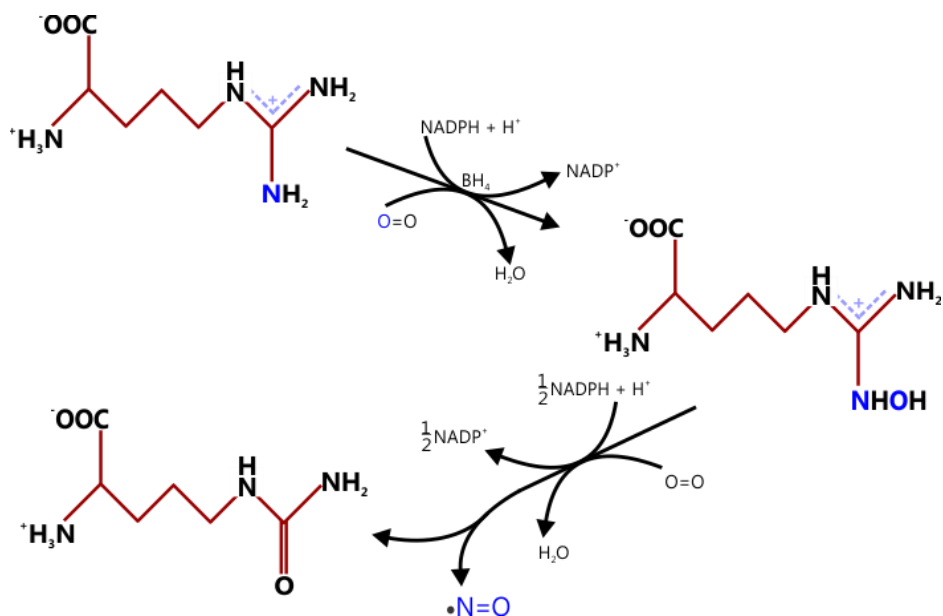


Figura 8. Reacciones de la NOS. Las letras en azul representan los átomos constituyentes del NO. Tomado y modificado de Knowles & Moncada, 1994.

El NO puede llevar a cabo múltiples reacciones, sin embargo dentro de las que abarcaremos aquí, están:

Primeramente y tal vez la más importante reacción del NO es la que lleva a cabo para activar su vía de señalización. En muchas proteínas como la GC el NO se une a un átomo de hierro de un grupo hemo ferroso.

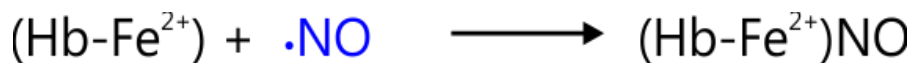


Figura 9. Unión de NO con grupo hemo. Lancaster, 1996.

Esta reacción también es importante cuando se lleva a cabo la destrucción del NO, principalmente en el torrente sanguíneo en una reacción con oxihemoglobina u oximioglobina. NADPH reducirá, posteriormente, la metahemoglobina resultante para producir nitrato.

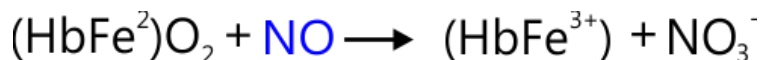


Figura 10. Reacción de degradación del NO. Rodrigo, 2009.

Por último y no menos importante se menciona la reacción del NO con el radical superóxido para formar el anión peroxinitrito. Esta reacción es importante en la respuesta inmunológica de macrófagos, en procesos inflamatorios y otros procesos patológicos (Lancaster, 1996).

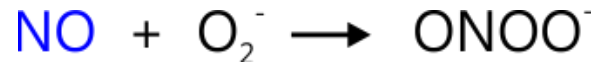


Figura 10. Formación de peroxinitrito. Lancaster, 1996.

En el sistema nervioso, a diferencia de un neurotransmisor; no existen reservas de NO, tampoco es almacenado en vesículas, sino que es sintetizado y liberado bajo ciertos estímulos, sin poseer un sistema de recaptura o reciclaje específico (Rodrigo, 2009).

Antecedentes específicos

Interacción del receptor tipo NMDA con NO

Durante la década de los noventa, se encontró la primera evidencia de que el NO podía regular la actividad sináptica y la plasticidad en el sistema nervioso; los primeros estudios en cerebelo, indicaban una relación estrecha entre la activación de receptores a aminoácidos excitatorios y la consecuente síntesis de NO (Vincent, 1996). Ahora es bien conocido que la síntesis de NO se da en respuesta típicamente debida a la activación de canales tipo NMDA por aminoácidos excitatorios, principalmente el glutamato, los cuales permiten la entrada de calcio (Ca^{++}) necesario para la activación de la síntesis del gas en las terminales aferentes (Anniko, 2000; Takumida & Anniko, 2004).

El receptor tipo NMDA es un subtipo de receptor a aminoácidos excitatorios, es un canal iónico dependiente de ligando, permeable a Na^+ , K^+ y principalmente Ca^{++} . Posee características de un canal operado por ligando, sensible a voltaje y dependiente de uso. Este canal es bloqueado por Mg^{++} , negativamente modulado por Zn^{++} y exceso de protones. Este receptor también posee varios sitios redox, los cuales participan en la modulación de su actividad (Contestabile, 2000).

Para que el receptor NMDA sea funcional debe estar conformado por combinaciones de distintas subunidades. La subunidad NMDAR1 tiene ocho isoformas que corresponden a procesos de empalme alternativo del mismo gen y la NMDAR2 posee cuatro variantes correspondientes a diferentes genes. Así, las combinaciones de estas subunidades en el receptor tendrán propiedades específicas de conductancia, eficacia de bloqueo y regulación por distintos moduladores (Contestabile 2000). El NO puede modular la liberación de neurotransmisor dependiendo el estado funcional del receptor NMDA con el que interactúa.

La activación de receptores de aminoácidos excitatorios (Principalmente NMDA, aunque Prast y Philippu en 2001 menciona que AMPA o kainato ejercen la misma acción) en una célula postsináptica provoca el influjo de Ca^{++} del espacio extracelular al citoplasma, aumentándolo hasta concentraciones mayores a 400nM, este ión es capaz de activar la síntesis de NO (Esplugues, 2002; Prast & Philippu, 2001). Podemos decir entonces, que el Ca^{++} es el puente entre un estímulo extracelular a partir del cual el neurotransmisor glutamato interactúa con su receptor NMDA y genera NO por la vía dependiente de este ion.

Una vez sintetizado el NO ejerce su acción directamente por nitración u oxidación de proteínas, ejerciendo su efecto a los pocos minutos (Prast & Philippu, 2001; Ahern et al, 2002) o a través de la activación de la enzima GC soluble (sGC) a los pocos segundos en una reacción como la antes expuesta, en la que una molécula de NO se une a un grupo hemo prostético de la GC formando un nitrosil-hemo (NO-hemo), este complejo es el responsable de la activación de la enzima y sin el grupo hemo presente la activación por NO es imposible. En estado activado la GC cataliza la producción de GMPc a partir del guanosin trifosfato (GTP) (Lancaster, 1996).

Este producto puede modular en distintas formas el funcionamiento celular, mayoritariamente a través de protein-quinasas dependientes de GMPc (PKG, de la cual existen dos tipos; la tipo I existe en forma soluble y está ampliamente distribuida en los tejidos, mientras que la tipo II está asociada a la membrana celular), también puede asociarse a canales iónicos, a fosfodiesterasas (PDE; específicamente PDE2, PDE3, PDE4, PDE5, PDE6, PDE10 Y PDE11) o ADP ribosil ciclasa. La activación de la GC por NO implica un aumento en la actividad catalítica y producción de GMPc de 50 hasta 200 veces,

esto puede ser debido a que el cambio conformacional aumenta su afinidad por el sustrato GMP-Mg (Lancaster, 1996).

Las PDE son enzimas específicas que hidrolizan nucleótidos cíclicos, regulando sus concentraciones. Existen 11 variantes de PDE clasificadas así por el sustrato al que se unen, su farmacología y el gen que las codifica (Lugnier, 2006). Así como el GMPc puede unirse a estas y modular su función, son estas enzimas las encargadas de degradarlo; la PDE5, PDE6 y PDE9 son específicas para GMPc; lo convierten en 5'-GMP, mucho más estudiadas en retina (Feldman et al, 1997), mientras que PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11 pueden actuar sobre GMPc y AMPc (Lugnier, 2006).

Efectos del NO en el sistema nervioso

En los sistema biológicos es NO tiene un importante papel en la regulación de la presión intravascular por su efecto vaso-relajante, participa inhibiendo la adhesión plaquetaria y promoviendo también la adhesión de las células blancas polimorfonucleares (Viant et al, 1998). Su actividad también es significativa en la respiración celular modulando el consumo de oxígeno de distintos tipos celulares, en la motilidad del tracto gastrointestinal, en la broncodilatación y la modulación y desarrollo de las fibras musculares entre otras funciones (Esplugues, 2002).

En 1977, se demostró que existía un factor estimulante de la GC en el sistema nervioso (corteza cerebral de ratón), hacia 1982 se identificó este factor como L-arginina, y en 1988 Garthwaite y colaboradores exponen los primeros trabajos en los que se afirma que el NO puede estar involucrado en el sistema nervioso como un mensajero intercelular mediante la vía L-arginina-NO, identificándose posteriormente la presencia de NOS en distintas áreas del sistema nervioso (Moncada & Higgs, 1991) y dándole un papel en procesos fisiológicos tales como aprendizaje y memoria, regulación del sueño, reproducción, lactancia y en distintos procesos patológicos como la isquemia, la citotoxicidad, inflamación, neurodegeneración y envejecimiento (Viant et al, 1998; Frammer, 2013).

Se ha evidenciado que el NO actúa como neuromodulador de una vasta diversidad de transmisores y receptores, por ejemplo, puede reducir la actividad de ácido (-amino-butírico

(GABA) a través de interacciones con sus receptores, se ha demostrado en preparaciones *in vivo* que la inhibición de la NOS disminuye la liberación de acetilcolina (ACh) en núcleo accumbens y cerebro anterior, por lo que se piensa tiene un efecto facilitador en esta transmisión. En hipocampo el NO actúa como un mensajero retrógrado pues influye en la transmisión sináptica en la célula presináptica promoviendo la potenciación a largo plazo (LTP del inglés Long-Term Potentiation) (Prast & Philippu, 2001).

Estudios *in vivo* de núcleos basales de rata, la síntesis de NO está ligada a la estimulación por receptores NMDA, en este caso, el NO modula la descarga de interneuronas colinérgicas a través de la vía de GC/ GMPc de forma negativa (Di Giovanni et al, 2003).

También se ha propuesto que el NO actúa directamente sobre proteínas, como lo es el receptor tipo NMDA a través de una nitración, mediante la transferencia de NO a grupos tiol en ciertos aminoácidos, en hipocampo esta nitración se propone como un mecanismo de retroalimentación negativa que protegería del daño provocado por la sobreactivación de los receptores NMDA (Hopper et al, 2004) aunque para que se lleve a cabo esta reacción las concentraciones de NO deben ser relativamente altas (Contestabile, 2000).

En contraste con estos hallazgos en 1994 se mostró en hipocampo de ratas que donadores de NO entre ellos nitroprusiato de sodio pueden activar la liberación de vesículas en una vía que no involucra un aumento de Ca^{++} para la fusión de las membranas, proponiendo que el NO podría funcionar mimetizando al Ca^{++} , o actuando directamente sobre proteínas a través de la S-nitración o ADP-ribosilación. Para 1996 se pudo estudiar la respuesta de las proteínas involucradas en la exocitosis a la aplicación de donadores de NO, se observó un aumento en la formación de complejos proteicos de fusión vesicular (SNAP25-VAMP-sintaxina1) por lo que se sugirió que el NO podría actuar directamente sobre el estado de las proteínas (Meffert et al, 1996). Sin embargo todos estos resultados se proponen en animales adultos.

