Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurobiología

Participación de los receptores $GABA_B$ en la descarga basal aferente vestibular del pollo durante el desarrollo embrionario.

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Fisiológicas

Presenta
Biol. Diana Ibarra Medel

Directora de Tesis
Dra. Amira Flores Urbina

Codirector de Tesis
Dr. Celso Cortes Romero

Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurobiología

Participación de los receptores $GABA_B$ en la descarga basal aferente vestibular del pollo durante el desarrollo embrionario.

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Fisiológicas

Presenta
Biol. Diana Ibarra Medel

Directora de Tesis
Dra. Amira Flores Urbina

Codirector de Tesis
Dr. Celso Cortes Romero

Comité Revisor
Dra. María del Rosario Vega y Saenz de Miera
Dr. Gonzalo Flores Alvarez
Dr. Julián Torres Jácome

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado mediante la beca con número de registro 511798 para realizar estudios de Maestría en el Instituto de Fisiología de la BUAP, así como también a la VIEP-BUAP por la beca tesis que me otorgó para finalizar este proyecto.

Agradecimientos.

"Somewhere, something incredible is waiting to be known"
-Carl Sagan

No tengo suficientes palabras para agradecer a todos los que han contribuido con el desarrollo de este proyecto. Estas páginas no pueden resumir el trabajo, sacrificio y esfuerzo constante, no solo mío, si no de aquellos que se han ido y los que permanecen.

A mi familia, quienes siempre me han apoyado sin importar la decisión. Quienes me han aconsejado, animado. Mis padres, que han confiado en mí desde que tome la decisión de dedicarme a la ciencia. Ellos que siempre han estado, aunque estén lejos y casi no los vea. A mis hermanos, modelos a seguir, consejeros e incluso maestros.

A todo el equipo de trabajo, que se ha consolidado como amigos. A la Dra. Amira Flores, un ser humano excepcional y modelo a seguir en todos los sentidos, quien me brindó su apoyo incondicional, así como sus consejos. A todos mis compañeros de laboratorio, Beatriz, Ana, Ricardo, Fabián, Celso, Coral, Adriana, Guillermo, Rosario y Francisco por aguantarme durante todo este tiempo. Por compartir conmigo parte de su vida, por sus anécdotas y confianza. Al Dr. Monjaraz y a todos los integrantes del laboratorio de neuroendocrinología por permitirme formar parte de su equipo aunque fuera por poco tiempo. A la planta de investigadores, profesores y al comité revisor por sus aportaciones, sugerencias y enseñanzas.

A mis compañeros y amigos de la maestría en ciencias fisiológicas, ya que sin duda alguna ustedes hicieron más ameno y divertido esta etapa de estrés y logros. Porque no solo fuimos estudiantes de ciencias, fuimos personas con los mismos sueños, preocupaciones y dudas. Porque somos y seremos siempre amigos.
A todos aquellos que me han dado palabras de ánimo.

Índice

Lista de Abreviaturas **1**

Resumen **3**

Introducción **5**

Generalidades del Sistema Vestibular 5
Canales semicirculares 6
Órganos otolíticos 7
Células ciliadas 8
Proceso de mecanotransducción 9
Eferentes vestibulares y neurotransmisión 13
Aferentes vestibulares y neurotransmisión 15
Desarrollo del sistema vestibular. 18
Receptores a GABA 21
Acción de GABA en el neurodesarrollo 30
Antecedentes de la presencia de GABA en el sistema vestibular 35

Justificación **37**

Hipótesis: **38**

Objetivo general: **38**

Objetivos particulares **38**

Materiales y Métodos **39**

Modelo experimental 39
Solución Ringer para ave 39
Disección 39
Registro extracelular multiunitario 40
Ensayo de expresión génica 40
Análisis estadístico 43

Resultados **44**

Efecto de ***Baclofén*** sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares: 44

Efecto de ***saclofén*** sobre la acción de baclofén en la descarga basal de las aferentes vestibulares..... 47

Efecto de antagonistas glutamatérgicos de receptores NMDA (MK-801) y no-NMDA (CNQX, MCPG) sobre la acción de baclofén..... 50

Expresión de ARNm que codifica para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ del receptor metabotrópico a GABA. 52

Discusión.....55

Conclusiones:.....67

REFERENCIAS:.....68

Lista de Abreviaturas

5HT3 serotonina

7Clkyn 7-cloro-kynurénico

9-AC ácido carboxílico 9-antraceno

AC adenilato ciclasa

ACh Acetilcolina

ADNc ácido desoxirribonucleico complementario

AIDA 1-Amino-2,3-dihydro-1H-indene-1,5-dicarboxylic acid, 1-Aminoindan-1, 5-dicarboxylic acid

AMPA ácido-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropionato

AMPc Adenosín monofosfato cíclico

ATP Adenosín trifosfato

CNQX 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

DAG diacil glicerol

GABA ácido gamma-aminobutirico

$GABA_AR$ receptor GABA TIPO A

$GABA_BR$ receptor GABA TIPO B

$GABA_{B1}$ subunidad B1 del receptor $GABA_B$

$GABA_{B2}$ subunidad B2 del receptor $GABA_B$

$GABA_{B1a}$ isoforma 1a de la subunidad B1 del receptor $GABA_B$

$GABA_{B1b}$ isoforma 1b de la subunidad B1 del receptor $GABA_B$

GABA-T GABA transaminasa

GAD Glutamato descarboxilasa

GAT Transportadores de GABA

Glu Glutamato

GPCR Receptores acoplados a proteínas G

IP3 inositol 1-4-5 tri fosfato

IPSPs Potenciales postsinápticos inhibitorios

EPSPs Potenciales postinápticos excitatorios

KCC2 co-transportador cloro-potasio

LTP Potenciación a largo plazo

MCPG a-metil-4-carboxilfenilglicina

MPPG α-Methyl-4-phosphonophenylglycine

mGluR receptores metabotrópicos a glutamato

MK 801 5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyclohepten-5,10-imine maleate

nAChR Receptor nicotínico de acetilcolina

NKCC1 Co-transportador 1K 2Cl

NMDA N-Metil-D-Aspartato

PKC Proteína cinasa C

PKA Proteína cinasa A

PLC Fosfolipasa C

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

SNC **S**istema Nervioso Central

VFTD Venus fly trap domain. Dominio venus atrapa moscas

Resumen

Hay evidencias que contribuyen a explicar el mecanismo por el cual GABA actúa como un neurotransmisor excitador durante el desarrollo embrionario, a pesar de ser el principal neurotransmisor inhibidor en etapas adultas. La mayoría de estos mecanismos han otorgado al receptor ionotrópico $GABA_A$ un papel primordial en periodos críticos de consolidación sináptica. Sin embargo, estudios recientes destacan el emergente rol del receptor $GABA_B$ como precursor de acciones tróficas durante el desarrollo. Nuestro estudio está enfocado a dilucidar la sinapsis aferente vestibular durante el desarrollo embrionario del pollo. Este peculiar sistema sensorial se caracteriza por poseer elementos claves para la transmisión sináptica que no se encuentran en otras regiones del sistema nervioso central. La sinapsis aferente vestibular es de tipo excitadora, siendo el principal candidato el glutamato como neurotransmisor para este tipo de sinapsis. No obstante se ha propuesto a GABA como un neurotransmisor con actividad neuromoduladora que participa en la sinapsis aferente vestibular mediante la facilitación de la descarga basal y liberación de glutamato, este mecanismo de facilitación por parte de GABA se podría explicar mediante la activación del receptor $GABA_A$ sin descartar al receptor $GABA_B$. En este estudio empleamos embriones de pollo de E15, E17, E19 y E21. En las cuales se siguieron distintos protocolos farmacológicos, empleando la técnica de registro extracelular multiunitario, por la cual se analizó el efecto de agonistas y antagonistas sobre la actividad eléctrica espontánea del nervio del ámpula posterior. El principal fármaco utilizado fue baclofén, (10^{-6} a 10^{-3}M) un agonista para los receptores $GABA_B$. Encontramos que el efecto de este agonista sobre la descarga basal es dependiente de la edad y concentración, obteniendo la mayor respuesta en E21 (n=105) Lo que sugiere una respuesta funcional de los receptores $GABA_B$ en etapas tardías en desarrollo y no en etapas tempranas (E15) como lo es el receptor $GABA_A$ demostrado en estudios previos. En otra sección experimental, saclofén, un antagonista del receptor $GABA_B$, en concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6}M fue capaz de disminuir significativamente la respuesta de las aferentes vestibulares a baclofén 10^{-4}M y 10^{-3}M sobre la descarga basal en E17, E19, E21 (n=83).

Debido a que nuestros datos muestran un efecto contrario a la habitual respuesta inhibidora por parte de la activación de los receptores $GABA_B$, decidimos optar por otra sección experimental en la cual empleamos antagonistas glutamatérgicos de los diferentes receptores tipo NMDA y no NMDA y tales como, MK 801, CNQX y MCPG, todos a una concentración 10^{-5}M, perfundidos en el baño de la preparación con la co-aplicación por microperfusión de baclofén 10^{-4}M. Los experimentos se realizaron en la edad E21 (n=15). La respuesta de las aferentes vestibulares ante este protocolo farmacológico fue una disminución significativa en el efecto excitador de baclofén (458 ± 25% vs 190 ± 33 %). Con los resultados obtenidos en la sección experimental anterior se podría explicar una posible co-activación o interacción entre el receptor $GABA_B$ y los receptores a glutamato y de esta forma modular la descarga basal aferente vestibular. Para corroborar los datos electrofisiológicos se hicieron ensayos de expresión génica mediante RT-PCR para evaluar la presencia del ARNm que codifica para las subunidades $GABA_{B1}$ (n=3) y $GABA_{B2}$ (n=3) para el receptor $GABA_B$, estando presente en cresta y ganglio vestibular en E15, E17, E19, y E21. Sin embargo, electrofisiológicamente no observamos una respuesta significativa en E15 ante la aplicación de baclofén, a pesar que el ARNm que codifica para ambas subunidades del receptor $GABA_B$ está presente en esa edad. Esto posiblemente nos esté indicando un posible retardo en el acople de las subunidades del receptor, una alta tasa de degradación del receptor, o una falta de expresión funcional en la superficie celular. Con los resultados obtenidos podríamos concluir que los receptores $GABA_B$ actúan en sinergismo con los receptores $GABA_A$ para proveer un relevo en la funcionalidad de los receptores $GABA_A$, los cuales han demostrado que su activación resulta en acciones excitadoras durante el desarrollo embrionario en el sistema vestibular, este efecto excitador disminuye conforme se llega a edades cercanas a la eclosión y se mantiene durante edades postnatales tempranas. Podría considerarse que la activación de los receptores $GABA_B$ es secuencial en la excitación neuronal, contribuyendo en efectos tróficos en la consolidación sináptica aferente vestibular en etapas cercanas a la eclosión.

Introducción

Generalidades del Sistema Vestibular

El sistema vestibular se encarga de detectar los cambios gravitacionales y los movimientos de aceleración lineal y angular que ejerce el cuerpo y la cabeza de un individuo (Drucker, 2005). Es un sistema multimodal que mantiene el equilibrio y orientación espacial, el cual recibe información procedente del sentido de la vista y de receptores somáticos (Parker 1981).

El aparato vestibular es la parte no auditiva del oído interno el cual consiste en un laberinto óseo y membranoso y está localizado en el hueso temporal. La perilinfa se caracteriza por ser un fluido típico extracelular debido a su composición iónica ([Na^+] 150mM, [K^+] 4.2mM, [Cl^-] 116.6mM, [Ca^{2+}] 1.41mM) el cual llena el intersticio entre el laberinto membranoso y el óseo. Por otro lado el laberinto membranoso está lleno de endolinfa, un fluido extracelular de una composición inusual ([Na^+] 2.5mM, [K^+] 140mM, [Cl^-] 142mM, [Ca^{2+}] 0.24mM) (Sauer et al., 1999). Al sistema vestibular lo componen 5 órganos: 2 órganos otolíticos y 3 canales semicirculares (figura 1).

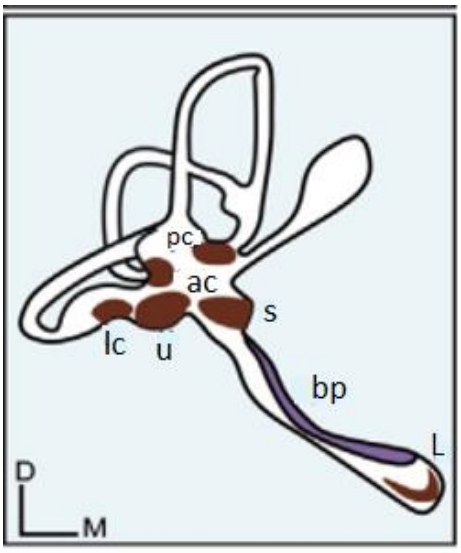

Figura 1. Vista esquemática del oído interno de *Gallus gallus*. El esquema muestra los componentes del sistema vestibular y la parte auditiva, así como las áreas sensoriales: Cresta (anterior, AC, posterior, PC, y lateral, LC), mácula (utrículo, U, y sáculo, S), papila basilar (BP), lagena (L) (Modificado de Romand and Varela-Nieto 2014)

Canales semicirculares

Los conductos semicirculares son tubos llenos de endolinfa orientados a un plano distinto. Son tres, el anterior, el posterior y el horizontal o lateral y se encuentran en el laberinto óseo. Los tres canales forman ángulos rectos entre sí, por lo que detectan la aceleración rotacional en cualquier dirección. Estos conductos son de menor tamaño que los conductos óseos donde se alojan (Richard et al., 2005). Desembocan en el utrículo y en uno de sus extremos hay una ámpula, que es un alargamiento bulboso que contiene el epitelio sensorial conocido como cresta ampular. La cresta ampular contiene células ciliadas y de sostén que están cubiertas por una pequeña masa de material gelatinoso, denominado cúpula (figura 2). Al detectar aceleraciones angulares de la cabeza, se producen pequeños movimientos de la endolinfa. Debido al movimiento, la endolinfa se desplaza hacia el laberinto membranoso que provoca que la cúpula se distorsione y por ende los cilios tengan flexión y las frecuencias de descarga de las fibras aferentes vestibulares varíen. Los cilios de cada cresta ampular se orientan en la misma dirección. En el canal horizontal los cilios se orientan hacia el utrículo, y en los otros canales se orientan en sentido opuesto al utrículo (Bruce et al., 2009).

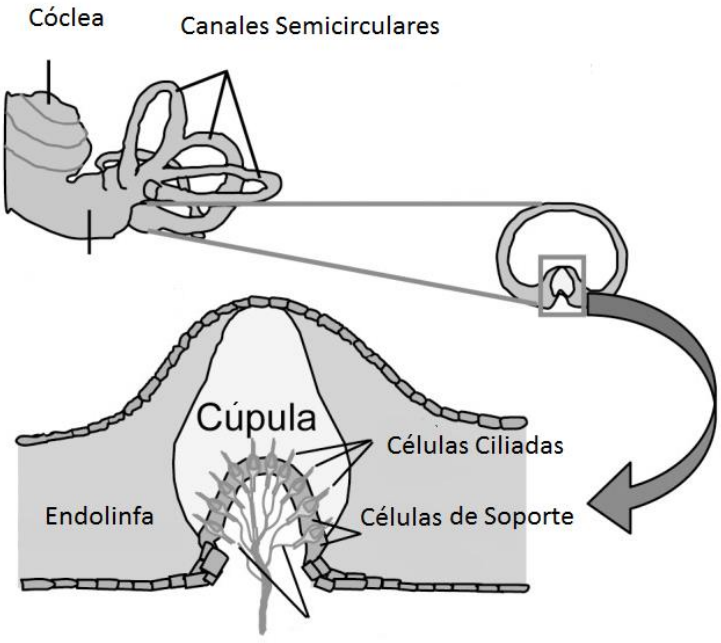

Figura 2. Los canales semicirculares poseen un ensanchamiento llamado ámpula. En el ámpula se localiza la cresta ampular la cual está compuesta por células ciliadas y de soporte que conforman el neuroepitelio. El haz ciliar esta embebido en la cúpula. Los movimientos angulares ocasionan que el flujo de la endolinfa provoca un empuje en la cúpula que desencadenará el proceso de mecanotransducción. (Modificado de Dernedde et al., 2014)

Órganos otolíticos

El utrículo y el sáculo son dos estructuras en forma de saco (Richard et al., 2005). Su tamaño varía entre especies, el utrículo, el órgano otolitico de mayor tamaño mide 2.2x 2.2mm (humano), 1.0 x 0-7 mm (gato) y .0.23 x 0.22 mm (murciélago) (Harada 1983). En estos dos órganos se encuentra una región especializada llamada mácula que tiene forma de riñón que se encuentra en el plano horizontal de la cabeza y está compuesta por un epitelio sensorial ciliado. Las máculas están divididas en dos partes por la estriola; presenta células ciliadas tipo I; que son células con cuerpo en forma de botella, más voluminosas y numerosas, y células tipo II que tienen cuerpo cilíndrico. La estriola de cada órgano otolítico está curvada, por lo tanto las células ciliadas están orientadas en todas las direcciones. En el utrículo las células ciliadas a cada lado de la estriola están polarizadas en sentido hacia la estriola (kinocilio en dirección a la estriola), mientras que en el sáculo están polarizadas en sentido opuesto a la estriola (kinocilio en dirección opuesta a la estriola). Los cilios de las células están embebidos en una membrana otolítica, compuesta por otoconia, cristales de carbonato cuya densidad es de 2.95 gramos por centímetro cúbico (figura 3). Estos cristales actúan como una masa provista de inercia que resiste con vigor la aplicación de las fuerzas externas (Parker, 1981). Los órganos otolíticos al ser sensibles a la aceleración, detectan la dirección y magnitud de la gravedad, al igual que aceleraciones transitorias lineales debidas al movimiento. La localización de las máculas en estos órganos, hace que el utrículo detecte aceleraciones lineales en el plano horizontal, y el sáculo detecte aceleraciones lineales en el plano vertical (Lasserson, 2004).

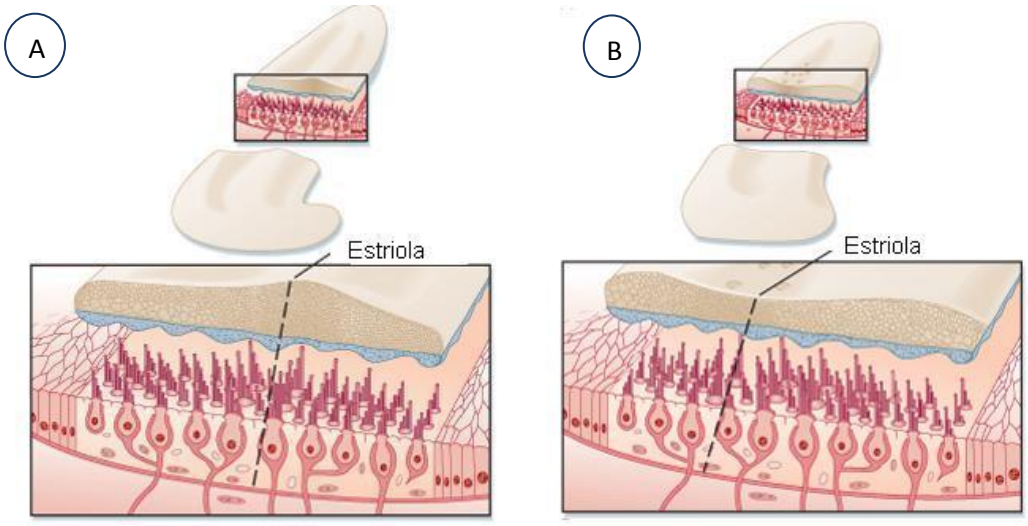

Figura 3. Mácula de órganos otolíticos. A) Sáculo; B) Utrículo Se observa la otoconia, las células ciliadas, células de soporte, fibras nerviosas, la estriola y la polaridad del haz ciliar (Tomado de Koeppen and Stanton 2008).

Células ciliadas

Cada célula ciliada del sistema vestibular, está compuesta por numerosos estéreocilios delgados, además de tener un largo y grueso kinocilio posicionado al final de la superficie de la célula ciliada. Los estereocilios puedes ser de 30 a 300 y se distribuyen hexagonalmente sobre la superficie apical, presentando un arreglo ascendente hacia el kinocilio (Wersall and Bagger-Sjöbäck, 1974). Las células ciliadas vestibulares exhiben una actividad de reposo en la ausencia de un estímulo. El estímulo es censado por el sistema nervioso central por un cambio en la actividad de reposo. Las células ciliadas no producen terminaciones nerviosas, pero están sinápticamente conectadas con fibras nerviosas (Greger and Windhorst, 1996). Existen dos tipos de células ciliadas, las de tipo I que son células con cuerpo en forma de botella o ánfora, con el núcleo localizado en la parte basal y están rodeadas de un cáliz nervioso aferente que cubre su parte basal. Las neuronas eferentes hacen contacto directo en la superficie lateral del cáliz de la inervación aferente y no con la célula ciliada. La célula tipo II tiene cuerpo cilíndrico, su núcleo se encuentra en el centro de la célula y tienen numerosas terminaciones sinápticas en forma de

botón tanto aferentes como eferentes y hacen contacto directo con la célula ciliada (figura 4) (Bartual, 1998).

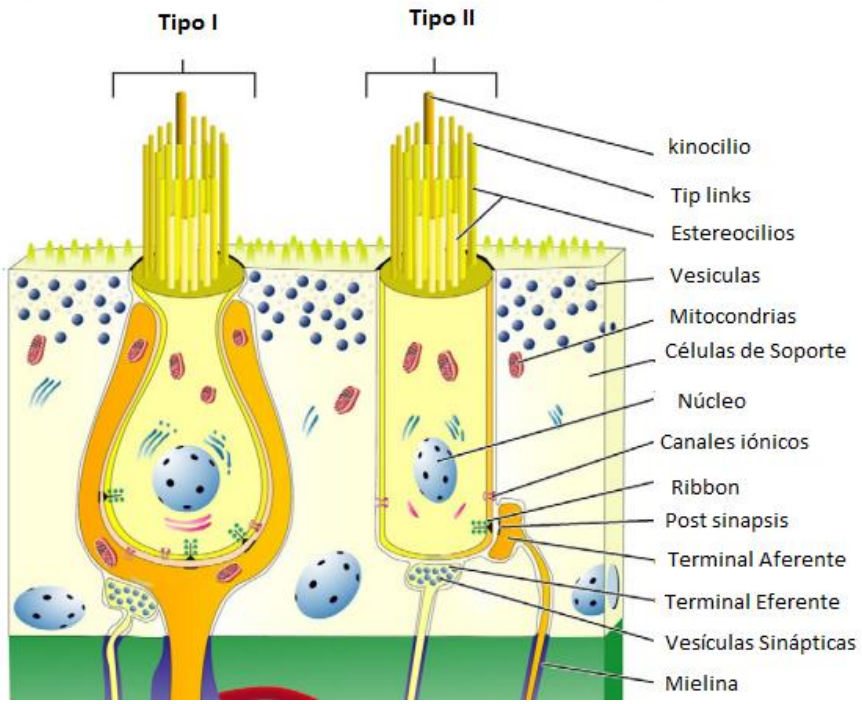

Figura 4. Esquema de las células ciliadas tipo I y tipo II. Las células ciliadas tipo I presentan una terminal aferente en cáliz, las tipo II presentan terminales aferentes en botón. Las terminales eferentes contactan con las terminales en cáliz en las células ciliadas tipo I, y directamente con la célula ciliada tipo II. Se muestran las células de soporte, formando uniones estrechas en el ápice de las células ciliadas tipo I y II. Las estructuras Ribbon se muestran en proximidad con los canales iónicos (Modificada de Desai and Dua, 2014).

Proceso de mecanotransducción

El haz ciliar es el responsable de la transducción sensorial, que consiste en estereocilios que están conectados por finos filamentos extracelulares llamadas “tip links”, los cuales unen el ápice de los estereocilios de menor tamaño con la pared lateral de los de mayor tamaño. Estudios recientes han demostrado que los tip links están formados por caderina 23 (CDH23) y protocaderina 15 (PCDH15). Hay proteínas que se unen a CDH23, como la proteína harmonin, Myo7a, SANS (Kazmierczak and Müller, 2012) Mientras que el complejo de proteínas que incluyen a PCDH15 localizadas en la parte inferior del tip link no están del todo dilucido, sin embargo, proteínas como Myo3a, Myo15 y espin1

forman parte de este complejo y se cree están implicados en la regulación de la elongación del estereocilio (Schwander et al., 2010) (figura 5). Hay canales catiónicos inespecíficos que se abren cuando hay una deflexión en dirección hacia el kinocilio, ya que aumenta la tensión de los tip links, otorgando la energía necesaria. Por otro lado si la deflexión es al sentido opuesto del kinocilio, los canales se cerrarán, de esta forma funcionan como un resorte que abre y cierra los canales dependiendo de la deflexión. Hay estudios que indican que estos canales están localizados entre 2-3µm de las puntas. En la posición de reposo, los canales no están totalmente cerrados, están abiertos ~10-20%, y esto se puede atribuir a la tensión normal de reposo de los tip links (Meyer et al., 1998). La estructura en el extremo superior de los "tip link", a la altura de la placa de inserción, probablemente alberga un motor de adaptación, el mecanismo que produce la fuerza es mediante un cluster de moléculas de miosina 1c. La miosina 1c responde a cambios en la tensión de las "gating spring" y del Ca^{2+} intracelular moviendo la placa de inserción a lo largo del citoesqueleto del estereocilio, de esta forma restaura la tensión (figura 6) (Steyger et al., 1998).

Por lo tanto, al abrirse los canales catiónicos inespecíficos, provocado por la flexión de los cilios, se cree que el K^+ entra por estos canales por ser el de mayor concentración en la endolinfa. Al mismo tiempo hay canales rectificadores de K^+ en la zona baso lateral de la célula que permiten la salida de K^+ del interior. El potencial de reposo de -60mV se caracteriza por un estado estable de flujo de iones (Greger and Windhorst, 1996). En la figura 6 se puede apreciar el proceso de mecano transducción. Al haber una deflexión de los estereocilios hacia el kinocilio, la proporción de canales catiónicos inespecíficos abiertos se incrementa, dejando pasar mayor cantidad de K^+, y la célula se despolariza, causando la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, aumentando el Ca^{2+} intracelular que provocará la liberación del neurotransmisor que de acuerdo a evidencias experimentales es el glutamato.

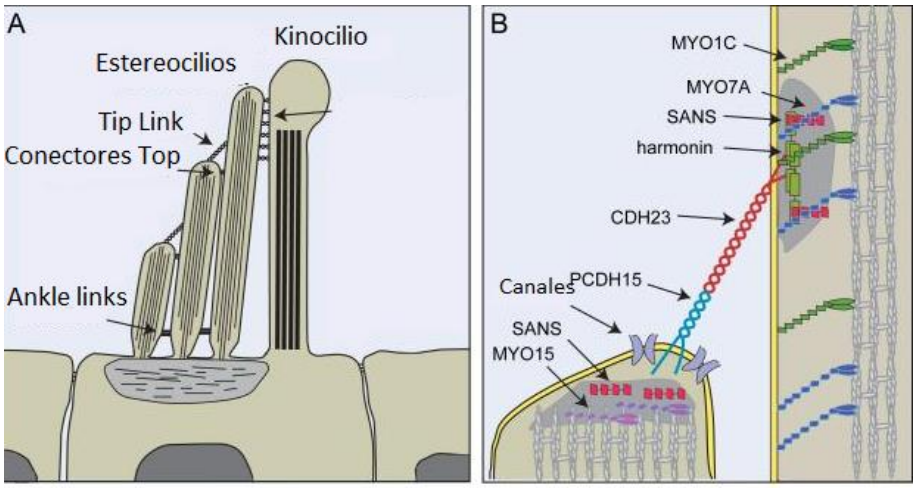

Figura 5.- A) Sección transversal de la parte apical de la célula ciliada. El haz ciliar consiste en numerosos estereocilios formados por actina, y un kinocilio compuesto por microtúbulos. Los estereocilios están conectados entre si y al kinocilio por filamentos extracelulares, los tip links, conectores top, ankle links y kinocilio link. B) Diagrama de la región del tip link, indicando las moléculas que componen el complejo del tip link. (Modificado de Kazmierczak and Müller, 2012).

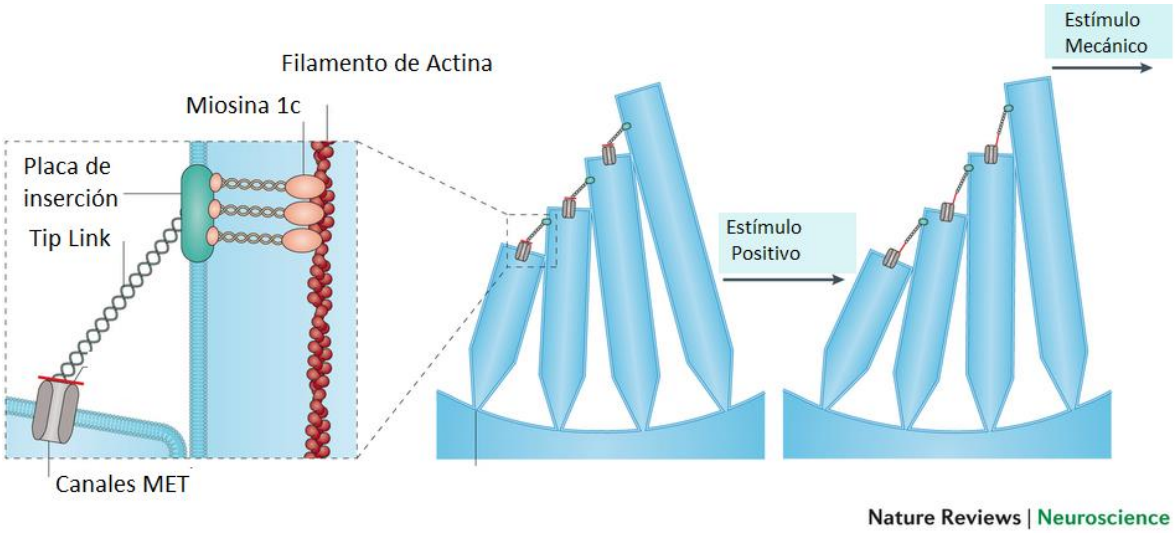

Figura 6. Se observa cada elemento de la transducción de la célula ciliada, los cuales están localizados en la parte superior de los cilios, se incluyen los tip links que interconectan los estereocilios adyacentes, la parte inferior del tip link se conecta a canales sensibles a estimulación mecánica (canales MET). La parte terminal superior pertenece a la placa de inserción, donde se localiza la molécula de miosina 1c. Cuando un estímulo mecánico provoca la deflexión de los cilios hacia una dirección positiva, hacia el kinocilio, se incrementa la tensión de los tip links. Este proceso incrementa la probabilidad de apertura de los canales MET ,generando una corriente iónica de entrada , predominando K^+ y Ca^{2+}, lo cual provoca una despolarización y un subsecuente potencial receptor (Modificado de Hudspeth, 2014).

La adaptación es la restauración de la sensibilidad mediante el decremento de la respuesta a un estímulo sostenido, lo cual es claramente relevante en las células ciliadas. A medida que estos canales catiónicos inespecíficos, o también conocidos como canales MET, se empiezan a abrir también se cierran, refiriéndose a un proceso de adaptación. Este proceso se lleva a cabo mediante dos mecanismos. En la adaptación, la entrada de Ca^{2+} a los estereocilios a través de canales MET que se encuentran abiertos, reduce la probabilidad de apertura de estos canales. (Jorgensen and Kroese, 1995). En las células ciliadas del utrículo de ratón (Vollrath and Eatock, 2013) y en las células ciliadas del sáculo de rata (Songer and Eatock, 2011) se observaron adaptaciones rápidas y lentas con constantes de tiempo en el orden de 1-10 ms y 10-100 ms, respectivamente; Por ello se han propuesto dos mecanismos de adaptación en las células ciliadas.

La adaptación rápida ocurre cuando el Ca^{2+} entra por los canales MET, y luego se cierran, debido a que el Ca^{2+} se une al canal o a un sitio cerca del canal, lo cual provoca un cambio de conformación que lleva al canal a su estado cerrado. Debido a que esta forma de adaptación depende absolutamente de la entrada de Ca^{2+}, ocurre en unos cuantos cientos de microsegundos. Este rápido mecanismo debe llevarse a cabo en el extremo inferior del “tip link” si el canal MET está localizado en ese sitio (Figura 7). De igual forma se sugiere que este mecanismo probablemente difiere entre especies y/o células ciliadas vestibulares y cocleares (Gillespie and Mûller, 2009). Hay dos modelos propuestos para la adaptación rápida, “cannel-reclosure model” y “tension-release model”.

En el primer modelo, el Ca^{2+} entra por los canales MET y se une al canal y cambia la relación entre la tensión de los “gating-spring” y la conductancia del canal en reposo. Lo que sugiere es que la unión de Ca^{2+} al canal hace más difícil que se abra. En el segundo modelo, el Ca^{2+} se une a un sitio cerca del canal y causa la liberación del elemento mecánico que está en serie con el aparato de transducción. Por lo tanto cuando decrece la tensión, el canal se cierra rápidamente (Bozovic and Hudspeth, 2003).

El modelo de adaptación lenta es el resultado de un cluster de moléculas de miosina, este agrupamiento se hace llamar motor de adaptación, el cual se encuentra en el extremo superior del tipo link y controla la tensión de los “gating springs” (Howard and Hudspeth, 1987; Gillespie and Cyr, 2004). En reposo el motor genera suficiente tensión para que los canales MET estén parcialmente abiertos. Durante un estímulo positivo, el motor se desliza hacia abajo del filamento de actina del estereocilio, la cinética de este proceso está controlado por Ca^{2+}. Cuando la tensión se reduce por un estímulo negativo, las moléculas de miosina se deslizan hacia arriba para restaurar la tensión

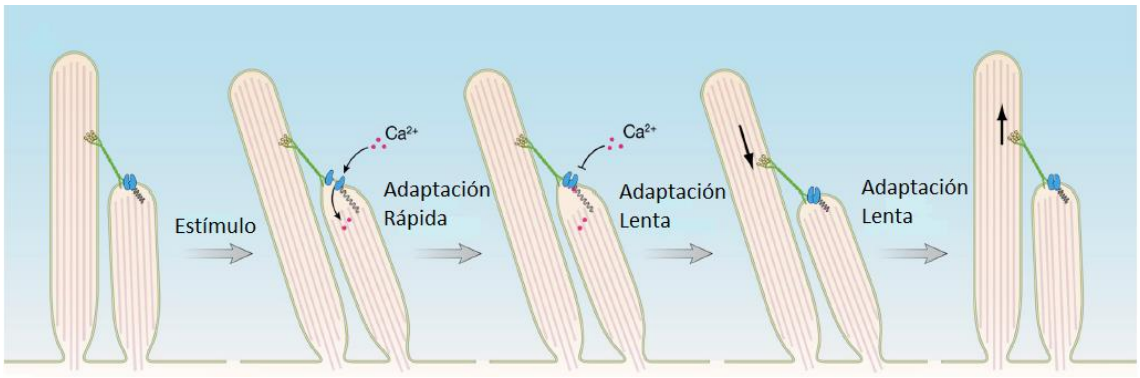

Figura 7.- Se esquematiza los dos procesos de adaptación. En la adaptación lenta interviene un reajuste en el motor de adaptación que modifica la tensión de los “tip links” por parte de proteínas motoras como la miosina 1c. En la adaptación rápida hay una modificación directa del canal MET por parte del Ca^{2+} (Modificado de Schwanders et al., 2010)

Eferentes vestibulares y neurotransmisión

En la sinapsis eferente, los receptores auditivos y vestibulares reciben una inervación eferente originada en el cerebro. El contacto sináptico se da con las células ciliadas tipo II, pero también pueden formar contacto con aferentes en forma de cáliz de células ciliadas tipo I. Los cuerpos celulares de las fibras eferentes se encuentran agrupados en el tallo cerebral, cerca de los núcleos vestibulares (figura 8).