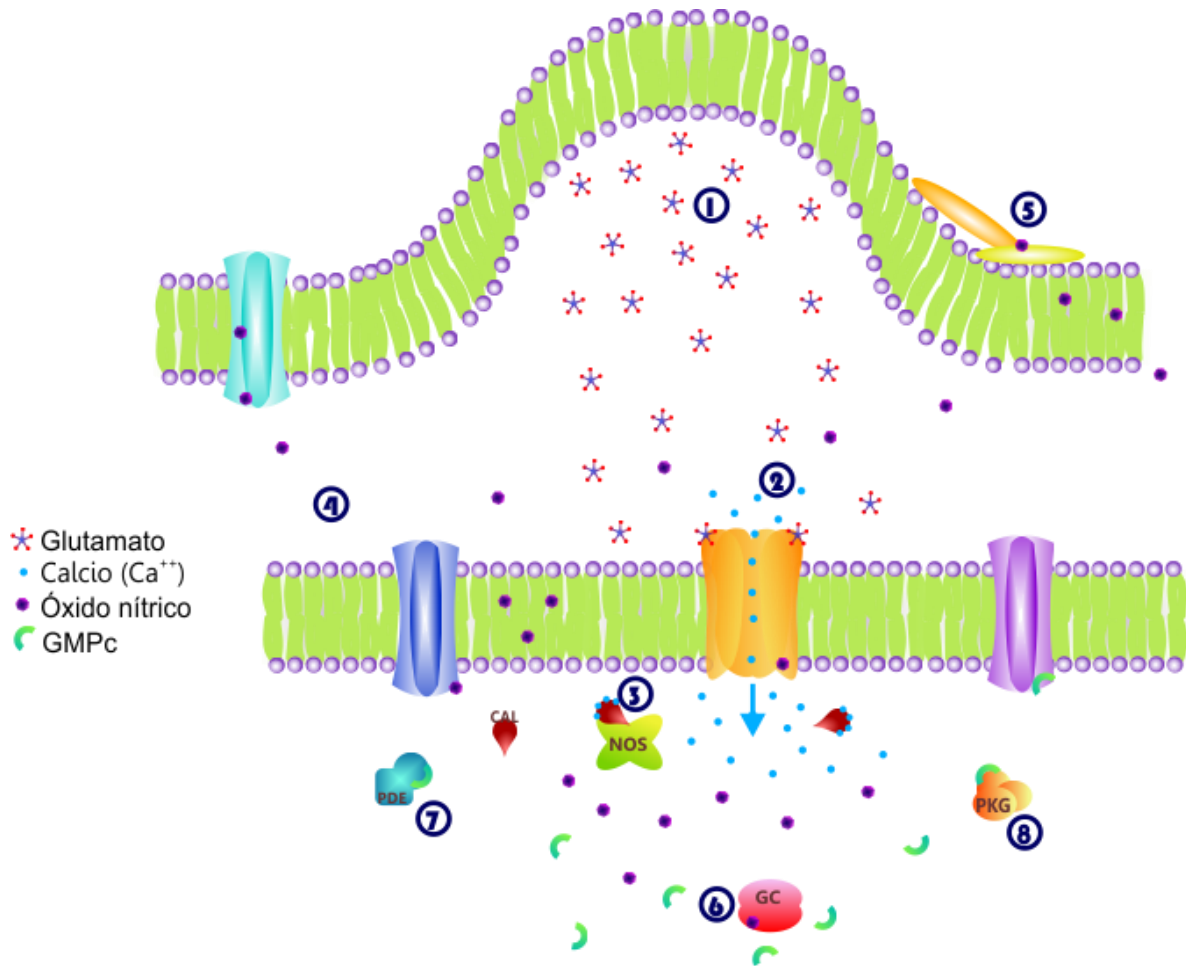


Figura 11. Mecanismo de acción del NO. La liberación de glutamato por la fusión de vesículas en la membrana presináptica (1), y su consecuente unión al receptor tipo NMDA en la célula postsináptica (mostrado en anaranjado), produce el influjo de Ca⁺⁺ (2). Este ion se une a calmodulina para formar el complejo Ca⁺⁺/calmodulina, necesario para la activación de la NOS y síntesis de NO (3). NO puede actuar directamente por nitración de canales iónicos localizados pre y postsinápticamente (4) o de proteínas participantes en la exocitosis como syntaxina-1 y SNAP-25 (5). El NO también activa a la GC para formar GMPC (6) que puede regular la actividad de fosfodiesterasas PDE (7), o proteincinasas dependientes de GMPC (PKG) (8).

La producción de NO dependiente de la activación de los canales tipo NMDA durante la maduración del sistema nervioso fue evidenciada en 1991, aunque ya se había estudiado esta respuesta en cerebelo de ratones adultos. En este estudio, se probaron antagonistas de la NOS en hipocampo de ratones de 6 a 9 días de nacidos. Se observó un cambio en la concentración de GMPC sintetizado por la activación del receptor tipo NMDA dependiente de la dosis aplicada de los fármacos. Es importante mencionar que esta actividad era

dependiente de la activación del receptor tipo NMDA, y la efectividad de activación disminuía a mayor edad. (East & Garthwaite, 1991).

La aplicación de antagonistas del receptor NMDA en cerebelo y corteza de rata disminuye la actividad catalítica de NOS1, tanto en desarrollo como en edades postnatales, igual de importante es la observación de que los niveles más altos de expresión de la NOS son en etapas iniciales y tardías de sinaptogénesis, posiblemente determinando la fase proliferativa de las células (Contestabile, 2000).

Asimismo, se demostró en retina de embriones de pollo que el NO podría tener un papel importante en la sinaptogénesis y la formación y diferenciación de tejido neuronal. Esto se demostró monitoreando la actividad de la NOS durante la etapa de desarrollo de la retina; se observó una mayor actividad de la enzima en los primeros días de desarrollo E6 y E7 que fue disminuyendo hasta alcanzar su mínima actividad en E13, esta actividad también fue dependiente de la activación del receptor tipo NMDA y un aumento citosólico de Ca^{++} , lo que indica la presencia de las NOS constitutivas en un nivel de expresión que se relaciona con el estado de desarrollo (Ientile et al, 1996). Wu et al en 2001 demostraron que la aplicación de inhibidores de la NOS en embriones de pollo evitaba el refinamiento de las proyecciones retinotectales durante los días embrionarios de E11 a E17, modificando la topografía final de esta vía, sugiriendo un papel para el NO en la maduración de las conexiones sinápticas y el crecimiento axonal (Wu et al, 2001).

Ratones knock-out sin expresión de la NOS1 disminuyen su número de dendritas en motoneuronas, modificando la arquitectura final de la célula, además el uso de antagonistas del receptor tipo NMDA puede provocar el mismo efecto en ratones normales, lo que le da al NO cierta participación en la maduración de tejido neural promoviendo su crecimiento (Inglis et al, 1998).

En cultivos de células granulares provenientes de cerebelo de rata en desarrollo se ha estudiado la activación de la GC en respuesta a la estimulación del receptor NMDA y en presencia de NO. La enzima se presenta en dos isoformas, la primera posee las subunidades $\alpha1\beta1$ y la segunda $\alpha2\beta1$. Los resultados indican que la presencia de estas dos isoformas varía en el desarrollo; siendo la subunidad $\alpha1$ predominante en los siete primeros días

postnatales y $\alpha 2$ en cultivos de dos semanas (Jurado et al, 2003). La expresión de estas subunidades también cambia en relación a la estimulación con NMDA que se ve modificada en desarrollo, además esta enzima parece estar regulada por la concentración de Ca^{++} citosólica (Parkinson et al 1999). Se ha propuesto por las evidencias encontradas que el receptor tipo NMDA se encuentra en cercana posición con la NOS y la GC, y que esta asociación puede conferir una mayor sensibilidad en respuesta a la activación del receptor tipo NMDA (Jurado et al, 2003). Aunque estos mecanismos todavía no están bien establecidos, se piensa que la vía de NO dependiente de la activación de NMDA puede estar implicada en proliferación, crecimiento y migración neuronal.

NO en el sistema vestibular

En el oído interno el glutamato es neurotransmisor predominante en las sinapsis entre las células ciliadas y las aferentes primarias. Las vesículas contenedoras de neurotransmisor están presentes en células ciliadas, mientras que sus receptores están distribuidos en los dos tipos celulares antes mencionados (Anniko, 2000).

En condiciones normales se ha comprobado la presencia de la NOSI en oído interno, en el sistema vestibular se encuentra presente en ganglio vestibular, células ciliadas, terminales caliciformes de las fibras nerviosas, células oscuras y de transición (Takumida & Anniko, 2004; Hess et al, 1998); mientras que la NOSIII se presenta en ganglio vestibular y fibras nerviosas aferentes, se encuentra en ciertas cantidades en las células ciliadas (Hess et al, 1998). En algunas condiciones patológicas como edema se ha encontrado actividad de la NOSII regulando el flujo sanguíneo (Takumida & Anniko, 2004). De manera importante se reporta la presencia de NOS II en oído interno de ratones en desarrollo, en cantidad substancial durante las etapas de maduración de las células receptoras y en cantidades cada vez más bajas conforme el sistema llega a su estado de adulto, sustituyendo la enzima por la NOSI y NOSIII (Arnhol et al, 1999).

El NO producido en un botón aferente puede incrementar la transmisión de las células ciliadas, mientras que el NO producido en células ciliadas sólo actúa sobre células vecinas y no sobre sí mismas. El exceso de GMPc deprime el acople eléctrico incrementando la tasa de disparos espontáneos y estimula la liberación de aminoácidos excitatorios (Takumida &

Anniko, 2004). Se demostró que el NO modula corrientes de Ca^{++} tipo L en células ciliadas vestibulares de cresta ampular de rata; el NO disminuye esta corriente mediada por canales voltaje dependientes sin efectos en la tasa de activación e inactivación. Se pudo demostrar en este estudio que esta modulación es debida a la activación de la vía indirecta NO-GMPc-PKG y la vía directa por S-nitrosilación de los canales (Almanza et al, 2007). Se ha demostrado que el NO inhibe la corriente rectificadora de potasio en células tipo I de la cresta ampular de rata, sugiriendo la capacidad de aumentar la excitabilidad de la membrana (Chen & Eatock, 2000)

En anfibios se ha registrado la actividad aferente vestibular en presencia de algunos donadores de NO e inhibidores de la NOS, se observó que el inhibidor de la NOS L-NG-nitroarginina (L-NOARG) disminuye la tasa de disparos de las aferentes que inervan a los canales semicirculares, de la misma forma, donadores de NO aumenta esta descarga basal, sugiriendo un importante papel del NO como modulador del sistema vestibular que además está estrechamente relacionado con el receptor a glutamato NMDA (Flores et al, 2001). También se ha comprobado en ranas que las células ciliadas pueden liberar cantidades mayores a 50nM de NO, pero en contraste con anteriores hallazgos, el NO y sus donadores actúan incrementando la corriente requerida para generar una oscilación en el potencial y por lo tanto disminuyendo el número de oscilaciones, a través de la nitración directa de canales de Ca^{++} y de potasio dependiente de Ca^{++} (BK); estos efectos alterarían la excitabilidad de las células ciliadas reduciéndola y aumentarían el umbral requerido para la inducción de oscilaciones de membrana, sugiriéndose como un mecanismo de retroalimentación negativa. Además se reporta que la inervación eferente por ACh aumenta al menos tres veces la liberación de NO (Ping et al, 2010).

Existen antecedentes en nuestro laboratorio de que el NO modula la actividad de las fibras aferentes vestibulares y que posiblemente el receptor NMDA juega un papel importante en este sistema y que la vía NO/GMPc podría regir estas respuestas (Gómez Rivera, 2004), sin embargo sólo se estudiaron inhibidores de NOS inespecíficos y no se hicieron estudios de identificación de los ARNm de las NOS que pudieran estar presentes en la sinapsis célula ciliada-neurona aferente.

Con todos los antecedentes mencionados, todavía es difícil dilucidar la función que ejerce el NO en el sistema vestibular, ya que al conocerse la presencia de la NOS en la células ciliadas así como en terminales aferentes y eferentes del oído interno, afirmamos que es indispensable para el funcionamiento óptimo de este sistema, pero es difícil tener conclusiones en cuanto a desarrollo y la función precisa de este gas como neuromodulador durante el desarrollo.

Planteamiento del problema

Se conoce la participación del NO en muchos procesos del sistema nervioso como son la memoria, la citotoxicidad, el envejecimiento y el ciclo sueño-vigilia, entre otros (Esplugues, 2002; Frammer, 2013). Existen reportes que indican la presencia de distintos tipos de NOS en el sistema nervioso (Viant et al, 1998), incluyendo al sistema vestibular (Anniko, 2000). Sin embargo, estos trabajos exponen resultados de la modulación por NO en etapas adultas, pero con resultados variables, ya que en algunos de ellos, el NO regula positivamente la liberación del neurotransmisor (Flores et al, 2001) y en otros sucede lo contrario (Schuppe & Newland, 2004).

Se sabe que durante el desarrollo de muchas especies animales, existen procesos similares que llevan a la maduración de un individuo. Tanto el sistema vestibular como la vía del NO se encuentra conservada en distintas especies (Torres & Giráldez, 1998; Nott & Riccio, 2009). Durante el desarrollo es clara la maduración del sistema vestibular, pues se observa un aumento gradual de la actividad eléctrica espontánea, además, se sabe que durante estas etapas los donares de NO pueden modificar esta actividad. Parece evidente entonces la importancia de dilucidar los mecanismos por los cuales el NO participa en la maduración del sistema vestibular y de qué forma modifica la descarga de las fibras aferentes pues parece tener un destacado papel en este proceso dinámico parcialmente conocido, por lo que identificar la(s) NOS presentes en el sistema en desarrollo, ya sea coexistiendo o no, resulta indispensable para integrar el papel que el NO juega en el sistema vestibular.

En el sistema vestibular de modelos animales adultos, se ha reportado la presencia de la NOS en las diferentes estructuras que lo conforman, siendo consistente con los reportes que indican que el NO contribuye significativamente a la descarga basal y a la respuesta de las fibras aferentes ante estímulos mecánicos (Flores et al, 2001). Así, el NO podría probablemente participar en la codificación sensorial y en los cambios adaptativos de la salida vestibular en condiciones normales y patológicas (Flores et al, 2001), adicionalmente, estudios realizados en las neuronas aferentes vestibulares, sugieren que la sobreproducción de NO se encuentra íntimamente relacionada con la ototoxicidad (Hong et al, 2006). Se ha sugerido además, que el NO juega un papel importante en las vías vestibulo-autonómica y vestibulo-espinal (Holstein et al, 2001).