Las terminales eferentes son altamente vesiculadas y son positivas para AChE, sugiriendo que estas vesículas contienen acetilcolina (ACh). Otras sustancias que se coexpresan comúnmente en las neuronas colinérgicas como ATP,

CGRP pueden estar presentes (Dowdall et al., 1974; Fontaine et al., 1986; New and Mudge, 1986). Algunos contextos de estudios de las fibras eferentes del sistema vestibular se basan en las eferentes auditivas, donde suman otros neurotransmisores aparte de ACh, como GABA, dopamina, CGRP y encefalinas (Eybalin, 1993). Los estudios indican que la ACh es el neurotransmisor predominante liberado por las eferentes, sin embargo, el neurotransmisor gaseoso, óxido nítrico (NO) se ha visto implicado como un posible modulador eferente. ACh actúa sobre dos clases de receptores: nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs), los cuales están presentes en el neuroepitelio vestibular. Los nAChRs son canales iónicos acoplados a ligando que tienen una estructura pentamérica. Se han identificado 17 subunidades (α1-10, β1-4, δ,γ,ε) (Millar and Gotti, 2009; Taly et al., 2009; Alburquerque et al., 2009). En el sistema nervioso se pueden encontrar como homoméricos o heterodiméricos que se constituyen por dos distintas subunidades α o una subunidad α y una β o por múltiples subunidades α y β. Estudios en el neuroepitelio vestibular han demostrado que las subunidades α9 y α10 están expresadas en aves (Lustig et al., 1999), las cuales forman receptores funcionales. Las subunidades α9 y α10 muestran patrones de expresión diferentes entre IHC, OHC así como entre cóclea y células ciliadas vestibulares. Primeramente se expresan la subunidad α9, seguida por la inervación eferente y la expresión de la subunidad α10, y consecuentemente la aparición de clusters de nAChR en la superficie celular (Simmons and Morley, 2011). Los receptores muscarínicos son receptores acoplados a proteínas G. Están representados por 5 subtipos (m1-5). Los cinco subtipos se han localizado en el neuroepitelio vestibular de ratas (Wackym et al., 1996) y paloma (Li et al., 2007).

Las eferentes vestibulares han demostrado tener un carácter excitatorio, inhibitorio o mixto. Estos efectos sobre las aferentes vestibulares podría deberse a los múltiples tipos de receptores colinérgicos presentes. Por ejemplo, se incrementa la descarga aferente actuando por un receptor muscarínico, este efecto, antagonizado por atropina, parece estar relacionado con la despolarización de la célula ciliada. Se disminuye la descarga aferente, actuando sobre un receptor muscarínico o nicotínico. Este efecto es bloqueado

por curare, una toxina natural, también por estricnina y parcialmente por atropina, parece estar relacionado con la hiperpolarización de la célula ciliada (Guth et al., 1998a).

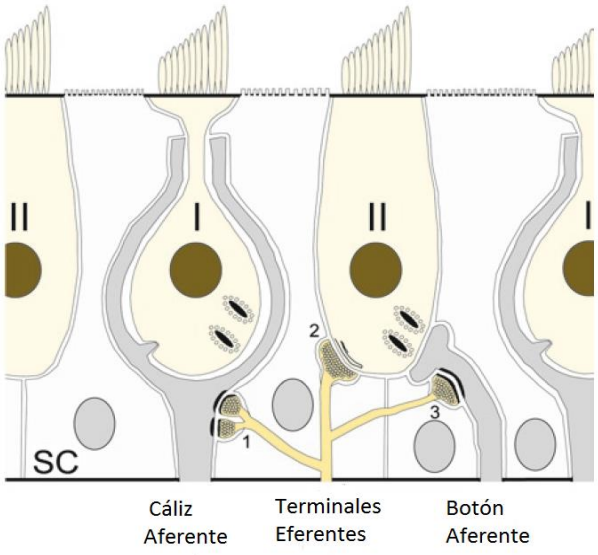

Figura 8.- Las células ciliadas tipo I poseen una inervación en forma de cáliz, las células ciliadas tipo II poseen en forma de botón. Las terminales en cáliz en ocasiones se invaginan en la célula ciliada. Las fibras eferentes poseen terminales en botón con numerosas vesículas que inervan las terminales en cáliz (1) y también a las células ciliadas tipo II (2) así como a las fibras aferentes en botón. (Tomado de Holt et al., 2011)

Aferentes vestibulares y neurotransmisión

Las células ciliadas del neuroepitelio vestibular establecen sinapsis con neuronas aferentes y una inervación del sistema neuronal eferente. Las aferentes vestibulares se distinguen por su patrón de disparo, en irregulares y regulares. Son específicas de acorde a su inervación. En mamíferos, en las zonas periféricas de las crestas y en extraestriola de las máculas se caracteriza por presentar un patrón de descarga regular, mientras que en las zonas centrales de las crestas y en la estriola de la mácula se muestra un patrón de descarga irregular (Baird et al., 1988; Goldberg et al., 1900b)

La regularidad de descarga de las fibras aferentes vestibulares depende de dos factores; de la entrada sináptica y de sus propiedades intrínsecas, así como de sus patrones de inervación periférica y la morfología de la terminal. En comparación con las fibras regulares, las irregulares se caracterizan por tener diámetros mayores y una mayor velocidad de conducción (Goldberg and Fernández, 1977). Mayor sensibilidad a las aceleraciones angulares y liniales que actúan sobre la cabeza. (Fernández and Goldberg, 1976b); responden

más rápido a la señal eferente (Goldberg and Fernández, 1980; Sadeghi et al., 2009) y son más sensibles al movimiento. Las aferentes vestibulares que presentan una mayor adaptación poseen un mayor intervalo irregular inter-espiga, y las aferentes menos adaptables tienen un mayor intervalo regular inter-espiga (Goldberg, 1991).

Las células ciliadas y sus sinapsis difieren marcadamente entre zonas y por lo tanto se puede atribuir una especialización en la señalización aferente. Por ejemplo, la célula ciliada tipo I que se localiza en la estriola difiere de una célula ciliada tipo I ubicada en la extraestriola (Eatock and Songer 2011). Se han identificado tres tipos de terminaciones aferentes, las de tipo cáliz que inervan células ciliadas tipo I, las de tipo en forma de botón que conectan varias células ciliadas tipo II y las dimórficas que inervan ambos tipos de células ciliadas (Eckert, 1997). Incluso las inervaciones en cáliz difieren dependiendo de la zona. Los cálices de las aferentes dimórficas periféricas tienden a ser simples, donde aproximadamente el 50% de las inervaciones en cáliz en zonas centrales son complejas (envuelven 2-4 células ciliadas) (Desai et al., 2005a, b), mientras que las terminales aferentes en botón inervan las zonas periféricas y extraestriolares. Por otro lado las aferentes en cáliz simples inervan solo las zonas centrales y estriolar (figura 9).

Las tres clases de aferentes vestibulares son mielinizadas. Su velocidad de conducción se correlaciona con el diámetro de la fibra, la cual varía igualmente con la zona. Por lo tanto, las aferentes en cáliz son las fibras centrales más gruesas y rápidas, son relativamente lentas en la periferia. Las aferentes en botón son las más finas y lentas (Goldberg and Fernandez, 1977).

En la sinapsis aferente se ha registrado una actividad eléctrica basal que es debida a la liberación de un neurotransmisor por medio de la célula ciliada. Los estudios sugieren que se trata del glutamato, con efecto excitador (Patneau and Mayer, 1990). El glutamato liberado en la sinapsis aferente interactúa con varios subtipos de receptores de aminoácidos excitadores (EAA), incluyendo los receptores a NMDA, AMPA, kainato y metabotrópicos. Sin embargo hay evidencia de que glutamato no es el único neurotransmisor en las líneas

aferentes. También se encuentra el neurotransmisor GABA, ya que se ha mostrado su síntesis en varios vertebrados. La síntesis de GABA toma lugar en las células ciliadas vestibulares, debido a que la enzima acido glutámico descarboxilasa se encuentra en la periferia vestibular. Durante el desarrollo embrionario, GAD es paralela a la maduración de las células ciliadas y no es modificada por el surgimiento de la inervación eferente. De igual forma técnicas de inmunorreactividad muestran la localización de GABA en el citoplasma de las células ciliadas vestibulares, mientras que GABA-T, la enzima encargada de su degradación se encuentra alrededor de las células ciliadas y a lo largo de las fibras nerviosas a través del estroma vestibular (Usami et al., 1989). Así mismo hay reportes de que GABA podría actuar como un facilitador de la descarga aferente vestibular durante el desarrollo (Cortes et al., 2013).

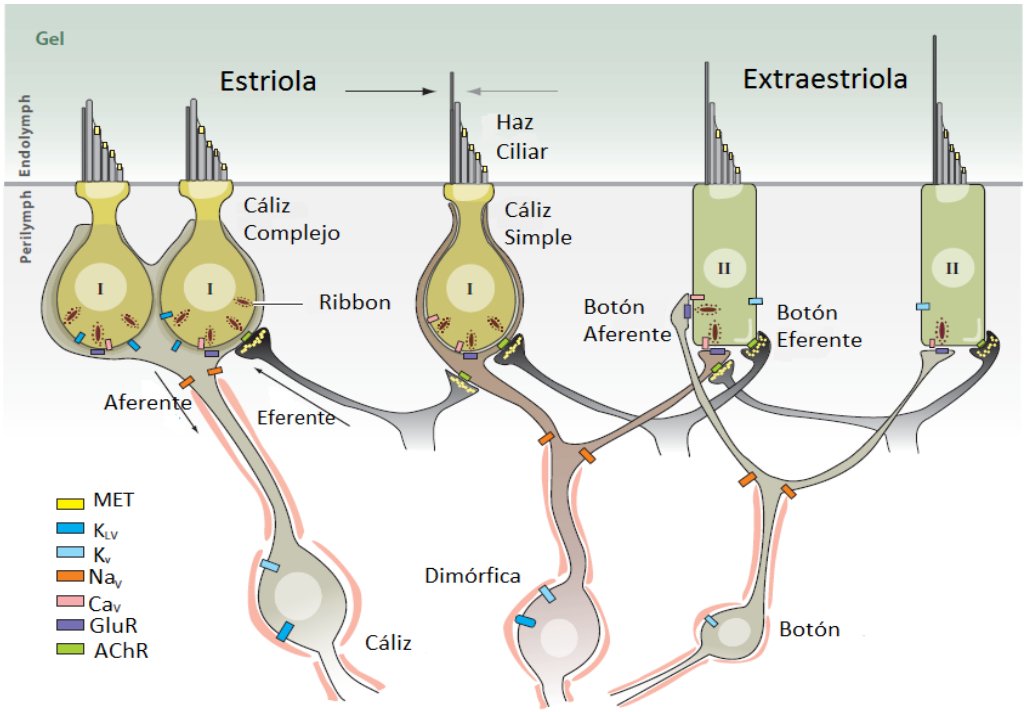

Figura 9.- Esquema que muestra la clasificación de las aferentes vestibulares respecto a su morfología. Una morfología de cáliz complejo, que inervan dos o más células y se encuentran localizadas en el centro o en la estriola. Las aferentes que se caracteriza por ser dimórfica e inerva ambas zonas y el tipo de morfología de botón que inerva exclusivamente la periferia y la extraestriola. Las neuronas grises esquematizan a las inervaciones eferentes. Una deflexión positiva abren los canales MET, lo que provoca una despolarización en la célula al igual que la activación de corrientes a través de canales dependientes de voltaje (Kv, K_{LV}, Ca_V) lo cual da origen al potencial receptor. Las vesículas sinápticas se encuentran organizadas en estructuras llamadas ribbons; estas se fusionan con la membrana y liberan glutamato el cual activa receptores a glutamato en las membranas postsinápticas aferente. Las fibras eferentes modulan las señales aferentes liberando ACh, activando los receptores de ACh en la célula ciliada y en las aferentes vestibulares.(Tomado de Eatock and Songer, 2011).

Desarrollo del sistema vestibular.

El oído interno de los vertebrados se origina de un engrosamiento del ectodermo adyacente al rombo encéfalo. Este epitelio se conoce como plácoda ótica, el cual se invagina para formar la copa ótica, que se cierra para formar la vesícula ótica o también llamado otocisto (ver figura 10). Una subpoblación de células epiteliales en la región antero ventral de la copa ótica y de la vesícula ótica se juntan para formar el octavo ganglio (vestíbulo-coclear). A partir de la formación de la vesícula ótica se realizan una serie de procesos morfogenéticos para desarrollar el oído interno maduro **(**Highstein, et al., 2004).

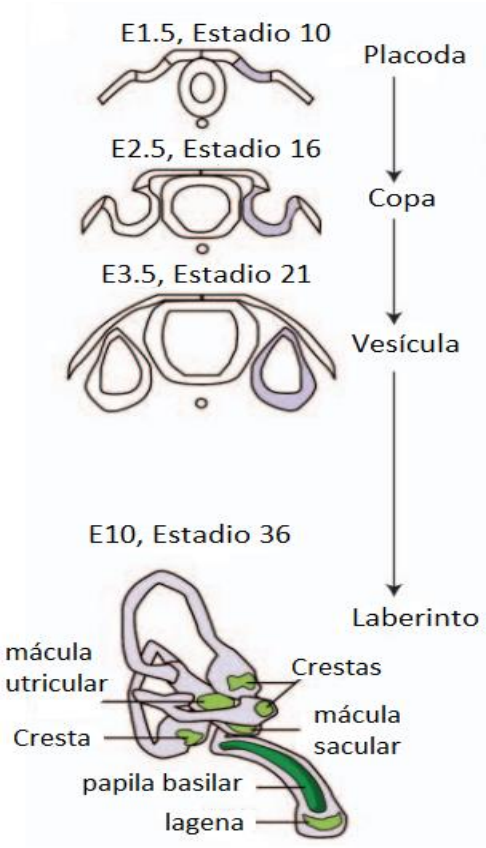

Figura 10. Desarrollo del oído interno en aves. Se muestran las primeras etapas de desarrollo (Modificado de Daudet and Lewis, 2005).

En las edades E2-E3 el ganglio vestíbulo-coclear es discernible en el pollo. De igual forma en E3, se ha formado el otocisto a partir de la plácoda ótica, para E4 los cambios en el otocisto son evidentes, se observan protuberancias en el lado dorsal que darán origen a los canales semicirculares y en el ventral que se evaginará como un tubo hueco en su parte distal para formar el conducto coclear y en la parte proximal se generará el sáculo. Por otro lado el ganglio vestíbulo- coclear se ha dividido para formar los elementos que darán lugar a las porción vestibular y auditiva, cuyas proyecciones periféricas tempranas empiezan a formar parte del epitelio sensorial de otocisto y conformar los primeros contactos aproximadamente en E6. En la parte media del otocisto se forma el inicio de un tubo hueco que se convertirá en el conducto endolinfático. En E6 el extremo distal de los conductos endolinfáticos empiezan a expandirse para formar el saco endolinfático. En E5 la parte superior del otocisto tiene dos distintos

compartimientos, delineado por un estriado profundo en la superficie lateral. El compartimiento dorsal dará origen a los dos canales verticales (superior y posterior), el canal horizontal se formará a partir del compartimiento lateral. De E6 a E7 la morfogénesis de los canales semicirculares puede ser visualizada como una cavidad que formará el ámpula para cada canal. Para E7 a E9, los canales asumen sus posiciones finales, siendo el canal lateral el último en asumir su posición ortogonal respecto a los otros dos. En E9 los canales semicirculares, ámpula, sáculo, utrículo, cóclea, conducto endolinfático y el saco endolinfático ya han sido formados. Después de esta etapa, de E9 a E18 la morfogénesis se concentra en incrementar el tamaño del laberinto membranoso, así como un aumento en el diámetro de los canales semicirculares (figura11) (Bissonnette and Fekete, 1996).

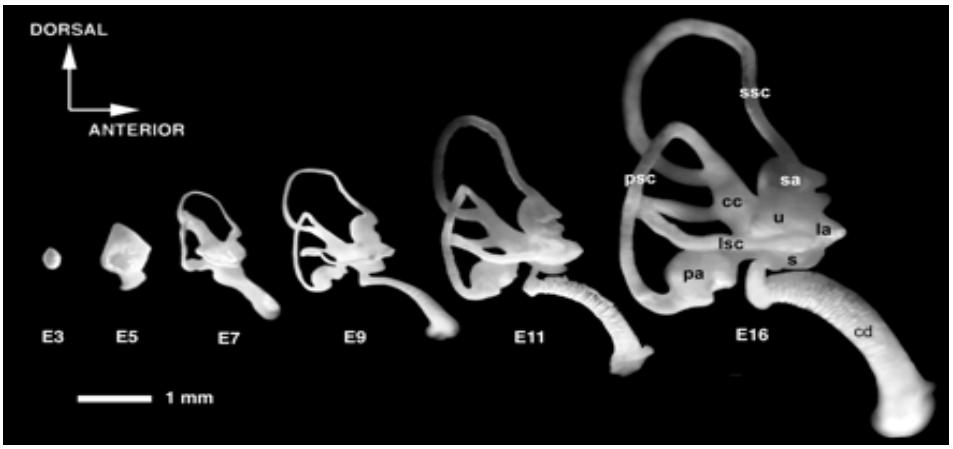

Figura 11. Morfogénesis del oído interno de pollo. El laberinto se desarrolla de una vesícula ovoide. Entre E3 y E7 las principales estructuras aparecen. Cc, canal común; la, ámpula lateral; ISC canal semicircular lateral; psc, canal semicircular posterior; sa, ámpula superior, ssc, canal semicircular posterior; u, utrículo (Tomado de John et al., 2000).