Existen evidencias de que el mecanismo de acción del NO en el sistema vestibulococlear es a través de la vía NO-GMPc; la cual ejerce efecto sobre los canales de Ca^{++} . Esta modulación de los canales de Ca^{++} por NO constituye un mecanismo efectivo para el control de los niveles de Ca^{++} intracelular en las células ciliadas, modificando por tanto la liberación de neurotransmisor (Ping et al, 2010; Hess et al, 2006; Almanza et al, 2007). El NO también puede modular canales de Ca^{2+} independientemente de la vía NO/GMPc a través de una modificación directa sobre la proteína del canal por una reacción de S-nitrosilación (Ahern et al, 2002).

Con respecto a la participación del NO durante la ontogenia del sistema vestibular sólo hay un trabajo que reporta la presencia de la NOS tipo II a lo largo de la receptorgénesis vestibulococlear en el ratón (Arnhold et al, 1999). En nuestro laboratorio se conoce que el NO a través de la vía NO/GMPc participa en la actividad eléctrica espontánea de las neuronas aferentes vestibulares en embriones de pollo de la especie *Gallus domesticus* en edades tempranas del desarrollo como E15 (Gómez Rivera, 2004). Esta vía posiblemente se inicia por activación de los receptores NMDA y no por receptores no-NMDA como se ha reportado en otras estructuras cerebrales (Oh & McCaslin, 1996; Baltrons & García, 1997).

Sin embargo no se ha determinado durante el desarrollo embrionario, qué NOS está presente, o si en algún momento coincide la expresión de todas, llevando a cabo funciones específicas dependiendo de la etapa crítica de desarrollo en que se localicen.

Objetivos

Objetivo general

Demostrar la presencia y participación de la NOS en la modulación de la descarga espontánea de las aferentes vestibulares del pollo durante el desarrollo embrionario.

Objetivos específicos

- ∞ Analizar los cambios producidos en la frecuencia de descarga espontánea de las aferentes vestibulares mediante el empleo de un inhibidor inespecífico de la NOS (L-NOARG) y de un inhibidor específico del tipo neuronal NOS I (7-NI) en las edades E15, E17, E19 y E21.
- ∞ Corroborar mediante la técnica de RT-PCR la presencia del ARNm de los tres tipos de NOS (NOSI, NOSII y NOSIII) tanto en crestas (células ciliadas), como en los ganglios vestibulares (neuronas aferentes) en las edades ya mencionadas, E15, E17, E19 y E21.

Material y métodos

Se utilizaron embriones de *Gallus domesticus* de las edades de E15, E17, E19 y E21 (confirmando la edad con base en los estudios realizados por Hamburger y Hamilton, 1951), comprados en la avícola ALPES (Aves Libres de Patógenos Específicos) de Tehuacán, Puebla. El mantenimiento de los embriones fue cuidadosamente vigilado, bajo control de temperatura (entre 38.5 a 39.5 °C), y de humedad (60%) en una incubadora Thermo Scientific.

Solución para disección y registro electrofisiológico

Se utilizó solución Ringer libre de Mg^{++} para ave, cuya composición es la siguiente (mM): 124 NaCl; 5KCl; 2.2 NaHPO₄; 26 NaHCO₃; 2.2 CaCl₂; 10 glucosa. Esta solución es burbujeadada con gas carbógeno (5% CO₂ y 95% O₂; INFRA) durante 15 minutos para saturarla de oxígeno y ajustar el pH entre 7.3 y 7.4 (Peusner y Giaume, 1997).

Disección

Para poder iniciar la disección, se anestesió a cada embrión por disminución de temperatura durante 15 min aproximadamente, después de este tiempo se removió el embrión del huevo y se decapitó rápidamente, se aisló el exceso de piel y tejido que pudiera interferir o ensuciar la muestra.

Se retiró el maxilar inferior y parte del cerebro para facilitar el acceso y el manejo de la muestra; bajo un microscopio estereoscópico se accedió a la cápsula ótica, específicamente a nivel del ámpula posterior que se descubrió junto con el nervio correspondiente, el cual, se seccionó justo por debajo de su entrada al tallo cerebral. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una cámara con solución Ringer con burbujeo constante con gas carbógeno y su realización no llevó más de veinte minutos.

Posteriormente se separó la región vestibular y esta preparación se colocó en una cámara de registro que se encuentra sobre una mesa antivibratoria (Micro-g 63-563, TMC), aquí se

detalló la disección y en este caso se perfundió con solución Ringer a 2ml/min a una temperatura de 37 °C (TC-102. Medical System Co. USA).

Técnica de registro extracelular multiunitario

Se registró la actividad eléctrica conjunta de todas las fibras aferentes del nervio del ámpula posterior; para esto se utilizó un electrodo de succión montado en un micromanipulador, acoplado a un amplificador AC (P-511, Grass) y a un discriminador de ventana (WPI). La señal se visualizó en un osciloscopio (Tektronix 2201) y la actividad espontánea se capturó en el software “Infig” para su posterior análisis estadístico. Se utilizaron L-NG-Nitroarginina (L-NOARG), un inhibidor no específico de la NOS y 7-Nitroindazole (7-NI), inhibidor específico de la NOSI. La aplicación de fármacos inhibidores de la NOS se realizó por sustitución en el baño de la preparación a la concentración requerida de cada fármaco.

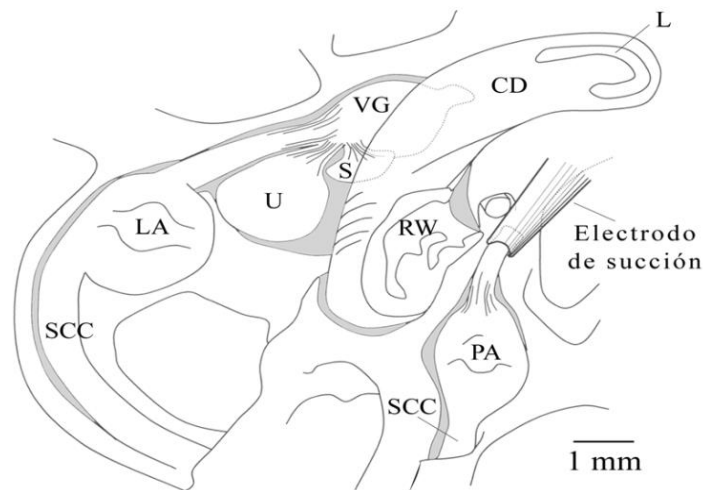


Figura 12. Esquema del registro extracelular multiunitario.

Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR)

Para determinar la expresión génica de los tres subtipos de NOS se llevó a cabo la cuantificación relativa de los transcritos expresados mediante análisis de RT-PCR (técnica semicuantitativa).

Extracción del ARNm

Las muestras correspondientes a las crestas y ganglios vestibulares del oído interno del pollo de las edades E15, E17, E19 y E21 se extrajeron y se colocaron en un tubo de microcentrífuga que contenía 500µl de buffer de lisis preparado de la siguiente manera: por cada 1ml de Buffer FARB se agregó 10µl de β -mercaptoetanol. Se homogenizó la muestra con la ayuda de un ultra-sonicador de punta y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

A partir de estas muestras se procedió a realizar la extracción de ARN empleando un kit comercial Favorgen BIOTECH Corp; siguiendo las indicaciones del fabricante se resume ahora el proceso:

La muestra se mantuvo almacenada según su edad y origen. Se resuspendió y se transfirió a una columna de filtrado dentro de un tubo colector y se centrifugó a 13200RPM por 3 min.

El supernadante se transfirió a un tubo y se agregó etanol al 70% en un volumen igual al de la muestra y se revolvió. Posteriormente se transfirió a la columna FARB dentro de un tubo colector y se centrifugó a 13200RPM por 3 min.

Se realizaron tres lavados, desechando primero el líquido sobrante:

Se agregaron 500µl de buffer de lavado 1 del kit y se centrifugó 3 minutos a 13200 RPM y desechó el líquido sobrante que quedaba en el tubo colector.

Se agregaron 500 µl de buffer de lavado 2 del kit y se centrifugó 3 minutos a 13200 RPM y desecha el líquido sobrante.

Se repitió el paso anterior se centrifugó la columna para eliminar por completo el líquido a 13200 RPM por 3 minutos y se desechó el líquido sobrante.

En un tubo de elución, se agregaron 30 µl de agua libre de ARNasas sobre la columna y se incubó por 1 minuto.

Finalmente se centrifugó 3 minutos a 13200 RPM y el ARN obtenido se almacenó a -20°C hasta comenzar con el procedimiento para RT-PCR.

La concentración total y calidad del ARN fue determinado mediante espectrofotometría; se consideró la calidad óptima del ARN cuando el cociente de absorbancia 260/280 fue mayor a 1.6 y presentó una concentración mayor a 150 µg/ml.

Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa

Se sintetizó el ADNc correspondiente por medio de una enzima transcriptasa reversa a partir del ARN aislado. La RT se llevó a cabo empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, para el que se siguió en procedimiento propuesto por el fabricante.

Se prepararon tubos de reacción de 20:1 cada uno para obtener una concentración final de 2:µg de ARN por condición. Se elaboró una mezcla maestra para tubos de reacción con volumen final de 20:1.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen en µl</i>
<i>Buffer RT</i>	2
<i>dNTP's</i>	0.8
<i>Iniciadores aleatorios</i>	2
<i>Transcriptasa reversa (MuLV)</i>	1
<i>ARN</i>	2:µg

El volumen restante fue completado con agua (12.2:1).

Estos tubos se sometieron al siguiente protocolo en un termociclador Mastercycler gradient, Eppendorf:

10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 minutos a 85°C y finalmente se redujo la temperatura de los tubos a 4°C para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

Para amplificar en ADNc mediante PCR de manera semi-cuantitativa se usó el reactivo Dream Taq PCR Master Mix 2x, Thermo Scientific; se separaron los tubos de reacción con un volumen final de 20:1.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (:l)</i>
<i>Dream Taq PCR Master Mix 2x</i>	10
<i>Oligonucleótidos Forward</i>	1
<i>Oligonucleótidos Reverse</i>	1
<i>Agua</i>	6
<i>ADNc</i>	2

El protocolo constó de las siguientes fases:

Desnaturalización. Las muestras se calentaron hasta 94°C durante 30 segundos.

Alineación. La temperatura descendió durante 30 segundos hasta la temperatura promedio de alineamiento requerido para cada par de oligonucleótidos.

Extensión. La temperatura subió hasta 72°C por un minuto para permitir que la enzima Taq se uniera a cada cebador y sintetizara una nueva cadena de ADNc.

Este ciclo se repitió 40 veces con el objetivo de obtener millones de copias del fragmento de interés.

Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron diseñados mediante el software proporcionado por IDT (Integrated DNA Technology) para identificar los ARMm que codifican para la NOSI de pollo (por análisis bioinformático) y ratón, NOSII y NOSIII de pollo. Fueron adquiridos mediante la empresa Sigma-Aldrich.

	<i>Secuencia sentido (F) y antisentido (R)</i>	<i>Número de acceso</i>	<i>Producto en pares de bases (pb)</i>
<i>NOSI</i>	F: CCAGCCAACCAGCTAGTAAA R: GAGAGGAGCTGATGGAGTAGTA	XM_425296	376
<i>NOSII</i>	F: TTGGTCTCCACTTCTGTTTCC R: GGCCAGGTGCTCTTCTATTT	NM_204961	625
<i>NOS III</i>	F: CCTCTGCTCCCATATCCAATAC R: CAGCACAGCAATGTTCATCTC R: CAGACTAGGGTTGCCAGATTA	ACC# JQ434754	592

Electroforesis

Los productos de la PCR fueron separados electroforéticamente mediante un gel de agarosa al 1.2% preparado de la siguiente manera:

Se agregaron 0.6g de agarosa en 50ml de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE), la solución se calentó por un minuto y medio para disolver perfectamente la agarosa. Se añadieron 4:1 de bromuro de etidio (BrEt) y a la solución, la cual se transfirió al soporte del gel, dejándolo gelificar por 40 minutos a temperatura. Las muestras se colocaron en los pozos correspondientes del gel; se combinaron 8:1 de la muestra de PCR con 15:1 de buffer de

carga, cargando en cada pozo 20:1 Como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial GeneRuler 100pb DNA Ladder.

La separación electroforética se realizó en buffer TAE a 65 V durante 90 minutos y finalmente se visualizó en un documentador de geles ChemiDoc (Bio-Rad).

Análisis estadístico

La captura en línea de los registros multiunitarios fue realizada con el software “infig” versión 5.6 elaborado por Soto y Vega en 1987. Se analizaron los datos considerando a la edad y la concentración como factores independientes mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y una prueba SNK (Student-Newman-Keuls) de comparación múltiple para obtener la significancia estadística. Se consideraron significativos aquellos resultados estadísticos con una probabilidad menor al 5% ($P < 0.05$).

Resultados

La actividad eléctrica espontánea de las aferentes vestibulares se registró en 157 experimentos, empleando preparaciones *in vitro* del sistema vestibular del (*Gallus domesticus*) de las edades embrionarias de 15, 17, 19 y 21 días. Se realizaron series experimentales con los inhibidores de NOS, L-NOARG (n=94) y 7-NI (n=63). Todos estos experimentos se llevaron a cabo con 95 embriones de pollo. Para la sección de RT-PCR se utilizaron 6 embriones de cada edad ya mencionada.