El desarrollo del epitelio auditivo y vestibular en embriones de pollo se puede dividir en tres fases. La primera, es la pre-inervación, la cual se extiende desde el primer engrosamiento del ectodermo de la placoda ótica hasta la formación del otocisto. Conformando los estadios 11-25 establecidos por Hamburger y Hamilton, en 1951 que vendría siendo desde 40 hrs hasta 4.5 día embrionario. No hay neuritas extendiéndose en el epitelio del otocisto, sin embargo las

presuntas células ganglionares se encuentran adyacentes en la pared ventromedial del otocisto, separado por el epitelio de la lámina basal (figura 12 A). La segunda etapa, se conoce como estado de inervación, se caracteriza por el cruce de neuritas a través de la lámina basal y se empiezan a ramificar y contacta con las células epiteliales (figura 12 B). Se extiende desde la etapa 25, (E4.5) en la cual el mayor desarrollo embrionario y sinaptogénesis ocurre asincrónicamente conforme el epitelio se extiende y se divide en las estructuras sensoriales primordiales auditivas y vestibulares (figura 12 C). Los sitios sinápticos aparecen durante el estadio 28-32 (E5.5-E7.5) en sitios entre las presuntas células ciliadas y terminales aferentes. Se aprecian las formaciones presinápticas ribbon en el estadio 28. En el estadio 32, en algunas áreas inervadas, largas terminales forman contacto con la parte basal de las células ciliadas, tomando la forma de la característica terminal en cáliz (figura 12 D). En este estadio se pueden encontrar sitios con múltiples estructuras presinápticas ribbon y sinapsis químicas bien desarrolladas. Durante esta fase los contactos sinápticos tanto aferentes como eferentes se desarrollan, las áreas sensoriales y no sensoriales se diferencian, hay un crecimiento tridimensional y la compartamentalización resulta en la formación del laberinto maduro. Al final del desarrollo embrionario, en el estadio 45, (19-20 días embrionarios) las características morfologías de inervación son claramente evidentes ver figura 12 E. (Ginzberg and Gilula, 1980)

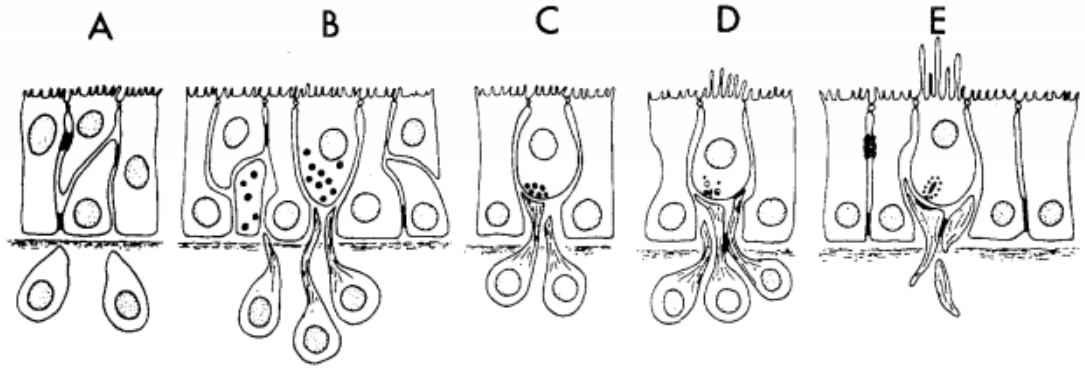

Figura 12.-Representación de la posible secuencia morfológica representando la formación de la sinapsis aferente. A) No se observa diferenciación en el epitelio. B) Las neuritas empiezan a crecer, se forman vesículas granulares en el citoplasma de algunas células epiteliales, y las células ciliadas inmaduras pierden las uniones gap con las células de soporte. C) Las vesículas granulares se acumulan en sitios opuestos a las neuritas. D) en algunos contactos se van desarrollando las terminales aferentes. E) arreglo final de las sinapsis entre células ciliadas y terminales aferentes en E20, (estadio 45) se incluye la presencia de estructuras ribbon. No se muestra las sinapsis eferentes (Tomado de Ginzberg and Gilula, 1980).

El desarrollo del oído interno es más rápido en pollos que en roedores. A pesar de que ambos tengan aproximadamente 3 semanas (21 días) de periodo embrionario. El oído interno del pollo se encuentra en un estado de mayor madurez tanto morfológicamente como funcionalmente al llegar a la eclosión, mientras que el oído interno del ratón se encuentra en un estado de inmadurez un poco después del nacimiento. El sistema vestibular de pollo es funcional, pero todavía inmaduro antes de la eclosión.

Las células ciliadas maduras expresan una gran variedad de canales iónicos que sirven para modular el potencial receptor. Una célula ciliada madura de una morfología particular y localización en el epitelio sensorial comúnmente expresa un set de conductancias que las distingue de sus vecinas y de otras células ciliadas de otro epitelio sensorial (Masetto et al, 2000).

Receptores a GABA

Los receptores de GABA se clasifican en receptores $GABA_A$ que activan canales de cloro; $GABA_B$ que inhiben la formación del AMPc y GABAc, que de igual forma activa canales de cloro y se ha identificado en neuronas retínales principalmente, pero también se encuentran en glándula pituitaria e intestino.

Los receptores $GABA_A$ están agrupados en la superfamilia de los canales iónicos regulados por ligandos, en la cual también se incluyen los receptores nicotínicos. Los receptores $GABA_A$ median las sinapsis inhibitorias rápidas en el SNC, controlando la actividad tanto a nivel de red como celular. Las diversas funciones de GABA se ajustan tanto a la heterogeneidad de los receptores de $GABA_A$, como los complejos mecanismos de tráfico celular, así como las interacciones entre proteínas que mantienen y generan una cantidad y localización adecuada de receptores en la superficie celular (Jacob et al., 2008). Referente a su estructura, los $GABA_A$ son pentaméricos y difieren en la composición de sus subunidades que son α,β,γ,δ,ε,θ y π. La mayoría de los receptores contiene 2 copias de la subunidad α, 2 copias de la subunidad β y una copia de la subunidad γ, la cual puede ser reemplazada por las

subunidades δ ,ε, π, y θ. Cada subunidad tiene un dominio extracelular N-terminal, en el cual se incorpora parte del agonista o antagonista y se cree que es donde se une GABA. Hay cuatro dominios que atraviesan la membrana (M1 a M4) que contienen 25 residuos de aminoácidos cada uno, quedando los M2 formando la pared del poro del canal, por ende la carga de M2 va a determinar si el canal conduce cationes o aniones (ya que los $GABA_A$ pueden ser permeables a los iones bicarbonato). Las subunidades también poseen un bucle intracelular entre M3 y M4, que se cree es el sitio de unión de las proteínas kinasas y, por último, una cola C-terminal corta extracelular (Figura 13) (Johnston, 2005). Las combinaciones de las subunidades para formar el heteropentámero varían tanto con la edad y con la localización. De igual forma puede haber variedad en las subunidades provocadas por splicing, por lo cual pueden formarse varios subtipos de receptores $GABA_A$ los cuales pueden demostrar diferencias biológicas como su distribución, la afinidad por GABA, las propiedades del canal, así como su heterogeneidad farmacológica (Olsen, 2002). En la cresta ampular de los mamíferos se localizó al receptor $GABA_A$ en el cáliz que rodea las células tipo I, así mismo las fibras aferentes cercanas a la lámina de células ciliadas se observaron inmunorreactivas (Foster., et al, 1995). De manera similar, se ha observado una distribución uniforme de la inmunorreactividad de GABA y GAD en los dos tipos de células ciliadas del cobayo (López et al., 1992).

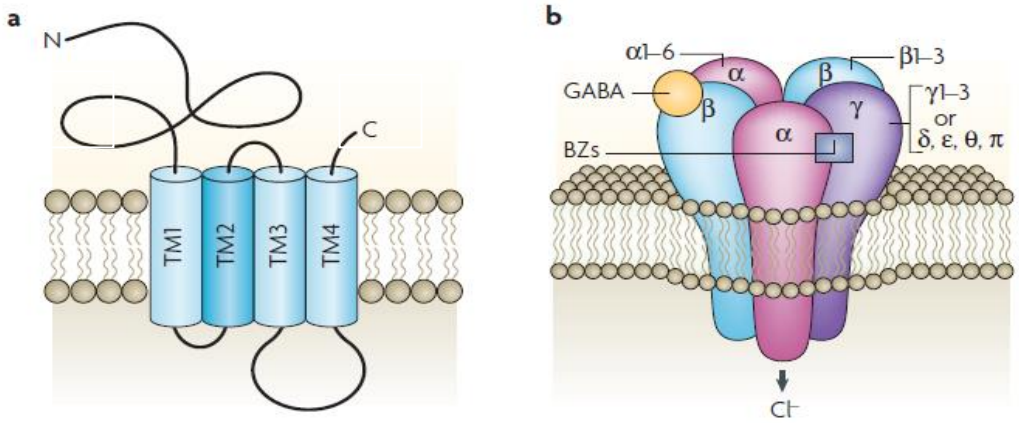

Figura 13. Estructura de los receptores $GABA_A$. (a) observamos la estructura de las subunidades, el extremo N-terminal, el bucle intracelular entre M3 y M4 y la cola C-terminal. M2 resalta ya que es el sensor de voltaje. (b) se observa la formación pentamérica, dejando el poro del canal permeable a Cl- en el centro. Así como los distintos sitios de unión tanto para GABA y diferentes fármacos, para mostrar la heterogeneidad farmacológica del receptor (a y b tomado de Jacob et al., 2008).

Los receptores $GABA_B$ son metabotrópicos. Estos receptores fueron descubiertos en 1979 por Bowery y Hudson, tratando de dilucidar un mecanismo donde participaba la liberación de noradrenalina, donde pensaban que este mecanismo dependía del flujo de cloro provocado por los receptores GABA, no obstante la bicuculina, un antagonista de los receptores $GABA_A$, no modificaba tal proceso, lo que sugirió una forma farmacológica distinta de los $GABA_A$, es decir, los hoy dilucidados receptores $GABA_B$ (Bowery and Hudson 1979). Fue hasta 1997 que el primer receptor $GABA_B$ fue clonado por Kaupmann y se dio pauta al estudio de su estructura (Kaupmann et al., 1997).

Los receptores $GABA_B$ son heterómeros conformados por dos subunidades los $GABA_{B(1)}$ y $GABA_{B(2)}$ (figura 14). Forman parte de la familia C de receptores acoplados a proteínas G, los cuales se caracterizan por tener 7 segmentos transmembranales y un largo dominio extracelular "Dominio atrapa moscas" (VFTD) que contiene el sitio de unión a ligando. A pesar que las dos subunidades poseen un 54% de similitud entre ellas, solo el dominio VFT de $GABA_{B1}$ es el sitio de unión a ligandos, como lo son GABA y baclofén (Pin et al., 2004; Geng et al 2012; Geng et al 2013). Debido a la presencia de una secuencia de retención (RSRR) en el extremo C-terminal de $GABA_{B1}$, esta no puede incorporarse a la membrana plasmática celular por si sola; para esto se requiere un mecanismo por el cual $GABA_{B2}$ enmascara la señal RSRR por medio de un dominio coiled-coil el cual escolta a la subunidad $GABA_{B1}$ a la membrana celular (Gálvez et al., 2001). $GABA_{B2}$ no tiene sitio de unión a GABA, pero interactúa con el ectodominio para incrementar la afinidad estabilizando la conformación de unión a ligando de $GABA_{B1}$, es decir, el ensamble de ambas subunidades es necesaria para incrementar la afinidad del agonista en $GABA_{B1}$ (Liu et al., 2004; Rondard et al., 2008; Geng et al., 2012). Cuando GABA se une a $GABA_{B1}$ el VFTD se cierra y esta conformación permite una interacción directa con el VFTD de $GABA_{B2}$. Este re-arreglo conformacional de los dímeros de VFTD induce la conformación activa de los dominios transmembranales de $GABA_{B2}$ y por consecuente la activación de la proteína G.

Se ha reportado que se pueden generar 14 isoformas de la subunidad $GABA_{B1}$ con diferentes propiedades funcionales. (Bettler et al., 2004). No obstante $GABA_{B1a}$ y $GABA_{B1b}$ son las isoformas con mayor expresión en el cerebro (Benke et al., 1999). Ambas subunidades son traducidas por el gen GABBR1, estructuralmente no difieren entre ellas excepto por el dominio sushi expresado en la región amino terminal extracelular de la isoforma $GABA_{B1a}$. Sin embargo a pesar de esta diferencia, se ha generalizado que no implica un cambio en las propiedades cinéticas y farmacológicas del receptor, por lo que la discrepancia entre la diferencia en las propiedades de las isoformas se debe por la unión de las proteínas auxiliares que incluyen a KCTD (potassium channel tetramerization domain-containing), Mupp1 y GISP.

Existe una co-expresion de las subunidades $GABA_{B1a}$ y $GABA_{B1b}$ en la mayoría de las neuronas del cerebro, la cual está bajo un control transcripcional independiente y varia durante el desarrollo (figura 14). Hay estudios que indican que la localización en terminales glutamatérgicas de $GABA_{B1a}$ es esencial en la función de los heterorreceptores. $GABA_{B1b}$ está localizado en espinas dendríticas que están opuestas a los sitios de liberación de glutamato, justamente donde los $GABA_B$Rs conforman un cluster con los GIRKs. No obstante ambas isoformas de la subunidad $GABA_{B1}$ se expresan a lo largo del tallo dendrítico donde se pueden acoplar con los canales VGCCs o TREK2

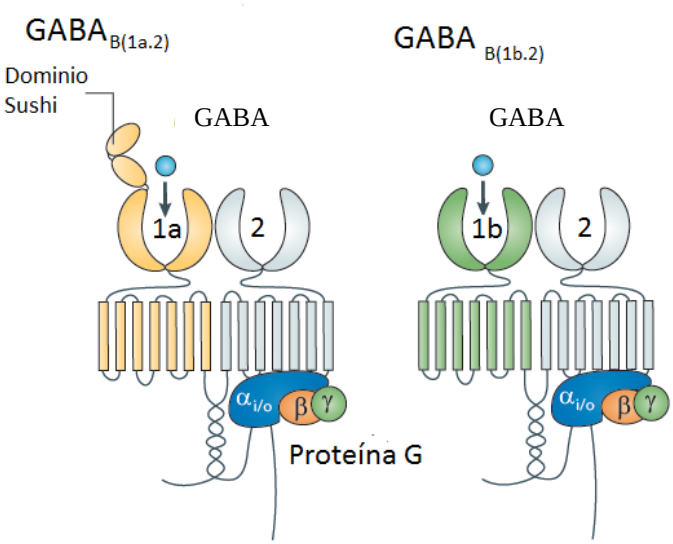

Figura 14. Se muestra la estructura del receptor $GABA_B$, sus dos subunidades acopladas, así como las dos isoformas de la subunidad $GABA_{B1}$ (Modificado de Gassmann and Bettler, 2012)

Los receptores $GABA_B$ pueden estar acoplados a $G_i\alpha$ y $G_o\alpha$.; los cuales por su localización están divididos en presinápticos y postsinápticos. Los $GABA_BR$ presinápticos están presentes tanto en terminales inhibitorias como excitatorias y funcionan como autorreceptores los cuales controlan la liberación de GABA y los heterorreceptores, que inhiben la liberación de otros neurotransmisores asociada con la inhibición de VGCCs por medio del complejo Gβγ, el cual a su vez inhibe el influjo de Ca^{2+} en la terminal, afectando la liberación de vesículas que contienen al neurotransmisor. El complejo Gβγ interactúa directamente con la proteína SNARE lo que provoca una limitación de la fusión vesicular. La liberación de $G\alpha_{i/o}$ también inhibe la fusión vesicular lo que reduce la liberación espontánea de neurotransmisor, y por consecuencia reduce la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias.

Se ha demostrado que los agonistas de $GABA_B$, por lo general inhiben hasta el 90% de la liberación de los neurotransmisores con al menos la inhibición del 50% de la actividad de los canales de calcio. Esta inhibición es modulada por la frecuencia del potencial de acción, donde una fuerte despolarización libera los canales de calcio de su inhibición mediada por Gβγ.

Los $GABA_BR$ postsinápticos mediante el complejo Gβγ, activan los canales de potasio rectificadores de entrada (GIRKs; también conocido como canales Kir3) los cuales inhiben la actividad neuronal mediante la generación de (IPSCs) que hiperpolarizan la membrana. Los receptores $GABA_B$, no solo modulan los canales iónicos mediante Gβγ, también activan e inhiben la adenil ciclasa por $G_i\alpha$ /$G_o\alpha$ y Gβγ. (figura 15). Las proteínas $G_i\alpha$ /$G_o\alpha$, inhiben a la mayoría de las isoformas de la adenil ciclasa. Inhiben las tipo I, III,V, VI, mientras que Gβγ estimula la adenil ciclasa tipo II, IV y VII, pero esta estimulación depende de la presencia de $G_S\alpha$ que resulta de la activación de GPCRs mediada por norepinefrina, isoprenalina, histamina o polipeptidos vasoactivos intestinales (Bettler et al,.2004).

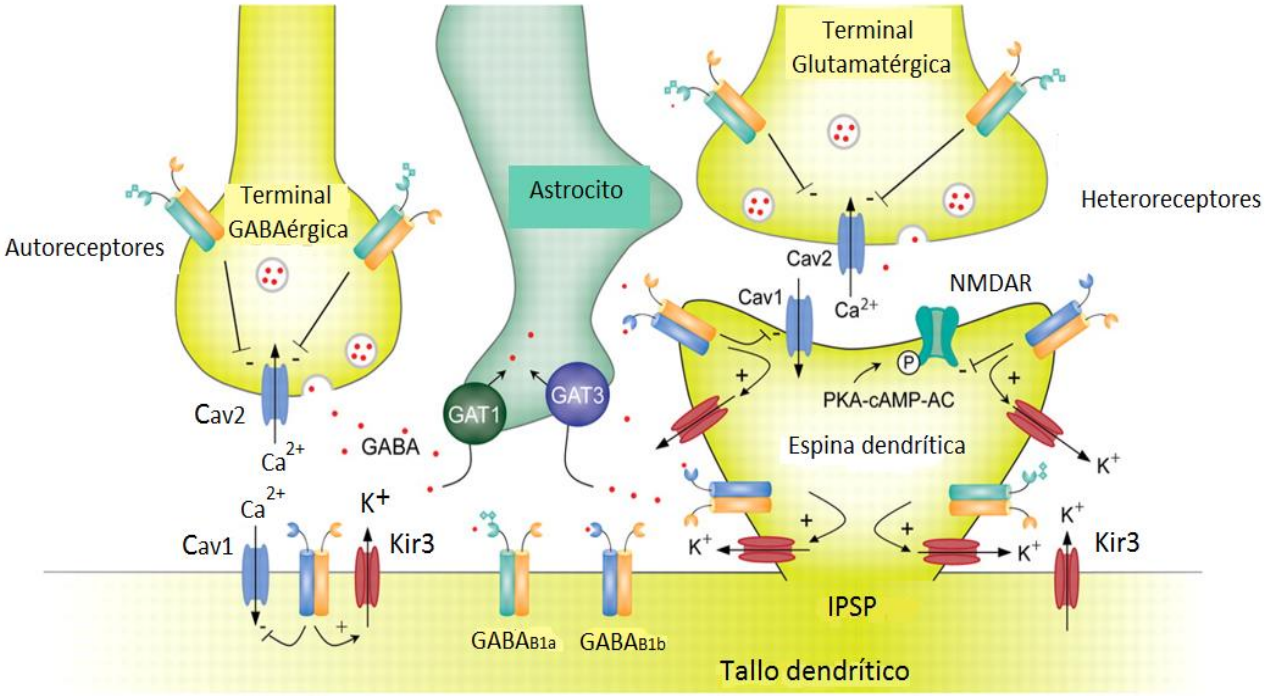

Figura 15. Se muestran las vías de señalización de los receptores $GABA_B$. Observamos el mecanismo de acción por el cual los receptores $GABA_B$ controlan la liberación de neurotransmisores. Se ilustra el mecanismo de acción por el cual la activación de los receptores $GABA_B$ generan un potencial sináptico inhibitorio. Los receptores $GABA_B$ están localizados pre, post y extrasinápticamente. Los receptores con la isoforma $GABA_{B1b}$ se encuentran situados en espinas dendríticas que están localizadas de manera opuesta a los sitios de liberación de glutamato y los receptores con la isoforma $GABA_{B1a}$ se expresan a lo largo del tallo dendrítico de células piramidales de hipocampo (Modificado de Benarroch, 2012).

Ambos receptores presinápticos y postsinápticos generan un respuesta que regula la expresión de potenciación a largo plazo (LTP), una forma de plasticidad sináptica que está implicada en procesos de memoria y aprendizaje. $GABA_BR$ influyen en este proceso mediante la reducción de la excitabilidad de la neurona postsináptica, mediante la reducción del flujo de Ca^{2+} de los receptores NMDA por medio de PKA.

Hay diversos desórdenes en el SNC en los cuales se cree que los receptores $GABA_B$ participan, como la epilepsia, espasmos, esquizofrenia, ansiedad, depresión, deficiencias cognitivas y adicción. También están implicados en la supervivencia celular, migración y la posición de las neuronas. (Xiang et al., 2002).

El receptor GABAc forma parte de la familia de Cys- loop de los canales iónicos activados por ligando. En esta familia también se incluyen el receptor nicotínico de la acetilcolina, receptores de glicina y 5-HT3. Los receptores GABAc también son canales iónicos pentaméricos que muestran una topología similar a los receptores $GABA_A$, pero estos son homoméricos.

Los receptores ionotrópicos GABAc se componen de subunidades ρ. Las ρ1, que son altamente expresadas en la retina de vertebrados, están preferentemente localizadas en células bipolares, y las ρ 2, ρ3 se encuentran en médula espinal y en la pituitaria al igual que en el SNC (Martyniuk et al., 2007). Cada subunidad consiste en un largo extremo extracelular N-terminal, cuatro dominios transmembranales (TM 1-4), un largo bucle citoplasmático entre TM3 y TM4 (donde se cree que existen sitios de acción para las proteínas kinasas necesarias para la guía subcelular y el agrupamiento a receptores) y un corto extremo C-terminal extracelular. El extremo N-terminal contiene importantes dominios para la unión del ligando y el ensamblado de las subunidades. La parte interior del poro del canal se forma por TM2 (Qian and Ripps, 2009).

Los receptores GABAc muestran distintas propiedades eléctricas comparadas con $GABA_A$. Los GABAc tienen una alta sensibilidad por GABA, su conductancia es pequeña y no se desensibilizan. Respecto a la participación de los receptores GABAc en el desarrollo no hay muchas evidencias al respecto, ya que básicamente se han estudiado en la retina de animales en estadios adultos. Sin embargo hay evidencias de un posible co-ensamblaje de la subunidad ρ1 de los GABAc con la subunidad α de los receptores $GABA_A$, dando origen a un receptor heteromérico con capacidades farmacológicas diferentes (Milligan et al., 2004). En la figura 16 se muestra un esquema del receptor GABAc (Popova 2014).

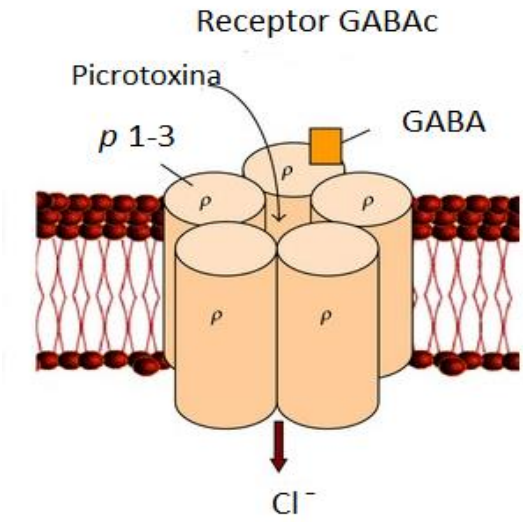

Figura 16. Estructura de los receptores GABAc. Sitios de unión para GABA localizados en la parte extracelular de la proteína. Picrotoxina bloquea el receptor uniéndose en la parte interna del poro. (Modificado de Popova 2014).

Los receptores a GABA muestran una variedad en sus propiedades farmacológicas, como se muestra en la tabla 1. El receptor $GABA_A$ consta de varios polipétidos distintos y es el lugar de acción de varios fármacos neuroactivos, como benzodiacepinas (ansiolíticos), barbitúricos (sedantes), picrotoxina y muscimol. Estas sustancias interfieren en el funcionamiento y producen un aumento de la excitabilidad cerebral hasta el punto de producir crisis convulsivas. Los receptores GABAc muestran un perfil farmacológico específico. Son insensibles a los moduladores de $GABA_A$ como los barbitúricos, las benzodiacepinas, así como a los clásicos antagonistas de $GABA_A$,(por ejemplo, bicuculina,) y además no son activados por el agonista para $GABA_B$ baclofén (Mihic et al. 1997).

FÁRMACOS	***$GABA_A$***	***$GABA_B$***	***GABAc***
Agonistas	GABA, Isoguavacina, Muscimol, THIP,TACA	GABA, Baclofén, AZD3355 SK&F97541, CGP27492 CGP47656, GHB	GABA, Muscimol, TACA, CACA, TAMP, CAMP
Antagonistas	Bicuculina Gabazina PHP 501 trifluoroacetato	Saclofén, CGP35348 CGP36742, CGP46381, CGP 51176, SCH50911, CGP36216, CGP52432, CGP54626A, CGP55845A, 3-APPA Faclofén	TPMPA, THIP, I4AA, SR95531, SKF97541, 3-APS, ZAPA sultate, CGP27492, SK&f97541 CGP36742
Moduladores	Barbitúricos, Benzodiazepinas, Esteroides	CGP7930 CGP13501 GS39783, NVP-BHF177, CMPPE, COR628, COR627,ADX71441, ADX71943	Zn^{2+} , La^{3+}
Bloqueadores del canal a Cl^-	Picrotoxina, Zn^{2+}, TBPS		Picotroxina, TBPS

Tabla 1. Comparación farmacológica de los receptores a GABA. 3-APPA:ácido 3- aminopropil fosfinico; 3-3-amino-1-ácido propanosulfonico; CACA: ácido 4-cis-aminocrotonico; CAMP: (±)-cis-2-ácido aminometilciclopropanocarboxilico; CGP13501: 3,5-bis (1,1-dimetil)-4-hidroxi-a,a-dimetilbenzenepropanal; CGP27492: ácido 3- aminopropil fosfonico; CGP 36742 ácido fosfinico 3-aminopropiln-butil; CGP7930: 3,5-bis (1,1-dimetiletil)-4-hidroxi-b,b-dimetil benzenepropanol; GABA: ácido γ-aminobutirico; I4AA: ácido acético-4-imidazol; La3+: lantano; SKF97541: ácido 3- aminopropil(metil)fosfinico; SR95531: (3-carboxipropil)-3-amino-6 metoxifenil-piridazinium bromuro; TACA: trans 4-ácido amonocrotonico; TAMP: (±)-trans-2-ácido aminometilciclopropanocarboxilico; TBPS: t-butil-biciclo_fosforotionato; THIP: 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo [5,4-c] piridin-3-ol; TPMPA: 1,2,5,6-ácido tetrahidropiridina-4-metilfosfinico;ZAPA: Z-3-[(aminoiminometil)tio]propil-2-ácido enoico); Zn2+:zinc. (Ayad et al., 2013; Borman and Feigenspan, 1995; Castelli et al., 2012; Froestl, 2010; Kalinichev et al 2014; Macdonald and Olsen, 1994; Malherbe et al., 2008; Perdona et al., 2011; Urwyler et al., 2001; Urwyler et al.,2003: Guery et al., 2007)

Acción de GABA en el neurodesarrollo

GABA es un neurotransmisor inhibitorio en el SNC en la etapa adulta, sin embargo, en la etapa de desarrollo el rol de GABA es excitatorio. Se destaca su importancia en que es el primer neurotransmisor en volverse funcional en el desarrollo de redes neuronales y provee la fuerza excitatoria inicial. Durante el desarrollo del cerebro los receptores acoplados a ligando son operables antes de la formación sináptica, lo que sugiere que su función no está restringida a la transmisión sináptica. Los precursores celulares y las neuronas en proceso de maduración expresan receptores a GABA funcionales, los cuales pueden actuar como sensores que detectan GABA extracelular, el cual es liberado por neuronas migratorias, pioneras, conos en crecimiento y ocasionalmente por glía. Por lo tanto GABA provee un gran ejemplo de las múltiples formas y acciones que una molécula puede ejercer en diferentes estados de desarrollo.

GABA, actuando mediante sus receptores ionotrópicos provee un efecto excitatorio en el desarrollo. Por lo tanto, en neuronas en desarrollo, al activar los receptores $GABA_A$ resultará en una despolarización. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, son activados cuando el potencial de membrana se despolariza, lo que con lleva a un aumento en el calcio intracelular. El Ca^{2+} intracelular es crucial para distintas vías de señalización. El que GABA module el incremento de Ca^{2+}, se puede observar en la mayoría de las neuronas en desarrollo, en varias partes del cerebro, incluyendo hipocampo, hipotálamo, corteza, estriado, bulbo olfatorio, medula espinal (Obrietan and Van den Pol 1995).

GABA también actúa a través de receptores $GABA_B$, los cuales pueden mostrar una gran expresión durante el desarrollo que en el cerebro adulto (Turgeon and Albin 1994). No obstante hay estudios que sugieren que los receptores $GABA_B$, al menos en la postsinapsis, poseen una leve acción relativamente, en varias áreas del cerebro en desarrollo. Mediante Hibridación in situ y estudios inmunohistoquímicos se ha definido un patrón temprano de expresión de $GABA_{B1}$ durante el desarrollo embrionario el ARNm, para $GABA_{B1}$ es altamente expresado en E11 y E12. $GABA_{B1}$ posee dos isoformas, $GABA_{B1a}$ y $GABA_{B1b}$,

siendo la última más abundante en el cerebro adulto y $GABA_{B1a}$ domina en edades más tempranas. Por lo tanto las dos subunidades del receptor $GABA_B$ no están coordinadas durante el desarrollo, a pesar de que un receptor $GABA_B$ funcional requiere la heterodimerización de las dos subunidades (Martin et al., 2004). Por otro lado, respecto a $GABA_B$, se ha visto implicado en el desarrollo de algunas vías neuronales. Por ejemplo, las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ están presentes en el neocortex de rata desde E14, sugiriendo que $GABA_B$Rs son funcionales durante el desarrollo prenatal (Lopez-Bendito et al., 2002).

La contribución de los receptores $GABA_B$ en el neurodesarrollo debe ser inducido por GABA ambiental. GABA es liberado por los conos en crecimiento (Taylor and Gordon-weeks, 1991: Gao and Van den Pol, 2000) o por una actividad paracrina que no tiene que ver con la liberación de vesículas (Demarque et al., 2002), lo que resulta en una fuente local y endógena de GABA. Cuando las sinapsis GABAérgicas están establecidas, GABA se debe difundir para activar receptores $GABA_B$ extrasinápticos o perisinápticos. Las respuestas mediadas por $GABA_B$ son inducidas cuando una población de interneuronas están activadas sincrónicamente, o son facilitadas cuando los transportadores de GABA están bloqueados, (Dutar and Nicoll, 1988; Thompson and Gahwiler, 1992b; Isaacson and Nicoll, 1993; Scanziani, 2000) es decir, el mecanismo de recaptura de GABA está en un estado inmaduro. Estos mecanismos promueven un excedente de GABA y la activación de los receptores $GABA_B$ en el desarrollo del cerebro.

Ha sido reportada la participación de los receptores $GABA_B$ en modular la migración o movilidad de las neuronas inmaduras de la médula espinal, hipotalámicas y oligodendrocitos. Sin embargo la mayor contribución se ha evidenciado en estudios de la corteza en la zona ventricular, donde los dos tipos de migraciones radial y tangencial son moduladas por los receptores $GABA_B$ (Behar et al., 2001; López-Bendito et al., 2003; Bony et al., 2013). Por otra parte la activación de los receptores $GABA_B$ podría servir como señal de crecimiento y de guía al participar en la construcción de redes neuronales e incluso regulando la sinaptogénesis (Chattopadhyaya et al., 2007).

Se ha observado que la activación de los receptores $GABA_B$ postsinápticos decrementa el influjo de Ca^{2+} mediado por $GABA_A$. El receptor $GABA_A$ puede alterar el crecimiento de conos y la extensión de neuritas debido al incremento de Ca^{2+} intracelular, por lo tanto $GABA_B$ puede jugar un rol en la formación de las conexiones sinápticas (Obrietan and Van den Pol, 1998).

La despolarización de neuronas inmaduras durante el periodo de su desarrollo morfológico y la sinaptogénesis, representa un mecanismo de señalización fundamental para la regulación del desarrollo neuronal y el ensamblaje de circuitos (Akerman and Cline 2007), por lo que tiene una gran participación en eventos como la proliferación, migración neuronal y formación de sinapsis (Represa, 2005).

Lo que ocasiona que GABA, siendo el principal neurotransmisor inhibidor en el SNC se comporte como excitador en etapas en desarrollo del SNC, lo que está fundamentado en la gran permeabilidad a Cl^- que posee la membrana en etapas de desarrollo. La importancia de las variaciones de las concentraciones extracelulares e intracelulares de Cl^- permite el equilibrio para mantener procesos celulares como la regulación del volumen celular, cambios en el pH tanto en compartimientos externos e internos y sus efectos sobre excitabilidad celular. A partir de 1980 se dedujo que la concentración intracelular del cloro difiere entre tipos celulares, y que esto depende de la actividad de los transportadores de Cl^- (Eckhard et al., 2011). Respecto a la gran variedad de transportadores de Cl^-, la mayoría de los CCC (cotransportadores de cationes-cloro) se expresan en neuronas o en células gliales, con excepción de NKCC2 y NCC que son específicos para riñón. En neurociencia, los cotransportadores de mayor interés son NKCC1, KCC2 y KCC3. NKCC1 está altamente expresado en neuronas del cerebro en desarrollo, KCC2 tiene una mayor expresión en células maduras y es una isoforma específica en neuronas (Payne et al., 1996) y KCC3 se expresa en SNC y en otros tejidos (Mount et al., 1999).

Los cambios de concentración se deben por la expresión de dos cotransportadores. La expresión del cotransportador 1 (NKCC1), que se

encarga de incrementar la concentración interna de cloro, es predominante en neuronas inmaduras (figura 17). El cotransportador KCC2, por el contrario, mantiene bajos los niveles de Cl^-, por lo tanto su expresión es mayor en neuronas maduras (Li et al, 2008).