Efecto de L-NOARG sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares

El inhibidor inespecífico de la NOS, L-NOARG se perfundió en el baño de la preparación en un rango de concentraciones de 10^{-7} M a 10^{-4} M en las edades embrionarias de E15, E17, E19 y E21 (n=94). La gráfica dosis-efecto-edad se muestra en la figura 13. Se puede observar un decremento en la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares que es dependiente de la edad del animal y de la concentración empleada, excepto en E15 donde no existen cambios significativos en estos parámetros.

El mayor efecto inhibitorio de L-NOARG se muestra en E19 a una concentración de 10^{-4} M, nótese que no hay cambios significativos en E21 ($33 \pm 5.97\%$ vs. $35.2 \pm 9.26\%$ respectivamente). Este efecto fue reversible con veinte minutos de lavado. A la concentración 10^{-6} M se observa la mayor significancia estadística entre las diferentes edades. El menor efecto se produjo a la concentración de 10^{-7} M, pero sólo en las edades de E17 ($95.75 \pm 7.43\%$) y E19 ($97.75 \pm 5.45\%$).

En la figura 14 se observa que en E15 todas las concentraciones tuvieron efecto reduciendo la frecuencia de descarga basal a 86.35%, lo que lo hace un efecto independiente de la concentración. La edad a la que los efectos de las distintas concentraciones tuvieron una significancia mayor fue en E19, pero es a partir de E17 cuando ya es evidente la respuesta dependiente de la concentración.

La figura 15 muestra registros típicos extracelulares multiunitarios de frecuencia en impulsos por segundo (ips) en función del tiempo (10 minutos). En ellos puede observarse el efecto que tiene una concentración de L-NOARG sobre las distintas edades. Así también se observa que la frecuencia de descarga basal espontánea de las aferentes vestibulares aumenta a medida que el embrión alcanza la edad cercana a la eclosión.

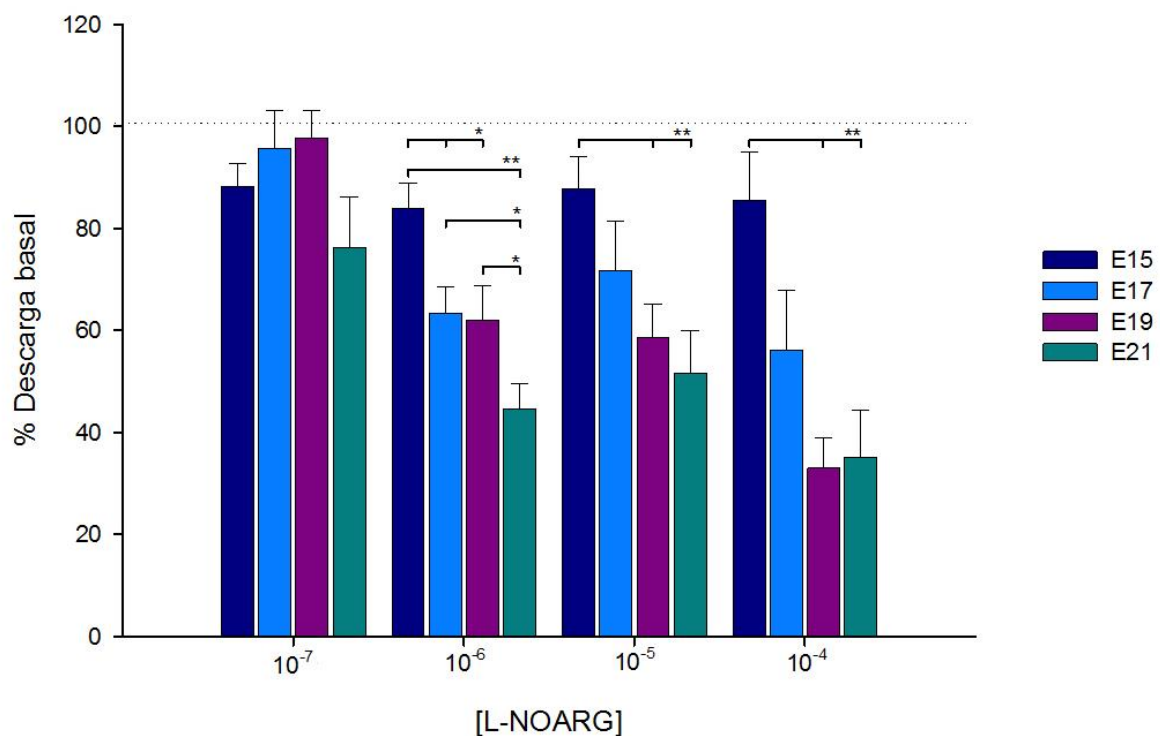


Figura 13. Curva dosis-efecto-edad de L-NOARG en embriones de pollo de E15, E17, E19 y E21 (n=94). Cada barra representa la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 4 experimentos. A partir de E17 se observa un decremento en la frecuencia de descarga basal de las aferente vestibulares que es dependiente de la concentración y la edad, L-NOARG es administrado por perfusión en el baño. La línea punteada indica el 100% de la descarga basal de las aferentes vestibulares. Se indica la significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

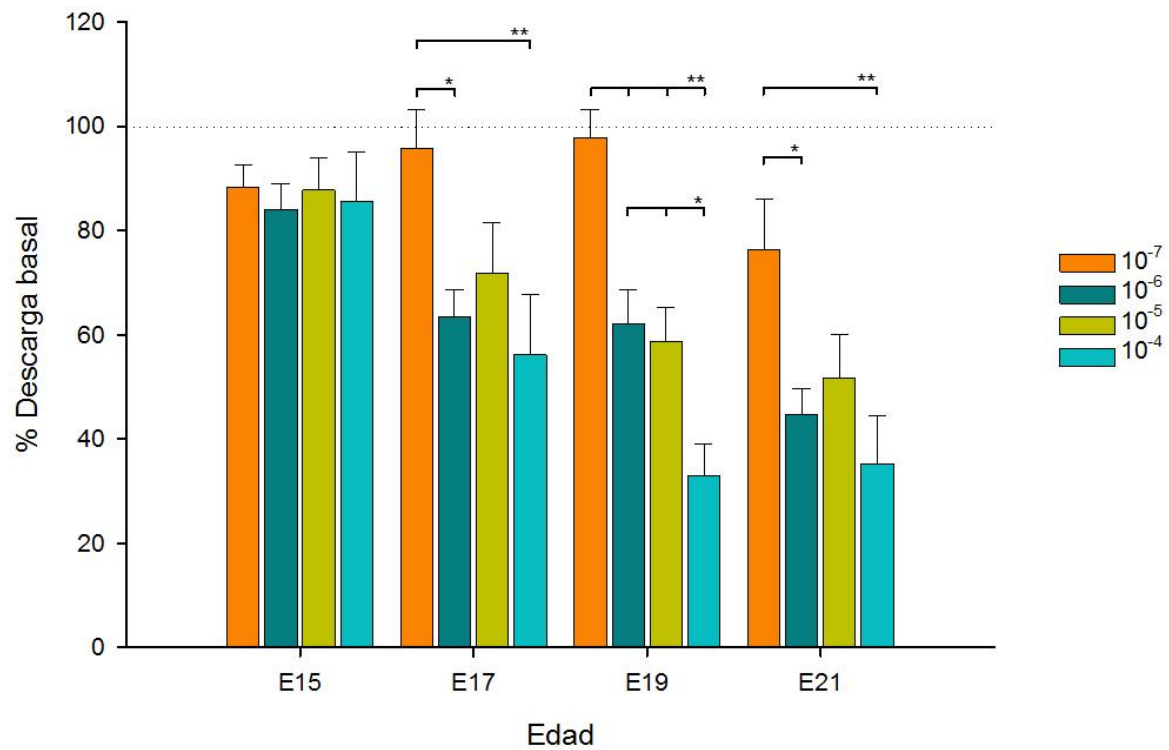


Figura 14. Gráfica del % de descarga en función de la edad, cada barra representa la media \pm SEM de al menos 4 experimentos. Se observan cambios significativos en todas las edades excepto en E15 donde el efecto es independiente de la concentración. La línea punteada indica el 100% de la descarga basal de las aferentes vestibulares. Se indica la significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

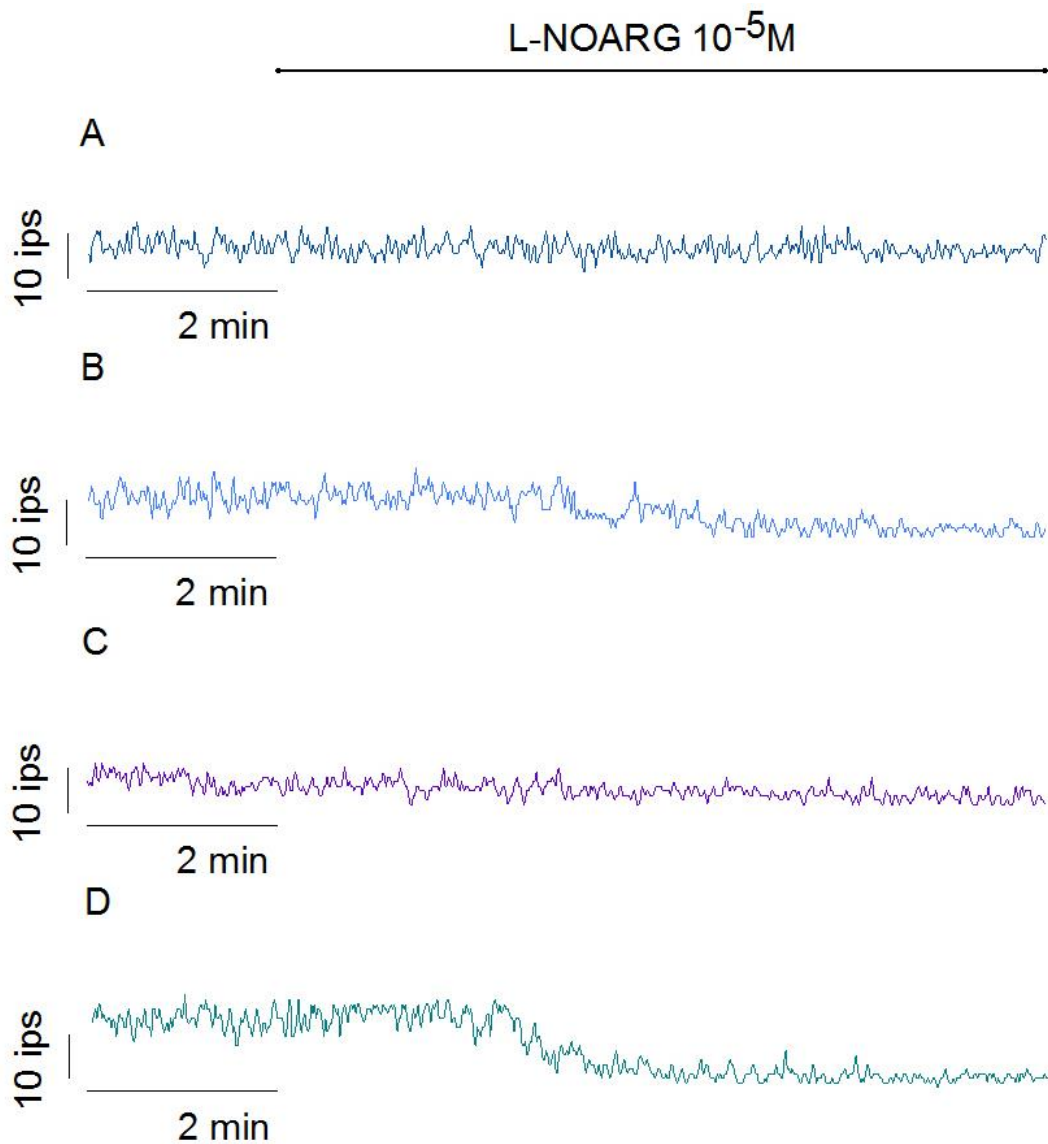


Figura 15. Registros extracelulares multiunitarios en embriones de diferentes edades. A. Respuesta de embrión de 15 días. B. Respuesta de embrión de 17 días. C. Respuesta de embrión de 19 días. D. Respuesta de embrión de 21 días. La duración de cada registro es de 10 minutos y la descarga vestibular se mide en impulsos por segundo (ips). Se tomaron los primeros dos minutos como control, la línea superior indica el tiempo de perfusión en el baño de L-NOARG $10^{-4}M$ (8 minutos).

Efecto de 7-NI sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares

En otra sección experimental, a través de la misma técnica de registro se evaluó el efecto de 7-NI, un inhibidor específico de la NOS tipo I en las mismas edades, en un rango de concentraciones de 10^{-7} M a 10^{-5} M (n=63). La gráfica correspondiente se muestra en la figura 16 donde se observa una disminución en la frecuencia de disparo de las aferentes vestibulares.

A diferencia de L-NOARG, 7-NI mostró poco efecto significativo. El mayor efecto se observó en E21 a la concentración de 10^{-5} M y no hubo cambios importantes al reducir la concentración a 10^{-6} (disminuyó hasta $43 \pm 8.85\%$ y $40.5 \pm 7.3\%$ respectivamente). Sin embargo, los resultados no fueron significativos al compararlos con otras edades. El menor efecto se obtuvo en E19 a la concentración de 10^{-7} M ($81.83 \pm 4.14\%$) (Fig. 16). El efecto fue reversible con veinte minutos de lavado.

Es interesante observar que a las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-6} M, el efecto inhibitorio de 7-NI fue menor en edades tempranas y por el contrario se vio acentuado en edades como E21. Algo similar se encontró en la curva dosis-respuesta de L-NOARG.

En E15, y al igual que con L-NOARG, la respuesta es independiente de la dosis, esto se muestra en la figura 17 donde también se puede ver que en E19 la respuesta a las tres diferentes concentraciones es significativa.

La figura 18 es un ejemplo de un registro extracelular multiunitario típico en el que se ilustra el mayor efecto de 7-NI.

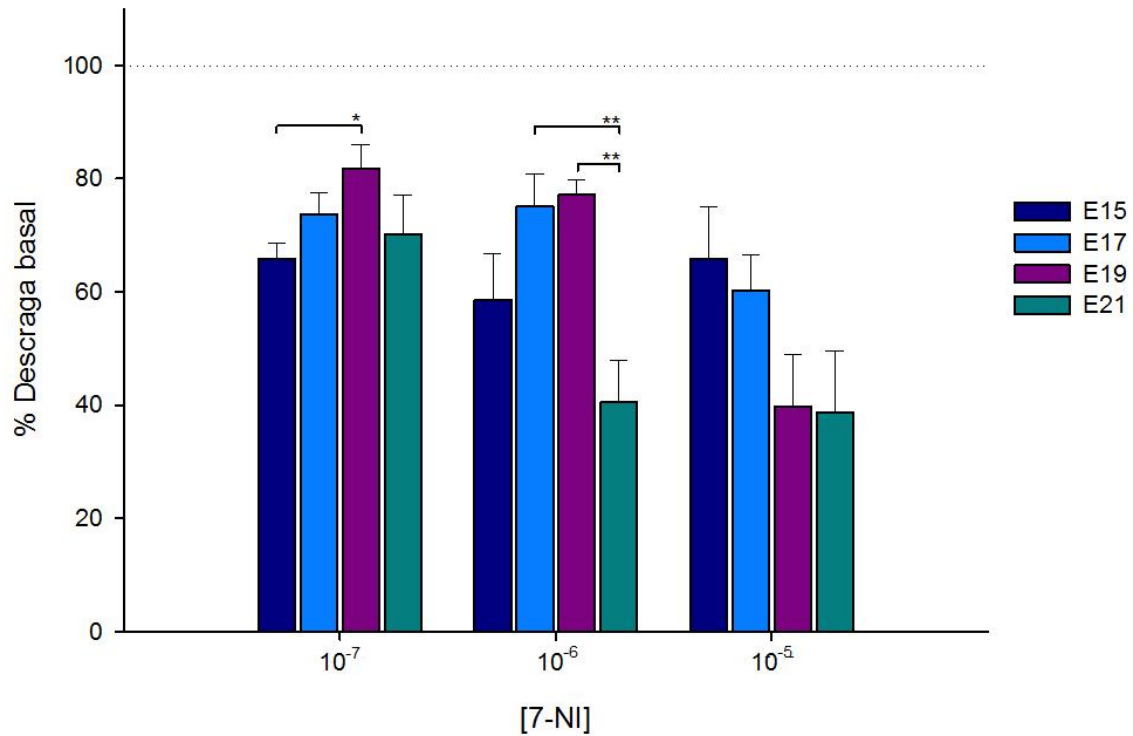


Figura 16. Curva dosis-efecto-edad de 7-NI en embriones de pollo de E15, E17, E19 y E21 (n=63). Cada barra representa la media \pm Error Estándar de la Media (SEM) de al menos 4 experimentos. El mayor efecto se observa en E21 a la concentración 10^{-5} M. La línea punteada indica el 100% de la descarga basal de las aferentes vestibulares. Se indica la significancia estadística (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

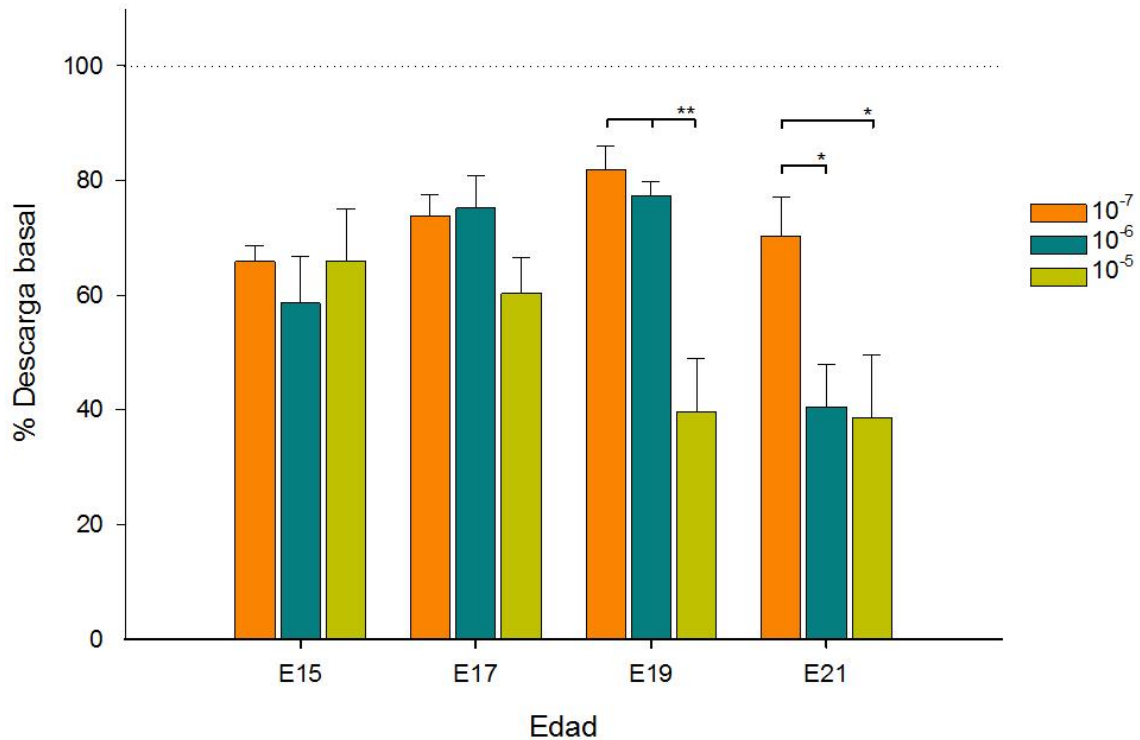


Figura 17. Gráfica del % de descarga en función de la edad, cada barra representa la media \pm SEM de al menos 4 experimentos. Únicamente se observan diferencias significativas en E19 y E21 donde se alcanzaron los mayores efectos. La línea punteada indica el 100% de la descarga basal de las aferentes vestibulares. Se indica la significancia estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

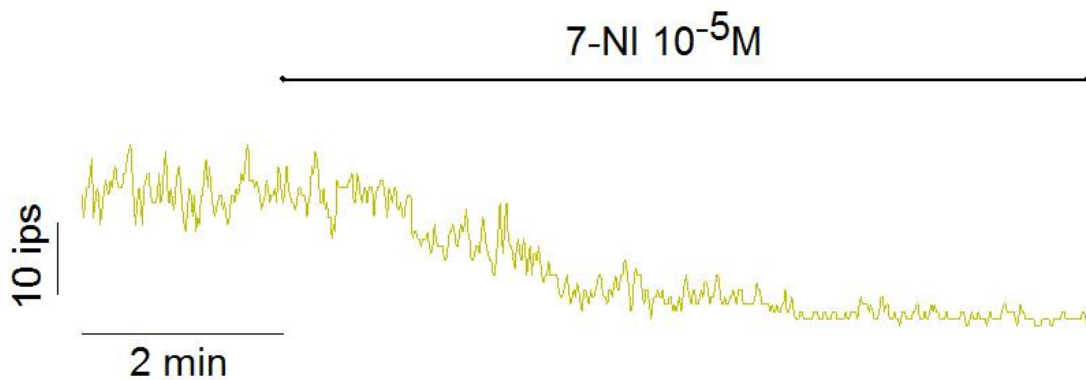


Figura 18. Registro extracelular multiunitario correspondiente a un embrión de 21 días donde se observa el mayor efecto de 7-NI $10^{-5}M$. La duración total del registro es de 10 minutos. Se toman los primeros dos minutos como control, y la línea superior indica el tiempo de perfusión en el baño de 7-NI (8 minutos).

Ensayo de expresión génica

Como se planteó en el objetivo 2, para corroborar los resultados de electrofisiología, se realizó el ensayo de expresión génica para evaluar parcialmente el nivel de expresión del ARNm que codifica para las tres isoformas de NOS (NOSI, NOSII y NOSIII) en las crestas y ganglios vestibulares del embrión de pollo para distintas edades (E15, E17, E19, E21). Se emplearon un total de 36 crestas y 12 ganglios por cada edad, lo que significa que se usaron 24 embriones en total para esta sección experimental realizada en el laboratorio de Neuroendocrinología a cargo del Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán.

Mediante el empleo de esta técnica, encontramos la presencia del ARNm que codifica para las tres isoformas de NOS, tanto en crestas como en ganglios vestibulares (Figura 19). Al realizar el análisis densitométrico se encontraron diferencias en cuanto al nivel de expresión de cada isoforma para las diferentes edades, sin embargo, el número de ensayos es insuficiente para hacer un análisis estadístico significativo.

Obsérvese en la figura 20A que existe un aumento de la expresión de NOSI en E17 y que hacia E19 disminuye y se mantiene sin cambios aparentes en E21. Por otro lado, para NOSII el pico de expresión también se presenta en E17 sin embargo parece disminuir conforme el animal se acerca a la eclosión (Figura 20B). Para NOSIII la mayor expresión se presenta en E15 y se observa una disminución equivalente en las edades posteriores (Figura 20C).

Respecto a la expresión en ganglios vestibulares de NOSI, también se observa un pico máximo en E17 con disminución gradual hacia edades cercanas a la eclosión. Para NOSII la expresión máxima se observa en E19 con un decremento mayor en E21. La expresión de NOSIII presenta menos cambios pero se observa una mayor expresión en E19 que disminuye más en E21 con respecto a edades inferiores (Figura 21A-C).

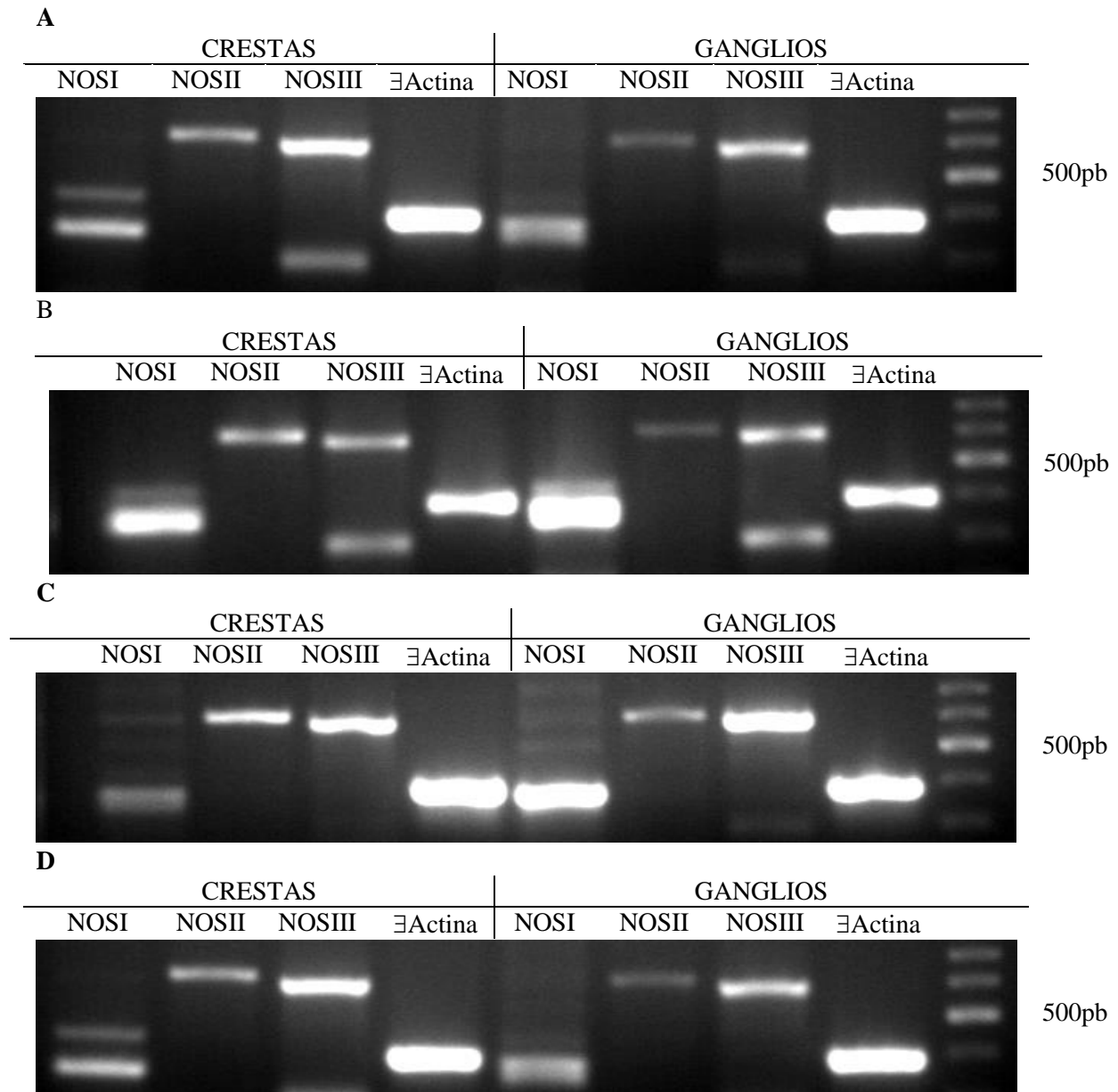


Figura 19. Expresión del ARNm que codifica para las tres isoformas de NOS (NOSI: 376pb, NOSII: 625pb y NOSIII: 592) en cresta y ganglio vestibular en A. E15 B. E17 C. E19 y D. E21. En todos los experimentos se utilizó B-Actina como control. Este ensayo parece indicar la expresión diferencial entre edades.