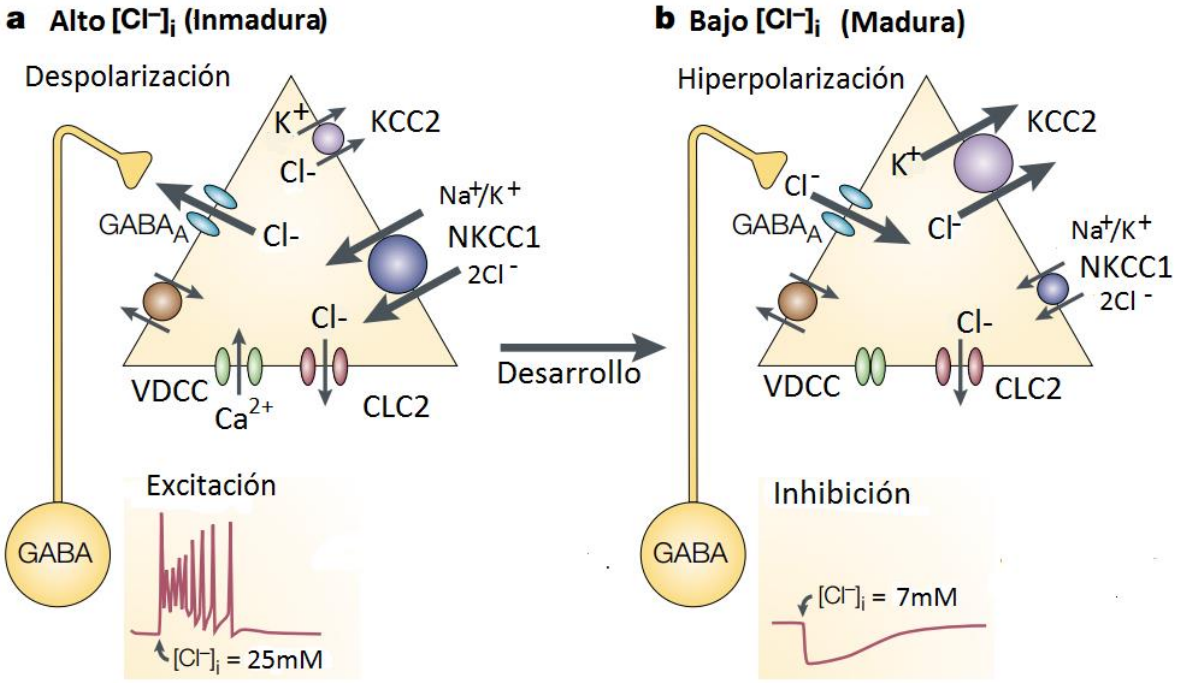

Figura 17. Se muestra el mecanismo de despolarización e hiperpolarización de GABA según su estado. En a), las altas concentraciones de Cl^- en neuronas inmaduras provocadas por una alta expresión en NKCC1, provocará despolarización que con lleva a la apertura de VDCC. En b) sucede lo contrario, una hiperpolarización provocada por la baja concentración de Cl- en consecuencia de la alta expresión de KCC2 (Tomado de Ben Ari . 2002).

NKCC1 y KCC2 usualmente coexisten en la misma neurona, y cuando ambos transportadores están simultáneamente activos $[Cl^-]_i$ puede variar entre 65mM y 3.8 mM dependiendo de que cotrasnportador domine. Cuando E_{Cl}> Vm, la activación de los receptores a GABA (en su mayoría acoplados a canales de Cl^-), con lleva a un fuerte eflujo de Cl^- y por lo tanto a una despolarización, que ocasionaría que el potencial de equilibrio para el cloro se volviera más negativo que el umbral de disparo y desencadenar un potencial de acción mediado por Na^+, activar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y actuar en sinergismo con los receptores a NMDA removiendo su bloqueo dependiente de Mg^{2+} (Eccles, 1964; Marty and Llano, 2005).

Se confirmó la presencia del cotransportador NKCC1 en la parte basolateral de las membranas de las células oscuras del sistema vestibular y en las células marginales de la stria vascularis en la cóclea. Su función específica en esta localización es la recirculación de iones K^+ a la endolinfa. Así mismo la expresión de Na^+,K^+-ATPasa en las células marginales y en las células oscuras vestibulares provee un mecanismo para mantener los altos niveles intracelulares de K^+ por difusión hacia la endolinfa por medio de canales de K^+ localizados en la parte apical de las células. Por lo tanto, al estar ausente NKCC1 con lleva a una impropia composición iónica en la endolinfa, un colapso en el potencial endococlear y fallos en el influjo de K^+ a la células ciliadas. (Crouch et al. 1997).

Respecto a la farmacología de los cotransportadores, la bumetanida tiene mayor afinidad por NKCC1, y su efecto es la inhibición del cotransportador. La furosemida llega a inhibir a NKCC1 y a KCC2, pero también tiene efectos de inhibición sobre los receptores NMDA y $GABA_A$ (Russel 2000).

Antecedentes de la presencia de GABA en el sistema vestibular.

Autor	Año	Estudio	Preparación
Flock y Lam	1974	Inhibición de respuestas espontaneas y evocadas por picrotoxina	Laberinto de la mantarraya
Feliz y Ehrenberg	1982	Acción excitatoria de GABA y su bloqueo por bicuculina y picrotoxina	Mácula sacular del gato
Meza y cols	1982	Demostró la síntesis de GABA	Cresta vestibular del pollo
Bartheld y Rubel	1989	Inmunorreactividad transitoria de GABA durante el desarrollo embrionario del pollo	Órganos vestibulares
Usami y cols	1989	Localización inmnocitoquímica de GABA-T	Ganglio de Scarpa, células ciliadas y aferentes en cáliz en el pollo y en cobayo
Didier y cols	1990	Inmunorreactividad para GABA en cresta ampular, utrículo, sáculo y terminal nerviosa en cáliz	Vestíbulo de cobayo
Lapeyre y cols	1993	Modulación por GABA de conductancias iónicas. Efectos mimetizados por baclofén	Células ciliadas tipo I del canal semicircular del cobayo
Kitahara y cols	1994	Presencia de las subunidades γ1 yγ2	Vestíbulo de rata
Foster y cols.	1995	Identifican por estudios inmunohistoquímicos las subunidades β2 yβ3 del receptor GABAA	Células ciliadas tipo I y aferentes en forma de cáliz en el hámster y en ratón
Meza G.	1997	Estudios inmunoblot confirman la presencia de dos isoformas de GAD, 54 y 67 kDa	Homogenados de órganos vestibulares de rata
Rezaee y cols	1997	Identifican las subunidades α, β, γ, de los GABAAR por biología molecular	Órganos vestibulares del cobayo
Holstein y cols	2004	Acción inhibidora del antagonista CGP55845 para receptores GABAB	Cresta ampular del pez sapo
Holstein y cols	2004	Localización inmunocitoquímica de GABA en células ciliadas	Cresta ampular del pez sapo
Cortes y cols	2013	Efecto excitador de GABA sobre las aferentes vestibulares	Vestíbulo del pollo embrionario y postnatal

Antecedentes del efecto excitador de GABA en el sistema vestibular del pollo durante el desarrollo embrionario

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que GABA es capaz de provocar un aumento en la frecuencia de descarga basal aferente vestibular durante el desarrollo embrionario, que es dependiente e inversamente proporcional a la edad del pollo (figura 18). Por lo cual el mayor efecto se observó en edades tempranas del desarrollo, es decir, E15 y E17. El efecto va disminuyendo conforme el embrión se acerca a la eclosión y posnatal temprano. Los resultados indicaron que el posible efecto excitador en la descarga basal aferente vestibular provocado por la aplicación de GABA se debe a cambios en el gradiente de concentración de Cl^- durante el desarrollo. Se demostró por primera vez que la respuesta provocada por GABA disminuye conforme se avanza en el desarrollo embrionario y postnatal temprano. Se sugiere que GABA tiene una acción presináptica como neuromodulador, facilitando la actividad espontánea y la liberación de glutamato en la sinapsis aferente vestibular.

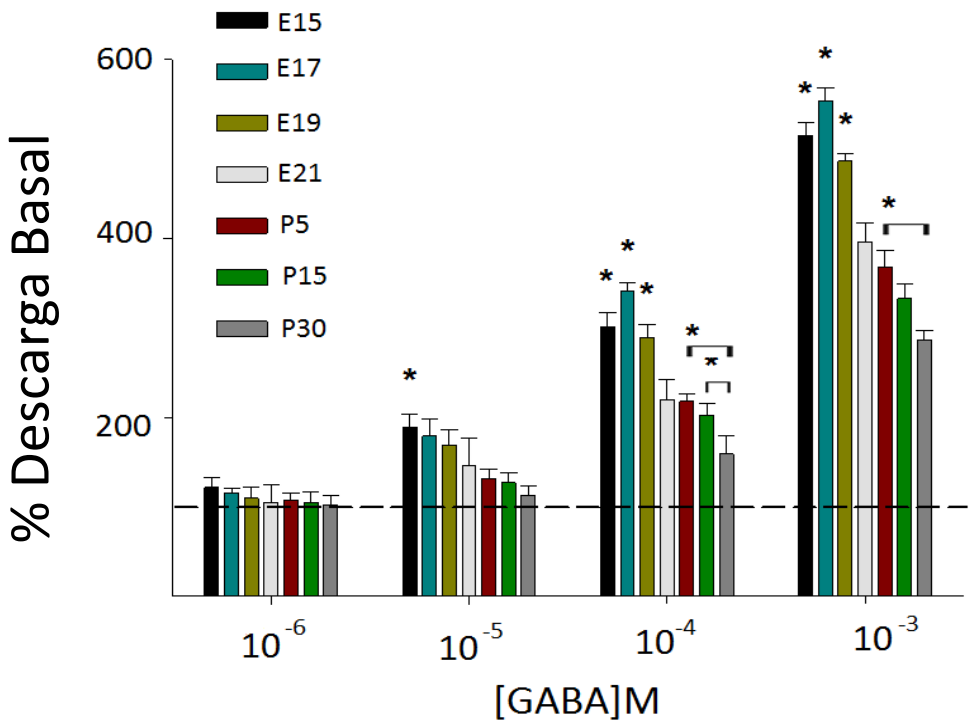

Figura. 18.- Curva dosis- efecto-edad de GABA en pollos de edad embrionaria y posnatal temprano (n=133). Cada barra representa al menos 5 experimentos. Se observa que el incremento en la frecuencia de descarga basal de la aferente vestibular es dependiente de la concentración en la cual GABA es administrado por microperfusión y de la edad del pollo. La línea punteada indica el 100% de la descarga basal. El asterisco indica diferencia significativa (*P<0.05) (Trabajo realizado por Cortes C, 2006, 2013)

Justificación

Hay evidencia del posible rol excitatorio de GABA en la transmisión sináptica del sistema vestibular. Este posible mecanismo de acción se puede deber a cambios en el gradiente de concentración de Cl^-. La acción de GABA a nivel presináptico, es decir, en las células ciliadas, tiene un rol importante en la regulación de liberación de glutamato. Esto indica que GABA podría actuar como un facilitador de la descarga basal de las aferentes vestibulares durante el desarrollo embrionario del pollo.

Sin embargo, no se puede descartar la posible participación de $GABA_B$ en la periferia vestibular. En el laboratorio de neurobiología del Instituto de Fisiología de la BUAP, se tienen antecedentes que muestran la presencia del receptor $GABA_B$ en el desarrollo embrionario (E17) del sistema vestibular del pollo. Se determinó el ARNm correspondiente para la subunidad $GABA_{B1}$, por medio de la técnica de RT-PCR en la periferia vestibular del pollo, no obstante no se ha evaluado su participación funcional, por lo que parece que esto nos ayudaría a conocer el papel que juega GABA en el sistema vestibular durante el desarrollo embrionario. Adicionalmente, tenemos resultados previos en los que a pesar de haberse bloqueado receptores a glutamato postsinápticos y de haber bloqueado la concentración de Cl^-, permanece un remanente a la aplicación de GABA, por lo que es factible pensar una posible participación de los receptores $GABA_B$

Hipótesis:

- GABA modula la actividad eléctrica espontánea de las aferentes vestibulares durante el desarrollo embrionario del pollo a través de receptores metabotrópicos

Objetivo general:

- Dilucidar el papel de los receptores $GABA_B$ en la descarga basal de las aferentes vestibulares durante el desarrollo embrionario del pollo.

Objetivos particulares

1. Estudiar la acción de baclofén, agonista del receptor $GABA_B$, sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares durante el desarrollo embrionario (E15, E17, E19, E21).
2. Estudiar la acción de saclofén sobre la respuesta de las aferentes vestibulares a la aplicación de baclofén en las edades E17, E19, E21 y en concentraciones relevantes que dependerán de los datos obtenidos de la curva edad dosis respuesta
3. Estudiar la acción de antagonistas glutamatérgicos para receptores NMDA (MK 801) y receptores No-NMDA (CNQX, MCPG) sobre la respuesta de las aferentes vestibulares a la aplicación de baclofén en la edad E21.
4. Corroborar los resultados farmacológicos usando la técnica RT-PCR para la determinación del ARNm para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ de receptores $GABA_B$ tanto en crestas como en ganglio vestibular en embriones E15, E17, E19, E21.

Materiales y Métodos

Modelo experimental

Se utilizaron embriones de pollo (*Gallus domesticus*) de 15, 17, 19 y 21 días de desarrollo embrionario, los cuales fueron obtenidos de la avícola ALPES (Tehuacán, Puebla). Los embriones se mantuvieron bajo control de temperatura entre 36.5° y 37.5° y humedad relativa de 60% en una incubadora BG-E33 (Instrumentos de laboratorio, México).

Solución Ringer para ave

Se empleó una solución Ringer para ave con la siguiente composición (en mM): NaCl 124; KCl 5; NaH_2PO_4 2.2; $MgSO_4$ 2; $NaHCO_3$ 26; CaCl 2; Glucosa 10; con un pH entre 7.3 y 7.4. La solución se saturó con una mezcla de gas carbógeno (O_2 al 95% y CO_2 al 5%) durante 5 minutos.

Disección

Para obtener la preparación, el embrión fue anestesiado por disminución de temperatura corporal (-12°C) durante 15 minutos. Una vez extraído del huevo, se retiraron las membranas amnióticas y coriónica; posteriormente se procedió a decapitar al animal. Una vez decapitado se realizó una incisión para retirar el maxilar inferior, se retiraron la piel y por último se extrajo la masa encefálica para disminuir la presión intracraneal.

La preparación fue colocada en una cámara de disección con solución Ringer y bajo un continuo burbujeo de gas carbógeno. La disección fue realizada bajo un microscopio estereoscópico con el fin de tener una mejor visualización del

procedimiento. Se retiró tejido, hueso y cartílago hasta llegar a las estructuras del oído interno. Una vez identificado el hueso que cubre el ámpula posterior, se procedió a descubrirla junta con su rama nerviosa, para después cortarlo a nivel del tallo cerebral. A continuación se separó la cápsula ótica del resto del cráneo y se colocó en una cámara de registro donde se detalló la disección mientras estuvo sometida a un continuo flujo de solución Ringer a una temperatura de 37°C mediante un controlador de temperatura (CIDES/technologies) y gas carbógeno. Todo el procedimiento desde la decapitación hasta la colocación de la cápsula ótica en la cámara de registro se llevó a cabo en un tiempo máximo de 15 minutos.

Registro extracelular multiunitario

Para el registro de la actividad eléctrica de las aferentes del nervio del ámpula posterior se empleó un electrodo de succión, controlado por medio de un micromanipulador para ubicarlo sobre el nervio y ejercer presión negativa para succionarlo. El electrodo fue conectado a un amplificador AC (P-511, Grass), a un osciloscopio (Tektronix) y a un discriminador de ventana (WPI). Las respuestas de las fibras aferentes del nervio ante distintas drogas y su actividad basal fueron capturadas en línea mediante el programa Infing (Soto y Vega, 1987) y almacenadas en una computadora para su posterior análisis.

Ensayo de expresión génica

El ensayo de expresión génica se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa de los transcritos expresados mediante análisis de RT-PCR.

Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total de muestras de crestas y ganglios vestibulares de embriones de pollo de E15, E17, E19 y E21, empleando el kit

comercial ZR RNA MiniPrep de la empresa Zymo Research. Una vez concluida la extracción, se evaluó la concentración y calidad del ARN obtenido por espectrofotometría. Los parámetros a considerar fueron para la calidad del ARN, un cociente 260/280 mayor a 1.6 y la concentración mayor a 100µg/ml.

a) Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción inversa (por sus siglas en inglés, RT-PCR)

Para la síntesis de la primera cadena de ADN (ADNc) se empleó el kit comercial "*High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)"*, siguiendo las indicaciones del fabricante, se elaboró un mix "master" para tubos de reacción con un volumen final de 20 µL

Reactivo	**µL**
Buffer RT	2
dNTP´s	0.8
Iniciadores aleatorios	2
Transcriptasa reversa (MuL)	1
Volumen	5.8

El volumen restante (14.2 µL) fue completado con el ARN de la muestra más agua, calculando una concentración de 2µg por tubo de reacción.

Los tubos de reacción se colocaron en un termociclador "*Mastercycler gradiente (Eppendorf)",* para someterlos al siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 minutos a 87°C, finalmente la temperatura de los tubos se redujo a 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

El ADNc obtenido se amplificó mediante PCR en modalidad semi-cuantitativa, con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) que codifican para diferentes subunidades del receptor $GABA_B$.

Empleando el kit comercial *"Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)"*, se prepararon tubos de reacción con un volumen final de 20 µL.

REACTIVO	**µL**
Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)	10
Oligonucleótido Forward	1
Oligonucleótido Reverse	1
Agua	6
ADNc	2
Volume final	20

El protocolo de PCR constó de tres fases: a) desnaturalización del ADNc, en esta etapa las muestras se calentaron hasta una temperatura de 94°C durante 30 segundos; b) alineación, la temperatura descendió durante 30 segundos hasta la temperatura promedio de alineamiento requerida por cada par de oligonucleótidos; y c) extensión, la temperatura alcanzó los 72°C por un minuto para permitir que la enzima Taq polimerasa se uniera a cada iniciador y así, sintetizar 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 fueron diseñados mediante el software proporcionado por la empresa *IDT-DNA Technology*.

Oligo Name		**Secuencia (5´-3´)**	**Tm**
$GABA_{B1}$	Fwd	ATCGTCTGCTGGATGGTTATG	64
	Rev	CTCAGGGTGGTCATTGTTAGG	
GABA-B2	Fwd	CAACAAGGAGGCTGGGAAATA	64
	Rev	CTCGCTCTGAAACCTCTCTAAAC	
ACTINA Gallus	Fwd	CGTGCTGTGTTCCCATCTATC	55.4
	Rev	CACCAGAGTCCATCACAATACC	

b) Electroforesis

Terminado el protocolo de RT-PCR, se procedió con la separación electroforética de los productos obtenidos, mediante un gel de agarosa al 1.2%.