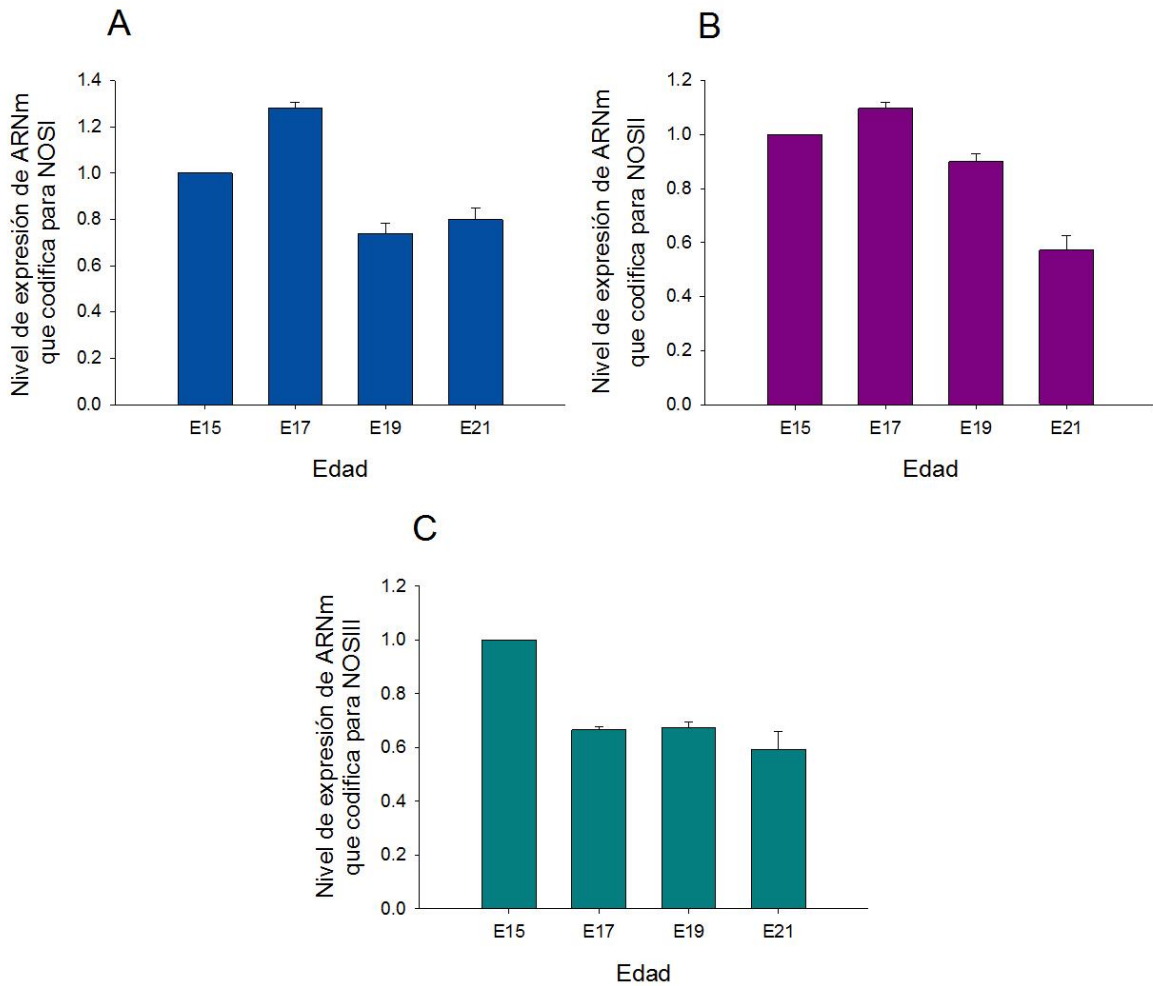


Figura 20. Gráficas de los niveles de expresión del ARNm que codifica para las tres isoformas de NOS en crestas vestibulares. A. Expresión de NOSI. B. Expresión de NOSII. C. Expresión de NOSIII. Nótese que existe una notable expresión diferencial entre las edades estudiadas. En todas las gráficas se normalizó con respecto a E15.

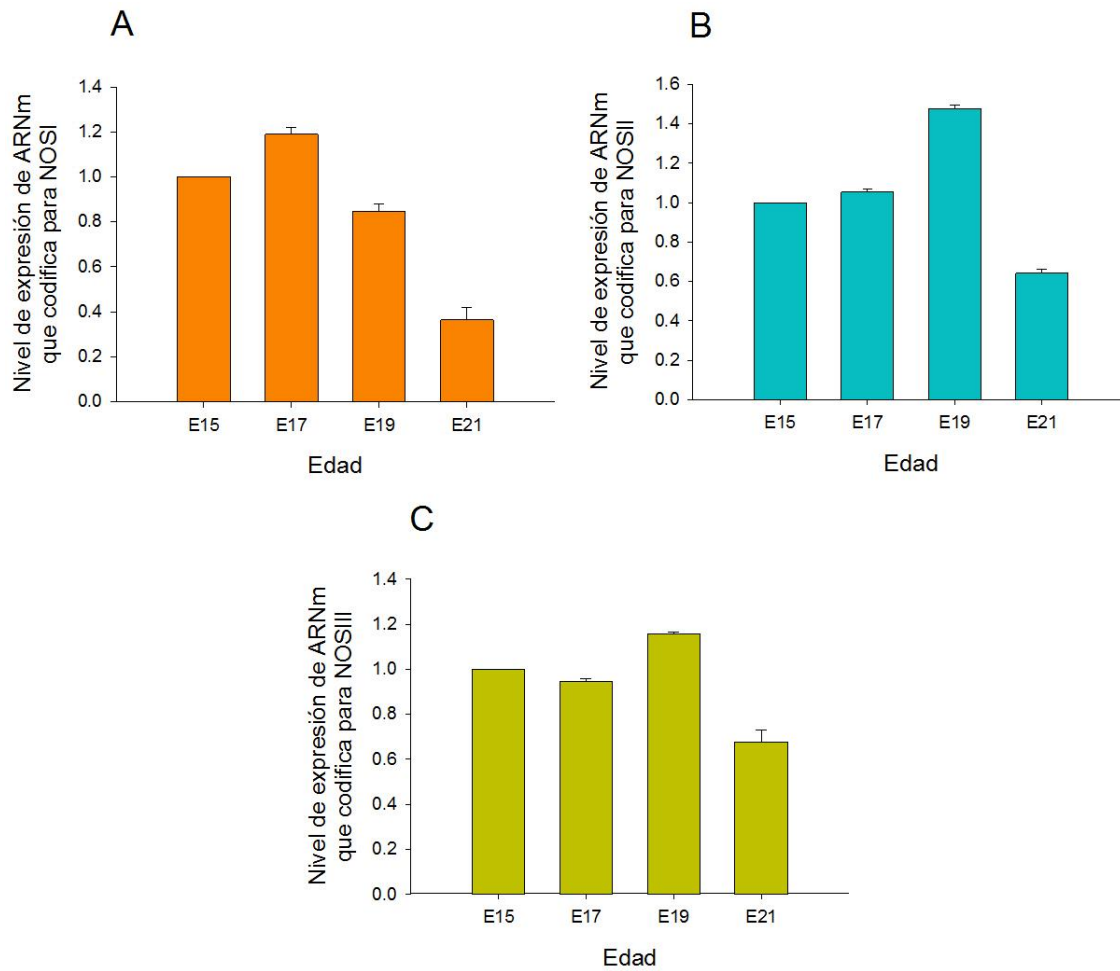


Figura 21. Gráficas de los niveles de expresión del ARNm que codifica para las tres isoformas de NOS en ganglios vestibulares. A. Expresión de NOSI. B. Expresión de NOSII. C. Expresión de NOSIII. Existe una expresión diferencial entre las edades estudiadas. En todas las gráficas se normalizó con respecto a E15.

Discusión

Existe evidencia clara de la presencia en condiciones fisiológicas de las isoformas de la NOSI y III y de la NOSII en presencia de lipopolisacárido bacteriano en el vestíbulo (Takumida & Anniko, 2004; Hess et al, 1998; Hussain & Qureshi, 1997), así como también se reporta la presencia directa de NO en las células ciliadas de cobayos adultos (Takumida et al, 2000).

Hess et al 1998, determinan mediante el uso de anticuerpos contra las NOS constitutivas la presencia de éstas en el sistema vestibular de cobayos adultos, específicamente en el epitelio sensorial de las crestas ampulares, endostio, células ganglionares y terminales nerviosas la cual se asocia a la existencia de la GC; su función, todavía desconocida, se cree que puede ser la regulación de la concentración de Ca^{++} intracelular y la excitabilidad celular. Por otro lado, Arnhold et al en 1997 determina la presencia transitoria de la NOSII en células olfatorias embrionarias de ratón.

Aunque hay reportes que durante el desarrollo temprano el NO tiene un papel importante en el sistema nervioso central pues participa en procesos de proliferación celular, migración, crecimiento axonal y sinaptogénesis (Bicker, 2005) los reportes en el sistema vestibular son escasos (León et al, 2004; Arnhold et al, 1999).

L-NOARG es un inhibidor inespecífico de la NOS que se une al sitio de unión del sustrato L-arginina, muestra preferencia por NOSIII y NOSI antes que por NOSII. Mientras que 7-NI es un inhibidor altamente específico de NOSI, que se piensa se une al grupo hemo de NOSI de manera reversible (Southan & Szabó, 1996). Mediante el uso de estos fármacos pudimos analizar el papel modulador del NO sobre las aferentes vestibulares durante el desarrollo embrionario del pollo, encontrando un posible rol de la activación de NOS en el aumento de la descarga basal.

Hay estudios que demuestran que la inhibición de la NOS causa hipertrofia del órgano en desarrollo en un modelo de *Drosophila* (Kuzin et al, 1996), desorganización de las estructuras cerebrales (Peunova et al, 2001) y una tasa de proliferación más alta con una disminución de la diferenciación neuronal en vertebrados (Cheng et al, 2003) dando al NO

un papel antiproliferativo causado por un aumento de concentración en respuesta a factores de crecimiento, produciendo así un efecto a nivel de la síntesis de ADN en el ciclo celular o a través de segundos mensajeros que actúan en la reorganización de los elementos del citoesqueleto. Asimismo se ha encontrado que ciertas proyecciones anómalas transitorias tienen un aumento gradual en la producción de NO la cual lleva a la disminución y detención de la motilidad celular con el consecuente colapso de las extensiones parcialmente formadas. Estos efectos dependen de la localización de las NOS (soma o proyecciones) y de la etapa del desarrollo en que se encuentre el organismo (Bicker, 2005). El NO, al igual que en la potenciación a largo plazo puede desempeñar el papel de mensajero retrógrado y participar en la maduración de las conexiones sinápticas (Karina et al, 1995).

Se sabe que la concentración de GMPc en conjunto con algunas señales neuronales determina ciertas respuestas de crecimiento y direccionalidad de las neuritas, ya que se ha observado el detenimiento de la migración celular con inhibidores de la vía de señalización NO/GMPc/PKG y la posterior expansión del cuerpo celular (Bicker, 2005); por ejemplo, existe una protein cinasa 1 isoforma alfa (PK1 \forall) dependiente de GMPc que se expresa en axones sensoriales de ratón durante el desarrollo, esta variante participa en el crecimiento de los conos axónicos pues al activarla mediante 8-Br-GMPc contrarresta el colapso de las proyecciones inducido por semaforina 3A (Schmidt et al 2002).

Williams et al en 1994 demuestran la presencia de la NOS en el sistema retinotectal de gallo en desarrollo; en los colículos inferiores a partir de E5 hasta E15 coincidiendo con el periodo de inervación retiniana y la etapa de refinamiento de las conexiones, donde el GMPc puede estar involucrado en los cambios de extensión y en la retracción axonal. De E16 a E21 se produce un decremento gradual de la expresión de la NOS en esta vía. Al respecto, se propone que el refinamiento sináptico en ave y ratón es dependiente de la activación de canales tipo NMDA en las neuronas postsinápticas, pues cuando se bloquea, las proyecciones transitorias anómalas persisten y disminuye la actividad de la NOS (Wu et al, 1994; Ernst, 1999; Brüning, 1993). Este mecanismo se propuso también para explicar el refinamiento durante el desarrollo postnatal temprano de hurón, donde las proyecciones

hacia el núcleo geniculado lateral presentan NOS principalmente en la cuarta semana postnatal (Karina et al, 1995).

Sin embargo, el presente estudio fue realizado durante el final de la sinaptogénesis temprana en E15 y durante la tardía de E16-E17 (Whitehead & Morest), donde el NO tiene un papel modulador de la descarga basal ya existente en nuestro sistema. No hay información suficiente en la literatura sobre la función del NO en el sistema vestibular durante estas etapas del desarrollo, de ahí la importancia de la realización de este trabajo.

Como pudimos corroborar mediante técnicas electrofisiológicas la inhibición de NOS modula la actividad basal de las aferentes vestibulares de manera negativa, además, esta modulación se hace más evidente en edades que se acercan a la eclosión. Podemos sugerir que la actividad de la NOS aumenta conforme el sistema alcanza la madurez.

Estudios previos en nuestro laboratorio demuestran que el efecto inhibitorio de la descarga basal provocado por NO es mediado a través de la vía de señalización NO/GCs/GMPc, esto en etapas embrionarias del desarrollo (Gómez Rivera, 2004). De Vente et al en 1998 identifican la distribución de NOS asociada con GCs en distintas áreas del cerebro y poblaciones celulares de rata adulta en presencia de la proteína de anclaje PD95, también vinculada al receptor tipo NMDA. Esto nos lleva a sugerir que esta vía explica el mecanismo de acción de NO en el sistema vestibular en desarrollo, pues existe una clara participación de sinapsis glutamatérgicas entre las células ciliadas y las aferentes vestibulares en la producción de NO (Fedele & Raiteri, 1996). Nuestros resultados muestran un mayor efecto de la inhibición en edades más tardías, lo que se puede explicar por una modificación en la funcionalidad de los receptores tipo NMDA conforme avanza el desarrollo, pues se ha visto que existen cambios en la expresión de sus subunidades, principalmente NR1 (Lee-Rivera et al, 2003).

Se ha propuesto también que la síntesis de NO podría ser mediada a través de receptores tipo no-NMDA, como lo demuestran Marin et al en 1993 al inducir la producción de NO mediante agonistas de los receptores tipo AMPA y kainato en embriones de ratón de 14-15 días, posteriormente, en 1996 se determina en cerebelo de rata adulta que los receptores

tipo AMPA y NMDA trabajan mediante un sistema en serie el cual involucra primeramente la activación del receptor tipo AMPA y posteriormente al tipo NMDA promoviendo la vía de síntesis de NO/GMPc (Fedele & Raiteri, 1996). Hay evidencia que concuerda con la presencia de receptores tipo AMPA en el oído interno durante el desarrollo postnatal de ratas (Knipper et al, 1996), por lo que no podemos descartar su participación en la modulación mediada por NO.

De acuerdo con nuestros resultados no podemos explicar por completo la respuesta al inhibidor inespecífico de NOS, L-NOARG por la presencia única de la isoforma NOS1, pues no existe una relación directa con el efecto observado para 7-NI, lo que nos lleva a no descartar la presencia de otras NOS, lo que sería interesante abordar en un futuro.

Como se concluye en algunos trabajos (Behrend et al en 1997; Flores et al, 2001), en el adulto el NO tiene un efecto excitador y puede aumentar la frecuencia de descarga, esta propiedad parece adquirirse durante el desarrollo embrionario temprano y madurar a largo de la sinaptogénesis tardía con una respuesta específica a distintas concentraciones.

Resulta interesante que en la sección experimental con la técnica de RT-PCR pudimos corroborar la presencia del ARNm de las tres isoformas de NOS, no obstante, estos resultados todavía no son irrefutables. A partir de esta evidencia parcial podemos apoyar la idea de que la transcripción de NOS está siendo regulada a lo largo del desarrollo, pero estos mecanismos son numerosos y tienen importancia al evaluar el efecto de NO en la descarga basal aferente vestibular. Las tres isoformas de NOS pueden estar participando en la modulación de la descarga basal aferente vestibular mediante variados mecanismos que podrían converger para lograr el efecto excitador de NO. Es importante mencionar que en nuestros resultados se observa un pico de expresión en el desarrollo que disminuye conforme el embrión se acerca a la eclosión tanto en crestas como en ganglios vestibulares, por lo que sería conveniente evaluar la expresión de NOS en etapas postnatales y corroborar si los niveles de expresión del ARNm se mantienen.

Está bien establecido que la expresión de NOS es de dos tipos, y a ello se debe la clasificación en NOS constitutivas e inducible; pero debido a que las variantes de esta enzima se localizan en muchos tipos celulares ejerciendo funciones diversas es necesario

que existan distintos sistemas reguladores que aseguren la función óptima y específica de estas enzimas.

La NOSI es regulada principalmente a nivel post-transcripcional mediante el proceso de splicing alternativo. Se han encontrado variantes en el sistema nervioso de ratón; la NOSI-1 es la principal y la NOSI-2 de presencia relativamente escasa (Ogura et al 1993), asimismo se reporta que los transcritos traducidos no tienen capacidad catalítica (Hall et al, 1994). Se encontró también que los niveles altos de estrógenos (no fisiológicos) aumentan la transcripción de NOSI, además que en cerebro de rata existe una regulación positiva de NOS a largo plazo relacionada con el aumento del factor c-jun. Aunque no existe evidencia directa, este tipo de factores también podrían estar participando en la regulación de NOSI en el sistema vestibular (Förstermann et al 1995).

En cuanto a la isoforma III, se sabe que la transcripción es regulada positivamente a corto plazo (2-4 horas) por el \exists -estradiol, el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- \forall) regula negativamente su traducción desestabilizando el ARNm lo que lleva a una disminución de su vida media y rápida tasa de degeneración (Geller y Billiar, 1998; Gao et al, 2007).

La transcripción del gen que codifica para NOSII es regulada positivamente por LPS, además de una combinación de citosinas que incluye al TNF- \forall , interferón gamma (IFN \exists) y a la interleucina 1-beta (IL-1 \exists). Negativamente está regulada por las interleucinas 8, 10 y 4 (IL-8, IL-10, IL-4) en macrófagos y neutrófilos (Förstermann et al 1995).

Existe también la regulación a nivel post-traducciona l de la NOS, esta no ha sido muy estudiada sin embargo se conoce que los niveles de Ca^{++} /Calmodulina modulan la actividad catalítica de NOS, incluso en la forma inducible, pues se ha visto una disminución de hasta el 60% de la actividad en presencia de EGTA, un antagonista de este complejo. Los niveles de H₄B también limitan la actividad de NOS, a su vez, H₄B es sintetizada por la enzima GTP cicloh idrolasa I la cual puede ser modulada por otros factores. Otros mecanismos de regulación son la fosforilación, la localización subcelular y la capacidad de unión a cofactores y L-arginina (Geller y Billiar, 1998; Förstermann et al 1995).

Nuestros resultados concuerdan con la existencia de componentes a lo largo del desarrollo embrionario que regulan la transcripción de los genes que codifican para las tres isoformas de NOS, las cuales parecen ser funcionales durante la sinaptogénesis tardía, sin embargo todavía falta dilucidar bajo qué mecanismos se regula su transcripción y su actividad, y cuál es su rol en el desarrollo óptimo del sistema vestibular.

Conclusiones

- ☞ La NOS participa en la modulación de la descarga basal aferente vestibular durante el desarrollo embrionario del pollo.
- ☞ La aplicación de L-NOARG (inhibidor inespecífico de la NOS), disminuyó la descarga basal de las aferentes vestibulares. Dicha respuesta es dependiente de la edad del embrión, observándose un mayor efecto en edades cercanas a la eclosión.
- ☞ 7-NI (inhibidor específico de la NOSI o neuronal) disminuyó la descarga basal de las aferentes vestibulares de manera importante en edades cercanas a la eclosión.
- ☞ Posiblemente NOSI esté presente en el sistema vestibular de pollo durante el desarrollo y participa en la modulación de la descarga basal aferente, sin embargo, no parece ser la única isoforma participante, por lo que no descartamos que existan o coexistan otras.
- ☞ Mediante técnicas de biología molecular se demuestra parcialmente la presencia del ARNm correspondiente a las tres isoformas de NOS (NOSI, NOSII y NOSIII) en crestas y ganglios vestibulares durante las edades estudiadas y con cambios notables durante el desarrollo.

Referencias

- Ahern, G. P., Klyachko, V. A., & Jackson, M. B. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends in neurosciences*, 25(10), 510-517.
- Almanza, A., Navarrete, F., Vega, R., & Soto, E. (2007). Modulation of voltage-gated Ca²⁺ current in vestibular hair cells by nitric oxide. *Journal of neurophysiology*, 97(2), 1188-1195.
- Anniko, M. T. M. (2000). Glutamate-induced production of nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells. *Acta oto-laryngologica*, 120(4), 466-472.
- Arnhold, S., Andressen, C., Bloch, W., Mai, J. K., & Addicks, K. (1997). NO synthase-II is transiently expressed in embryonic mouse olfactory receptor neurons. *Neuroscience letters*, 229(3), 165-168.
- Arnhold, S., Klinz, F. J., Bloch, W., Hess, A., Andressen, C., & Addicks, K. (1999). Selective expression of the NOS II isoform during mouse vestibulocochlear receptorgeneration. *European Journal of Neuroscience*, 11(6), 2187-2193.
- Baltrons, M. A., & Garcia, A. (1997). AMPA receptors are coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in cerebellar astroglial cells. *European Journal of Neuroscience*, 9(11), 2497-2501.
- Bankowski, Z., & Howard-Jones, N. (1986). International guiding principles for biomedical research involving animals. *Geneva: WHO*.
- Bellairs, R., & Osmond, M. (1998). Atlas of chick development. *Academic Press*. 58-59.
- Bernard, C., & Granell, M. (1994). El método experimental y otras páginas filosóficas. *Colofón*.
- Bicker, G. (2005). STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *Bioessays*, 27(5), 495-505.

- Bissonnette, J. P., & Fekete, D. M. (1996). Standard atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *Journal of Comparative Neurology*, 368(4), 620-630.
- Brüning, G. (1993). NADPH-Diaphorase histochemistry in the postnatal mouse cerebellum suggests specific developmental functions for nitric oxide. *Journal of neuroscience research*, 36(5), 580-587.
- Bryant, J., Goodyear, R. J., & Richardson, G. P. (2002). Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms. *British medical bulletin*, 63(1), 39-57.
- Chen, C. L. (1988). Analysis of variance.
- Chen, J. W., & Eatock, R. A. (2000). Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. *Journal of Neurophysiology*, 84(1), 139-151.
- Cheng, A., Wang, S., Cai, J., Rao, M. S., & Mattson, M. P. (2003). Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Developmental biology*, 258(2), 319-333.
- Contestabile, A. (2000). Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Research Reviews*, 32(2), 476-509.
- Cooper, J. R., & Roth, R. H. (2003). The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press.
- Cortés, C., Galindo, F., Galicia, S., Cebada, J., & Flores, A. (2013). Excitatory actions of GABA in developing chick vestibular afferents: Effects on resting electrical activity. *Synapse*, 67(7), 374-381.
- Cramer, K. S., Moore, C. I., & Sur, M. (1995). Transient expression of NADPH-diaphorase in the lateral geniculate nucleus of the ferret during early postnatal development. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 306-316.

- Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A. M., & Damasio, A. R. (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*, 264(5162), 1102-1105.
- De Berrazueta, J. R. (1999). El Nobel para el óxido nítrico. La injusta exclusión del Dr. Salvador Moncada. *Revista española de cardiología*, 52(4), 221-226.
- De Ciencias, C. D. O. I. (1990). Normas Internacionales para la Investigación Biomédica con animales. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*, 108(5-6), 637-41.
- Di Giovanni, G., Ferraro, G., Sardo, P., Galati, S., Esposito, E., & La Grutta, V. (2003). Nitric oxide modulates striatal neuronal activity via soluble guanylyl cyclase: an in vivo microiontophoretic study in rats. *Synapse*, 48(2), 100-107.
- De la Salud, P. (1987). Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.
- De Vente, J., Hopkins, D. A., Markerink-Van Ittersum, M., Emson, P. C., Schmidt, H. H. W., & Steinbusch, H. W. M. (1998). Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience*, 87(1), 207-241.
- Duque-Parra, J. E. (2004). Los nervios y los núcleos vestibulares en la historia. *Revista de neurología*, 38(10), 984-988.
- East, S. J., & Garthwaite, J. (1991). NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neuroscience letters*, 123(1), 17-19.
- Eatock, R. A., & Hurley, K. M. (2003). Functional development of hair cells. *Current topics in developmental biology*, 57, 389-448.
- Eatock, R. A., & Lysakowski, A. (2006). Mammalian vestibular hair cells. *Vertebrate hair cells* (pp. 348-442). Springer New York.