La preparación del gel de agarosa se describe a continuación: 0.6 gr de agarosa disueltos en 50 ml de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE), la solución se calentó durante 1 minuto y medio, 4 µL de bromuro de etidio (BrEt) fueron añadidos y se gelificó por 40 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se colocaron en el gel empleando 8µL de muestra diluidos en 15µL de buffer de carga “6x DNA Loading (Thermo Scientific)”, y como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial “GeneRuler 100 bp DNA Ladder”.

La separación electroforética se realizó en buffer TAE a 65 V durante 90 minutos, finalmente, la adquisición de imágenes se realizó en un documentador de geles “ChemiDoc (Bio-Rad)”. Para la densitometría de los geles se utilizó el software Image J y Sigma Plot.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba ANOVA de dos vías. Se tomaron en cuenta la edad y la concentración del fármaco aplicado como factores independientes. Se usó una diferencia significativa de $p<.05$. Por último se realizó una prueba t-Student.

Resultados

Se registró la actividad eléctrica espontánea de las aferentes vestibulares de 203 preparaciones de pollo de la especie *Gallus domesticus* correspondientes a E15, E17, E19 y E21. Se estudió la acción del agonista baclofén ($GABA_B$) (n=105), el antagonista para el receptor $GABA_B$, saclofén (n=83) y también estudiamos la acción de los antagonistas a receptores a glutamato tipo NMDA (MK-801) y no-NMDA (MCPG, CNQX) sobre el efecto de baclofén (n=15). Todos estos experimentos se llevaron a cabo con 100 embriones de pollo. Para los ensayos de RT-PCR de las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ del receptor $GABA_B$, se emplearon un total de 90 crestas vestibulares, y 30 ganglios vestibulares para cada edad (15 embriones), E15, E17, E19 y E21, lo que significa que se usaron 60 embriones en total para esta sección experimental y se realizó en el laboratorio de endocrinología bajo el cargo del Dr. Eduardo Monjaráz Guzmán.

Efecto de ***Baclofén*** sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares:

Se estudió el efecto de baclofén, un agonista del receptor $GABA_B$, por microperfusión en un rango de concentraciones de 10^{-6}M a 10^{-3}M, en las edades E15, E17, E19 y E21 (n=105). La curva dosis-efecto-edad se muestra en la Figura 19. Se observa un incremento en la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares que es dependiente de la edad y de la concentración.

La mayor respuesta se observa en E21 en la concentración de 10^{-3}M (774 ± 54%). El efecto tras la aplicación de baclofén fue reversible por lo menos después de 20 minutos. Se observa que en E15 la acción del agonista baclofén sobre la descarga basal de las aferentes vestibulares muestra un efecto mínimo en el rango de concentraciones antes mencionados (10^{-6}M: 127 ± 8%;10^{-5}M: 136 ± 14%; 10^{-4}M: 126 ±12%; 10^{-3}M: 157 ±18%) , Las concentraciones con mayor efecto sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes vestibulares fueron 10^{-4}M y 10^{-3}M, a partir de E17 de 315 ±14% y 558 ± 48% , E19: 374±17%, 667 ±42% y E21 458±25% 774 ±54% respectivamente.

En la figura 19 se muestran una gráficas versus tiempo que muestran registros típicos extracelulares multiunitarios en diferentes edades. Puede observarse el diferente efecto que ocurre al aplicar baclofén en la concentración 10^{-3}M en diferentes edades.

Se observa que en la concentración 10^{-5}M no hay diferencia significativa en ninguna edad. Sin embargo en la concentración 10^{-4}M se observa diferencia significativa en todas las edades ($p < 0.001$). Mientras que en la concentración 10^{-3}M solo se muestra diferencia significativa entre E17 y E19 y todas las edades respecto a E15.

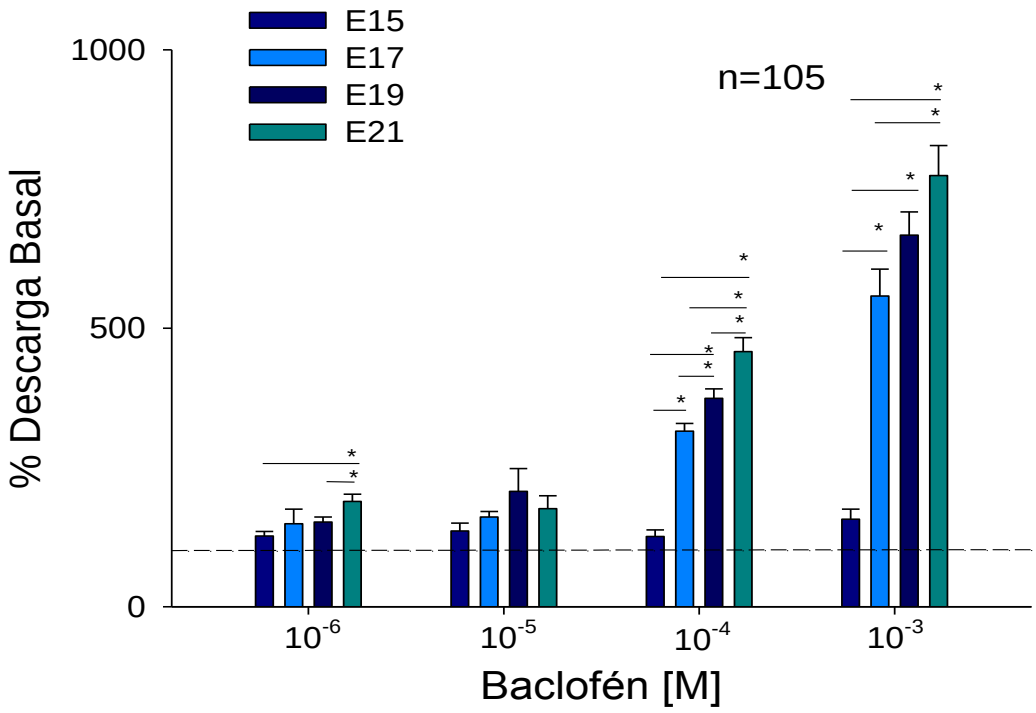

Figura 19.- Se muestra la curva dosis-efecto-edad de Baclofén (n=105). Cada barra corresponde a la media de ± SEM de por lo menos 5 experimentos. El aumento en la frecuencia de descarga basal aferente vestibular es dependiente de la concentración y edad. La línea punteada indica el 100 % de la descarga basal de las aferentes vestibulares.

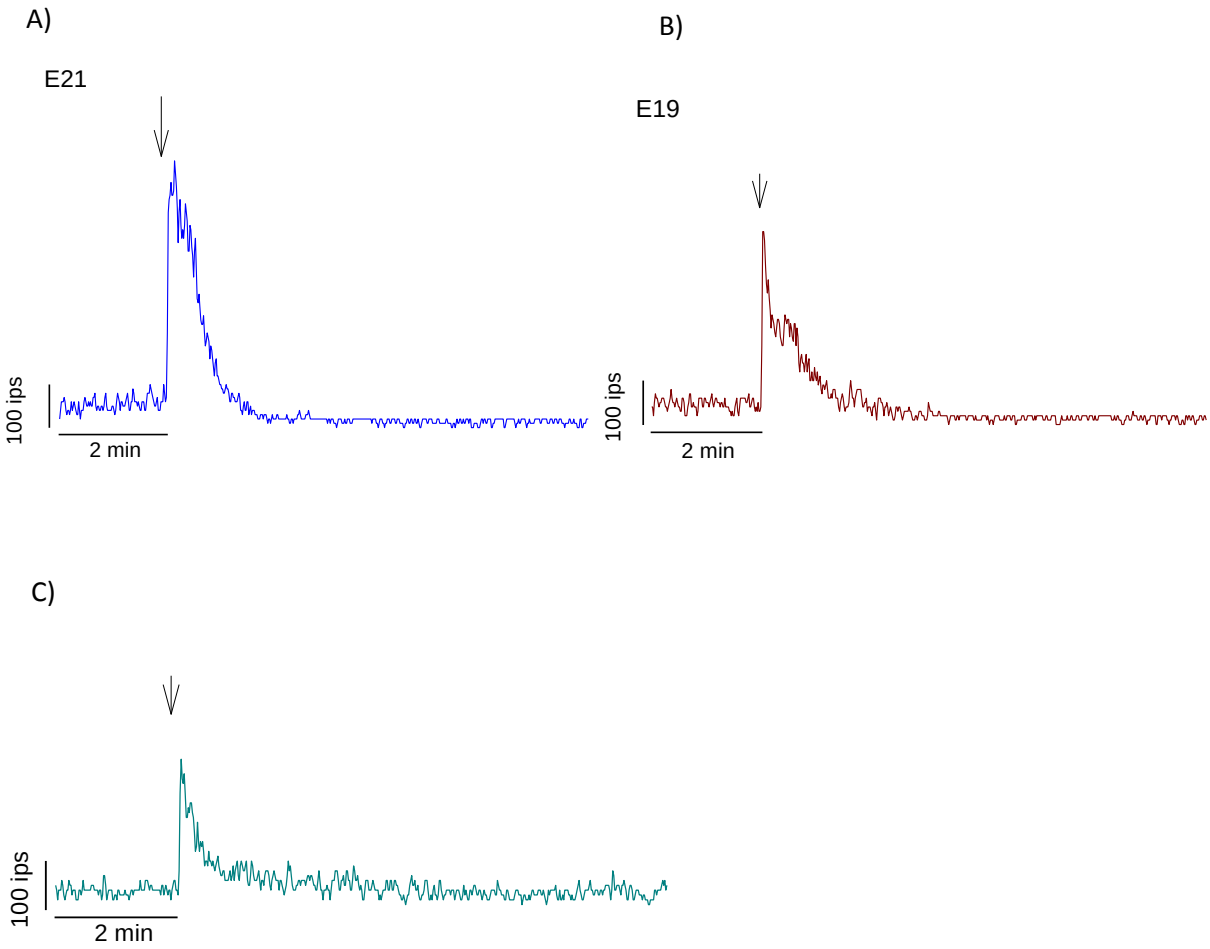

Figura 20.- Se ilustran registros extracelulares multiunitarios en embriones de diferentes edades. La duración de cada registro es de 10 min, tomando los primeros dos como control. La descarga basal aferente vestibular se mide por impulsos/segundo. La flecha indica el momento de la microperfusion de 20µl de baclofén 10^{-3}M. A) Se observa la respuesta para un embrión de 21 días, B) respuesta de un embrión de 19 días, C) respuesta de un embrión de 17 días. Se puede observar que la respuesta es

Efecto de ***saclofén*** sobre la acción de baclofén en la descarga basal de las aferentes vestibulares

La curva dosis-efecto-edad mostrada en el resultado anterior muestra un efecto significativo en las concentraciones 10^{-4}M y 10^{-3}M a partir de E17. Debido a ello se propuso estudiar el efecto de saclofén sobre la acción de baclofén

En el objetivo anterior se observa que baclofén tiene una acción excitadora a partir de E17, su efecto es mayor en las concentraciones 10^{-4}M y 10^{-3}M, por lo que se estudió el efecto de saclofén, un antagonista del receptor $GABA_B$ sobre la respuesta de las aferentes vestibulares a baclofén en este rango de edades (E17, E19, E21), empleando ambas concentraciones de baclofén. La administración de saclofén, (10^{-6}M y 10^{-5}M) fue por perfusión en el baño. Como puede observarse en la figura 21, saclofén 10^{-6}M decrementó la respuesta de las aferentes vestibulares a baclofén 10^{-4}M (n=47). En E17 se observa una respuesta de 315±14% vs 224± 44%; en E19 la respuesta fue 374±17% vs 189± 56% y en E21 fue de 458± 25% vs 347± 65%. Estadísticamente hubo diferencia significativa ($p<0.001$) solo en E17 y E19.

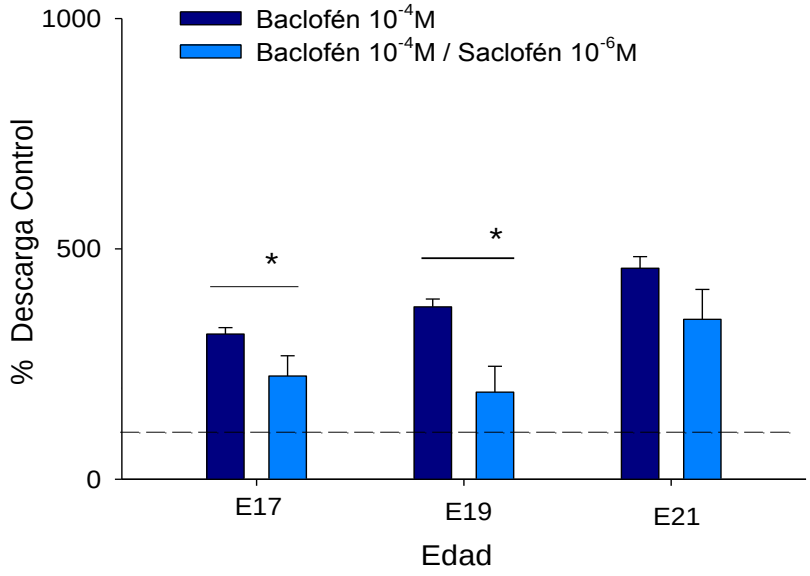

Figura 21.- Gráfica de barras que muestra el efecto de saclofén (10^{-6}M) sobre la acción de baclofén 10^{-4}M, en la actividad eléctrica basal de las aferentes vestibulares. Observándose una diferencia significativa ($p < 0.001$) en E17 y E19. Cada barra corresponde a la media de ± SEM de por lo menos 5 experimentos La línea punteada señala el 100% de la descarga basal.

En la concentración 10^{-3}M de baclofén se obtiene un incremento en la frecuencia de descarga basal de las aferentes vestibulares. Sin embargo en presencia de saclofén 10-5M se observa un decremento en el efecto excitador de baclofén (n=36). La respuesta observada fue en E17: 558 ± 48% vs 485±93%; E19: 667 ± 42% vs 367± 67% E21:774 ± 54%vs 372± 95%, como lo muestra la siguiente gráfica. Se observa una diferencia significativa ($p < 0.001$) en todas las edades respecto al control de Baclofén 10^{-4}M (figura 22).

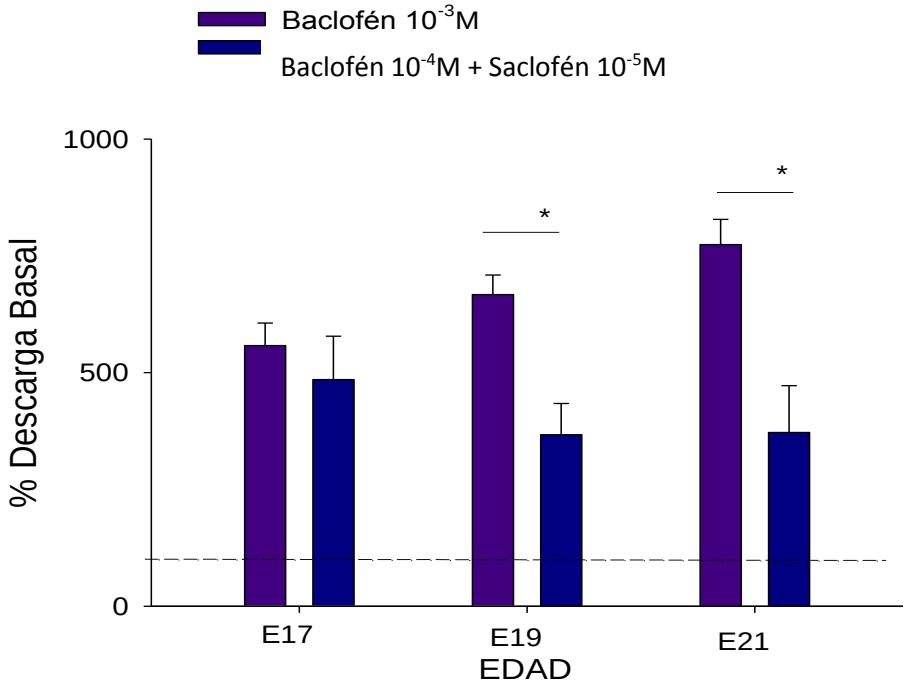

Figura 22.-Gráfica de barras que muestra el efecto de saclofén (10^{-5}M) sobre la acción de Baclofén 10^{-3}M en la descarga basal aferente; encontrándose una diferencia significativa ($p < 0.001$) en las edades E17 y E21. Cada barra corresponde a la media ± SEM de por lo menos 5 experimentos La línea punteada señala el 100% de la descarga basal.

Estudiamos también el efecto de saclofén sobre la descarga basal aferente vestibular y encontramos un decremento en dicha actividad con ambas concentraciones 10^{-6}M y 10^{-5}M, en E17, E19 y E21 (n=34). Se observó una disminución sobre la frecuencia de disparo de las aferentes vestibulares de 43% (10^{-5}M) y 29% (10^{-6}M) en E19 y de 40.6% (10^{-5}M) y 26% (10^{6}M) en E21. En E17 no se observó un cambio significativo sobre la descarga basal aferente vestibular (10^{-6}M: 5% 10^{-5}M: 10%) (Figura 23).