- Eatock, R. A., & Songer, J. E. (2011). Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annual review of neuroscience*, 34, 501-534.
- Ernst, A. F., Wu, H. H., El-Fakahany, E. E., & McLoon, S. C. (1999). NMDA receptor-mediated refinement of a transient retinotectal projection during development requires nitric oxide. *The Journal of neuroscience*, 19(1), 229-235.
- Esplugues, J. V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *British journal of pharmacology*, 135(5), 1079-1095.
- Fedele, E., & Raiteri, M. (1996). Desensitization of AMPA receptors and AMPA-NMDA receptor interaction: an in vivo cyclic GMP microdialysis study in rat cerebellum. *British journal of pharmacology*, 117(6), 1133-1138.
- Feldman, R. S., Meyer, J. S., Quenzer, L. F., & Cooper, J. R. (1997). Principles of neuropsychopharmacology (pp. 277-344). Sunderland: Sinauer Associates. 215-217.
- Fernández Tresguerres JA. 2010. Fisiología Humana. 4 ed. McGraw Hill. México D.F. Págs. 240-243.
- Flores, A., Soto, E., & Vega, R. (2001). Nitric oxide in the afferent synaptic transmission of the axolotl vestibular system. *Neuroscience*, 103(2), 457-464.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
- Frammer J. 12 Nitric Oxide. (2013). En Bye, L., Modi, N., & Stanford, M. *Basic Sciences for Ophthalmology*. OUP Oxford.
- Frings, S., & Bradley, J. (Eds.). (2006). Transduction channels in sensory cells. John Wiley & Sons.
- Galindo, F., Monjaraz, E., Galicia, S., Cebada, J., Cortés, C., & Flores, A. (2013). Functional expression of P2 receptors in the inner ear of chicken embryo. *Neuroscience letters*, 553, 24-28.

- Gao, X., Xu, X., Belmadani, S., Park, Y., Tang, Z., Feldman, A. M. & Zhang, C. (2007). TNF- α contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(6), 1269-1275.
- Garthwaite, J., Charles, S. L., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336, 385-388.
- Ganong. 2010. Fisiología Médica. 23 ed. McGraw Hill. México D.F. 206, 214-216.
- Geller, D. A., & Billiar, T. R. (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(1), 7-23.
- Gómez Rivera, Gabriela Ollyni. (2004). Papel del óxido nítrico (NO) en la actividad eléctrica espontánea de las neuronas aferentes vestibulares durante el desarrollo embrionario del pollo (*Gallus domesticus*). Tesis de maestría. Laboratorio de Neurobiología. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Guth, P. S., Perin, P., Norris, C. H., & Valli, P. (1998). The vestibular hair cells: post-transductional signal processing. *Progress in neurobiology*, 54(2), 193-247.
- Gutiérrez, G. R., Schunemann, A. A., Ibarra, E. I., & Lomel, F. C. (1994). Declaración mexicana y principios básicos de la experimentación en animales. *Boletín de la Comisión Nacional de Bioética*, 1, 3-4.
- Hall, A. V., Antoniou, H., Wang, Y., Cheung, A. H., Arbus, A. M., Olson, S. L., ... & Marsden, P. A. (1994). Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 33082-33090.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49-92.
- Heinrich, U. R., & Helling, K. (2012). Nitric oxide—A versatile key player in cochlear function and hearing disorders. *Nitric Oxide*, 27(2), 106-116.

- Hess, A., Bloch, W., Arnhold, S., Andressen, C., Stennert, E., Addicks, K., & Michel, O. (1998). Nitric oxide synthase in the vestibulocochlear system of mice. *Brain research*, 813(1), 97-102.
- Hess, A., Bloch, W., Su, J., Stennert, E., Addicks, K., & Michel, O. (1998). Localisation of the nitric oxide (NO)/cGMP-pathway in the vestibular system of guinea pigs. *Neuroscience letters*, 251(3), 185-188.
- Highstein, S. M., Fay, R. R., & Popper, A. N. (2004). The vestibular system (Vol. 24). G. M. Lovett (Ed.). Berlin: Springer.
- Holstein, G. R., Friedrich, V. L., & Martinelli, G. P. (2001). Monoclonal L-Citrulline Immunostaining Reveals Nitric Oxide-Producing Vestibular Neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 942(1), 65-78.
- Hong, S. H., Park, S. K., Cho, Y. S., Lee, H. S., Kim, K. R., Kim, M. G., & Chung, W. H. (2006). Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. *Hearing research*, 211(1), 46-53.
- Hopper, R., Lancaster, B., & Garthwaite, J. (2004). On the regulation of NMDA receptors by nitric oxide. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1675-1682.
- Hussain, I., & Qureshi, M. A. (1997). Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poultry science*, 76(11), 1524-1530.
- Ientile, R., Malecka, B., Picciurro, V., Naso, A., Pedale, S., & Macaione, S. (1996). Nitric oxide synthase in chick embryo retina during development. *FEBS letters*, 379(1), 82-84.
- Inglis, F. M., Furia, F., Zuckerman, K. E., Strittmatter, S. M., & Kalb, R. G. (1998). The role of nitric oxide and NMDA receptors in the development of motor neuron dendrites. *The Journal of neuroscience*, 18(24), 10493-10501.
- Institute of Laboratory Animal Resources (US). Committee on Care, Use of Laboratory Animals, & National Institutes of Health (US). Division of Research Resources. (1985). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies

- Jurado, S., Sánchez-Prieto, J., & Torres, M. (2003). Differential expression of NO-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of cell science*, *116*(15), 3165-3175.
- Karina, S., Cramer, C. I. M., & Mriganka, S. (1995). Transient expression of NADPH-diaphorase in the lateral geniculate nucleus of the ferret during early postnatal development. *The Journal of comparative neurology*, *353*, 306-316.
- Kandel ER, Schwartz JH, et al. 2000. Principles Of Neural Science. 4 ed. McGraw Hill. USA.
- Kiernan JA. Barr. 2000. El Sistema Nervioso Humano. 7 ed. McGraw Hill, Interamericana. México D.F. 362-366.
- Knipper, M., Köpschall, I., Rohbock, K., Köpke, A. K. E., Bonk, I., Zimmermann, U., & Zenner, H. P. (1996). Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear. *Cell and tissue research*, *287*(1), 23-41.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, *298*(Pt 2), 249.
- Kornhuber, H. H. (Ed.). (1974). Vestibular system part 1: basic mechanisms. Springer Science & Business Media. 76-77.
- Kuzin, B., Roberts, I., Peunova, N., & Enikolopov, G. (1996). Nitric oxide regulates cell proliferation during Drosophila development. *Cell*, *87*(4), 639-649.
- Lancaster Jr, J. (Ed.). (1996). Nitric oxide: principles and actions. Academic Press.
- Latarjet, M., & Liard, A. R. (2004). Anatomía humana (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana.
- Lee-Rivera, I., Zarain-Herzberg, A., & López-Colomé, A. M. (2003). Developmental expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1 splice variants in the chick retina. *Journal of neuroscience research*, *73*(3), 369-383.

- León, Y., Sánchez-Galiano, S., & Gorospe, I. (2004). Programmed cell death in the development of the vertebrate inner ear. *Apoptosis*, 9(3), 255-264.
- Lévêque, M., Seidermann, L., Ulmer, E., & Chays, A. (2009). Fisiología vestibular: bases anatómicas, celulares, inmunohistoquímicas y electrofisiológicas. *EMC-Otorrinolaringología*, 38(4), 1-15.
- Li, H., & Poulos, T. L. (2005). Structure–function studies on nitric oxide synthases. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(1), 293-305.
- Lysakowski, A., & Goldberg, J. M. (2004). Morphophysiology of the vestibular periphery. The vestibular system. Springer New York (57-152).
- Lomelí, C. (2002). Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Institute of Laboratory Animal Resources Council, Commission on Life Sciences, National Research Council. Mexico: Academia Nacional de Medicina, 25-55.
- Lowestein, O. (1974). Handbook of Sensory Physiology. *Vol VI/1*. Kornhuber, H. H. New York: Springer. 135–138
- Lugnier, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & therapeutics*, 109(3), 366-398.
- Marin, P., Quignard, J. F., Lafon-Cazal, M., & Bockaert, J. (1993). Non-classical glutamate receptors, blocked by both NMDA and non-NMDA antagonists, stimulate nitric oxide production in neurons. *Neuropharmacology*, 32(1), 29-36.
- Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 268(17), 12231.
- Meffert, M. K., Calakos, N. C., Scheller, R. H., & Schulman, H. (1996). Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions. *Neuron*, 16(6), 1229-1236.
- Meffert, M. K., Premack, B. A., & Schulman, H. (1994). Nitric oxide stimulates Ca²⁺-independent synaptic vesicle release. *Neuron*, 12(6), 1235-1244.

- Moncada, S., & Higgs, E. A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European journal of clinical investigation*, 21(4), 361-374.
- Murad, F. (2006). Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *New England Journal of Medicine*, 355(19), 2003-2011.
- Nott, A., & Riccio, A. (2009). Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons. *Cell Cycle*, 8(5), 725-730.
- Ogura, T., Yokoyama, T., Fujisawa, H., Kurashima, Y., & Esumi, H. (1993). Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*, 193(3), 1014-1022.
- Oh, S., & McCaslin, P. P. (1996). Kainate produces concentration-dependent elevation of glutamate release but not cGMP levels in cultured neuron. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(1), 83-87.
- Parker, D. E. (1980). The vestibular apparatus. *Scientific American*, 243(5), 118-135.
- Parkinson, S. J., Jovanovic, A., Jovanovic, S., Wagner, F., Terzic, A., & Waldman, S. A. (1999). Regulation of nitric oxide-responsive recombinant soluble guanylyl cyclase by calcium. *Biochemistry*, 38(20), 6441-6448.
- Peunova, N., Scheinker, V., Cline, H., & Enikolopov, G. (2001). Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. *The Journal of Neuroscience*, 21(22), 8809-8818.
- Peusner, K. D., & Giaume, C. (1997). Ontogeny of electrophysiological properties and dendritic pattern in second-order chick vestibular neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 384(4), 621-633
- Ping, Lv., Rodriguez-Contreras, A., Kim, H. J., Zhu, J., Wei, D., Choong-Ryoul, S., & Yamoah, E. N. (2010). Release and elementary mechanisms of nitric oxide in hair cells. *Journal of neurophysiology*, 103(5), 2494-2505.

- Prast, H., & Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in neurobiology*, 64(1), 51-68.
- Ramírez Ramírez Ana María. (2014). Caracterización de los receptores NMDA en el sistema vestibular del pollo durante el desarrollo embrionario. Tesis de maestría. Laboratorio de Neurobiología. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rodrigo, J. (2009, Julio). El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad. *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 23, No. 2, pp. 195-235).
- Schmidt, H., Werner, M., Heppenstall, P. A., Henning, M., Moré, M. I., Kühbandner, S., & Rathjen, F. G. (2002). cGMP-mediated signaling via cGKI α is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *The Journal of cell biology*, 159(3), 489-498.
- Schuppe, H., & Newland, P. L. (2004). Nitric oxide modulates presynaptic afferent depolarization of mechanosensory neurons. *Journal of neurobiology*, 59(3), 331-342.
- Soto, E., & Vega, R. (1987). A Turbo Pascal program for on line spike data acquisition and analysis using a standard serial port. *Journal of neuroscience methods*, 19(1), 61-68.
- Southan, G. J., & Szabó, C. (1996). Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochemical pharmacology*, 51(4), 383-394.
- Streeter, G. L. (1907). On the development of the membranous Labyrinth and the acoustic and facial nerves in the human embryo. 1^{BT}. *The american Journal of Anatomy*, 139.
- Takumida, M., Anniko, M., Popa, R., & Zhang, D. M. (2000). Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti. *Hearing research*, 140(1), 91-98.

- Takumida, M., & Anniko, M. (2004). Functional significance of nitric oxide in the inner ear. *In Vivo*, 18(3), 345-350.
- Torres, M., & Giráldez, F. (1998). The development of the vertebrate inner ear. *Mechanisms of development*, 71(1), 5-21.
- Viant, D., Fonseca, C., Rodríguez, R., & Anglada, P. (1998). Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan*, 2(3), 45-53.
- Vincent, S. R. (1996). Nitric oxide and synaptic plasticity: NO news from the cerebellum. *Behavioral and Brain Sciences*, 19(03), 362-367.
- Welsch, U. (2008). Welsch Sobotta: Histología.
- Whitehead, M. C., & Morest, D. K. (1985). The growth of cochlear fibers and the formation of their synaptic endings in the avian inner ear: a study with the electron microscope. *Neuroscience*, 14(1), 277-300.
- Williams, C. V., Nordquist, D., & McLoon, S. C. (1994). Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *The Journal of neuroscience*, 14(3), 1746-1755.
- Wong-Riles Margaret TT. (2001). Secretos de las Neurociencias. McGraw Hill, Interamericana. México D.F. 125-152.
- Wu, D. K., & Oh, S. H. (1996). Sensory organ generation in the chick inner ear. *The Journal of neuroscience*, 16(20), 6454-6462.
- Wu, H. H., Selski, D. J., El-Fakahany, E. E., & McLoon, S. C. (2001). The role of nitric oxide in development of topographic precision in the retinotectal projection of chick. *The Journal of Neuroscience*, 21(12), 4318-4325.
- Wu, H. H., Williams, C. V., & McLoon, S. C. (1994). Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science*, 265(5178), 1593-1596.

- Yildirim, F. B., & Sarikcioglu, L. (2007). Marie Jean Pierre Flourens (1794–1867): an extraordinary scientist of his time. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(8), 852.
- Zenner HP, Gummer AW. (1996). 34. The Vestibular System. *Comprehensive Human Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, 697-709.
- Zhou, L., & Zhu, D. Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20(4), 223-230.