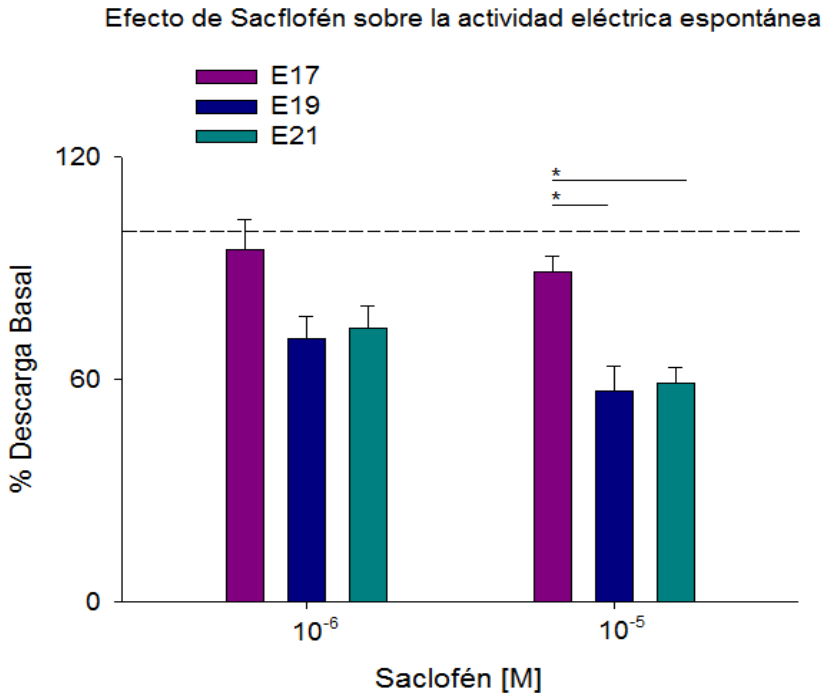

Figura 23.- Efecto del antagonista saclofén [10-^{5}]M y [10-6]M sobre la descarga basal aferente vestibular en E17, E19 y E21. Cada barra corresponde a la media ± SEM de al menos 4 experimentos. La línea punteada señala el 100% de la descarga basal.

Efecto de antagonistas glutamatérgicos de receptores NMDA (MK-801) y no-NMDA (CNQX, MCPG) sobre la acción de baclofén

De acorde al objetivo uno, es decir, la elaboración de una curva dosis- efecto-edad para probar el efecto de baclofén en un rango de concentraciones y en edades, se observó un efecto dependiente de la edad y de la concentración, mostrando un mayor incremento en E21. Por esta razón se utilizó esta edad para estudiar la interacción entre los receptores $GABA_B$ y los receptores a glutamato, principal neurotransmisor en la sinapsis aferente vestibular. Decidimos utilizar los antagonistas glutamatérgicos: MK 801, un antagonista selectivo y no competitivo para el receptor NMDA; CNQX, un antagonista para los receptores AMPA particularmente y Kainato y MCPG, un antagonista para los receptores Metabotrópicos de los Grupos I y II, para estudiar la acción conjunta de éstos sobre la respuesta a Baclofén. Los antagonistas se probaron a una concentración 10^{-5}M por perfusión en el baño, mientras que Baclofén 10^{-4}M se aplicó por microperfusión. La respuesta observada fue una disminución significativa ($p<0.001$) en el efecto excitador de baclofén de 458 ± 25% vs 190 ± 33% (n= 15), como lo muestra la siguiente gráfica (figura 24). En la figura 24 se observa el efecto de los antagonistas para receptores tipo NMDA y no-NMDA, encontrándose una disminución del 62% sobre la descarga basal aferente vestibular. Se ilustra un experimento típico bajo estas condiciones en la figura 25.

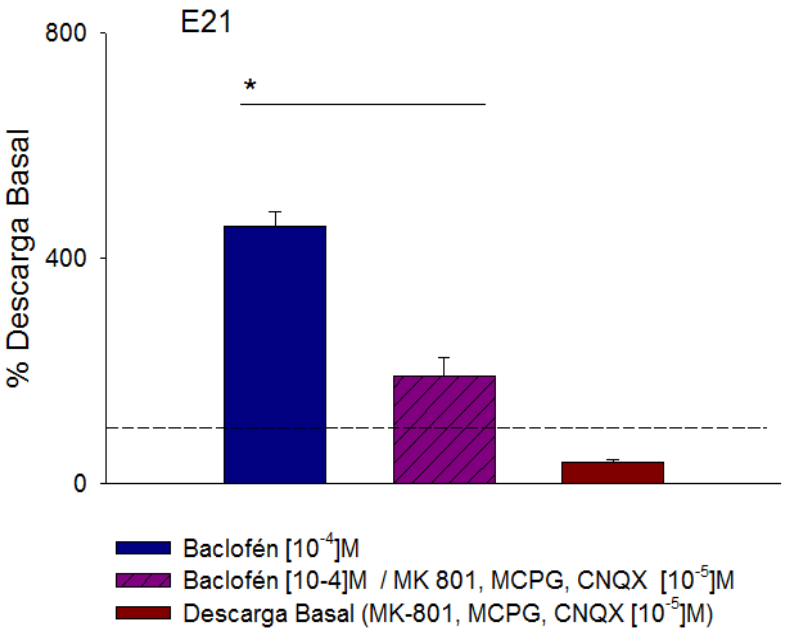

Figura 24.- Gráfica de barras que muestra un decremento en la respuesta de las aferentes vestibulares ante la aplicación de baclofén 10^{-4}M en presencia de antagonistas glutamatérgicos (barra morada). El control se muestra en la barra azul. La línea punteada indica el 100% de la descarga basal. Todos los experimentos se hicieron en E21.

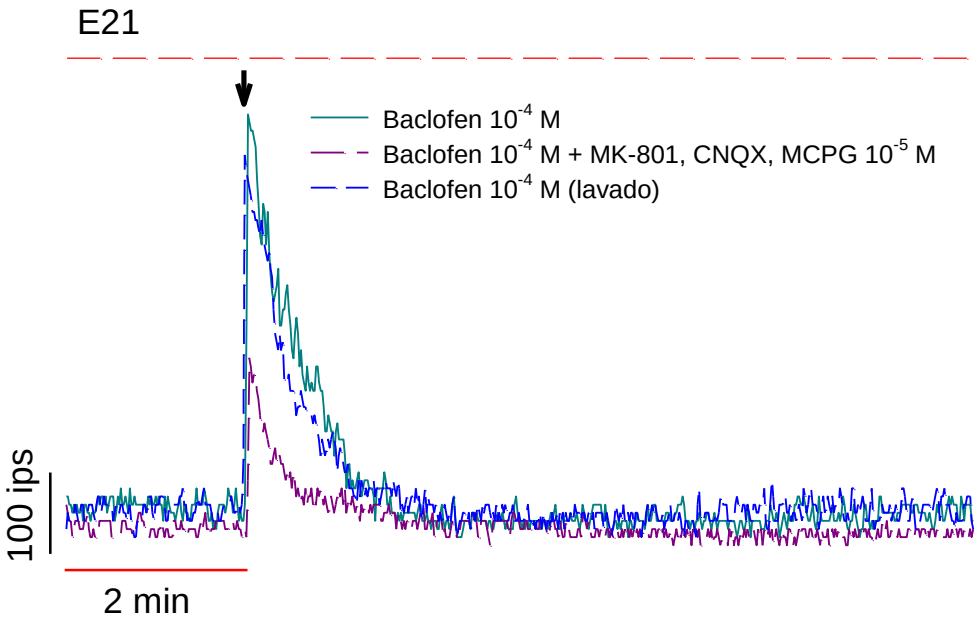

Figura 26.- Se ilustran tres registros extracelulares multiunitarios en un embrión de 21 días en diferentes condiciones experimentales. Nótese una disminución significativa del efecto de Baclofén 10^{-4}M en la presencia de antagonistas para receptores glutamatérgicos tipo NMDA y no-NMDA sobre la descarga basal. La flecha indica el momento de la microperfusión de Baclofén y la línea horizontal punteada se refiere al tiempo de perfusión de los antagonistas en el baño.

Expresión de ARNm que codifica para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ del receptor metabotrópico a GABA.

Para complementar los resultados electrofisiológicos obtenidos, se realizaron ensayos de expresión génica con el fin de evaluar el nivel de expresión del ARNm que codifica para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ del receptor $GABA_B$ presentes en cresta y ganglio de embrión de pollo para distintas edades. Definimos el curso temporal de expresión de las dos subunidades del receptor a $GABA_B$ para las edades: E15, E17, E19 y E21. Es importante mencionar que este sería el primer reporte al respecto. Ya que trabajos anteriores muestran la presencia del receptor a GABA en edades adultas y por otras técnicas experimentales.

A nivel de cresta vestibular, el ARNm para las dos subunidades está presente. Cuando realizamos el análisis densitométrico no observamos diferencias significativas en cuanto su nivel de expresión para las diferentes edades evaluadas. El ganglio por su parte, también expresa el ARNm para la subunidad $GABA_{B1}$ (E17 1.35 ± .184, E19 1.81 ± .216, E21 1.39 ± .203) y $GABA_{B2}$ (E17 1.03 ± 0.09, E19 1.12 ± 0.08, E21 1.24 ± 0.09), sin embargo y a diferencia de lo observado en cresta vestibular, aquí sí se observa un cambio gradual en su nivel de expresión en función de la edad del embrión de pollo. Se aprecia una mayor intensidad en el nivel de expresión del ARNm que codifica para la subunidad $GABA_{B2}$ (E17 1.14 ± 0.14, E19 0.93 ± 0.10, E21 1.03 ± 0.10) con respecto a $GABA_{B1}$,(E17 0.82 ± .10, E19 1.04± .06, E21 0.88 ± .05) y que ésta diferencia se acentúa conforme el embrión se acerca a las edades cercanas a la eclosión. Se observa que E21 tiene un nivel de expresión de 20% y 10% mayor a la de E17 y E19 respectivamente (Figura 24 y 25).

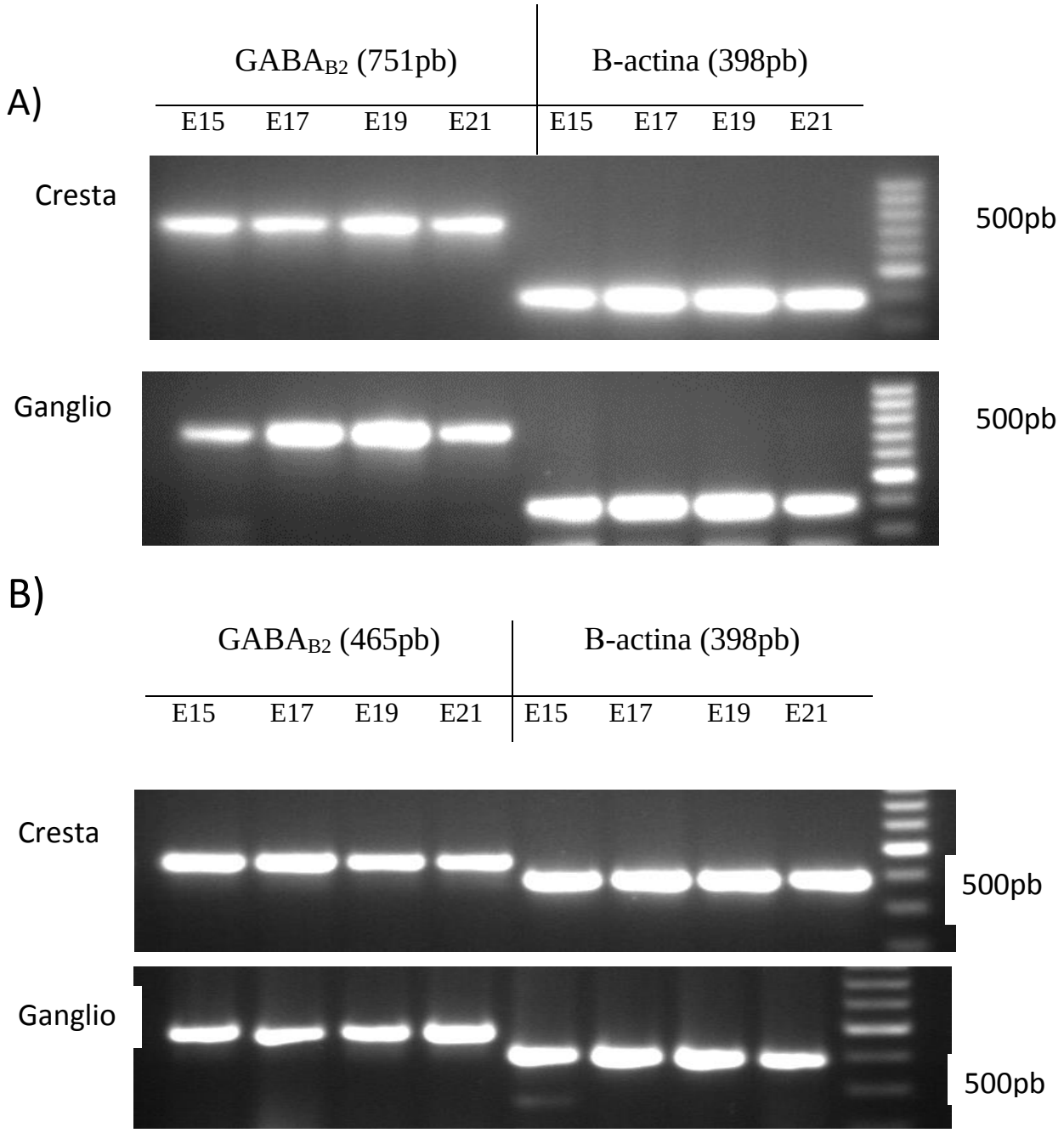

Figura (24).- A) De manera cualitativa se observa la expresión del ARNm que codifica para la subunidad $GABA_{B1}$ en cresta y ganglio vestibular en E15, E17, E19 y E21. B) de igual forma se observa la expresión del ARNm que codifica para la subunidad $GABA_{B2}$ en cresta y ganglio vestibular en las mismas edades. En todos los experimentos de RT-PCR se usó la expresión de B-actina como control. Nótese que los ensayos de RT-PCR no parecen indicar una expresión diferencial entre las edades, por el contrario se aprecia una expresión constante.

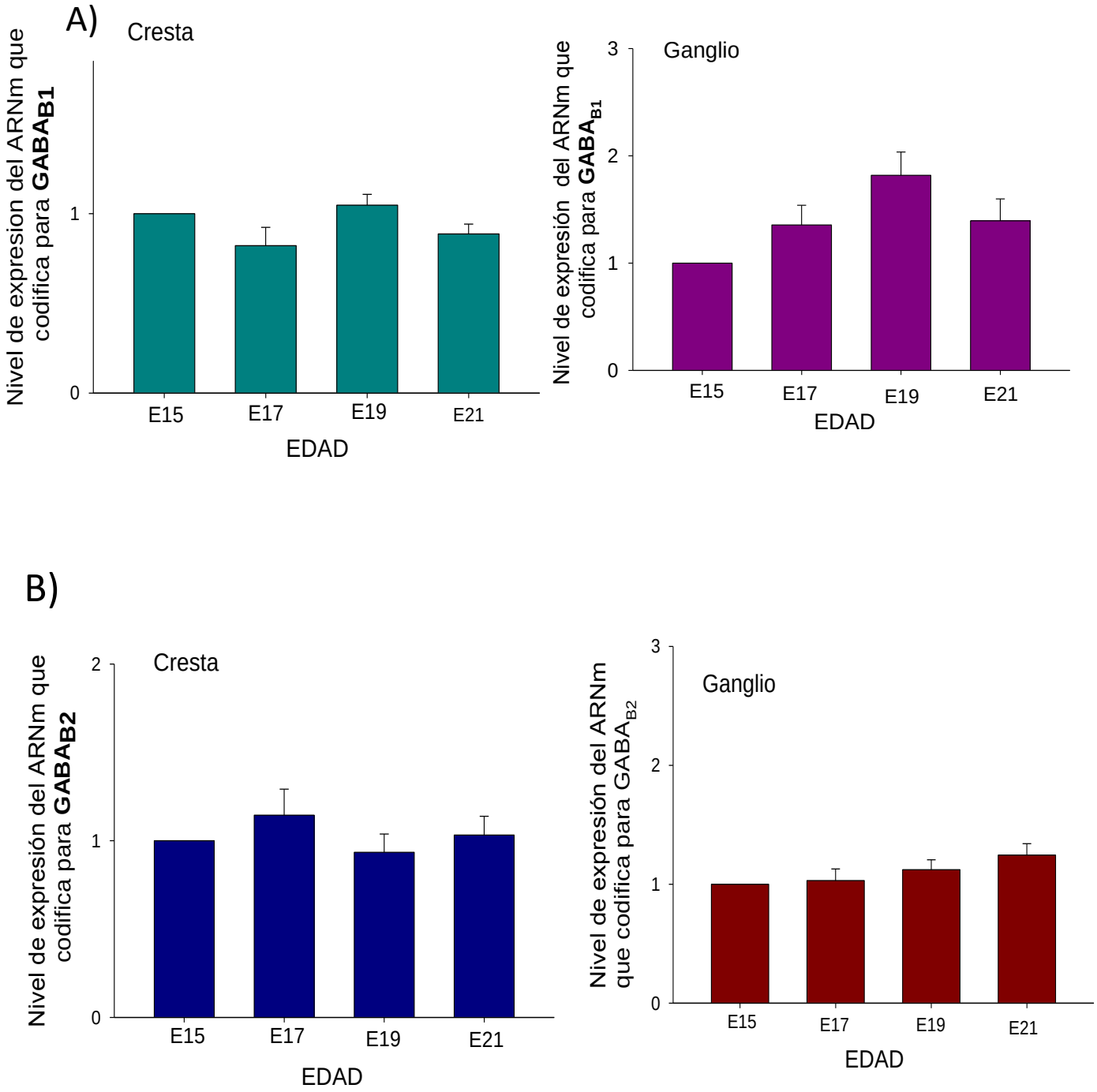

Figura 25.- A) Las gráfica muestra los niveles de expresión del ARNm que codifica para las subunidad $GABA_{B2}$ en la cresta y ganglio vestibular. Presentando una tendencia al aumento de la expresión de ARNm para la subunidad $GABA_{B1}$ en ganglio conforme la edad. No se observa diferencia significativa entre las edades. B) En el caso para el ARNm que codifica para la subunidad $GABA_{B2}$ se expresa con mayor intensidad en Ganglio que en cresta, aunque tampoco se presenta diferencia significativa para la expresión del ARNm para esta subunidad entre las edades estudiadas. En todas las gráficas se normalizó respecto a E15, n=3 para cada gráfica.

Discusión

En estudios previos en nuestro laboratorio encontramos que la respuesta a GABA mediadas por receptores $GABA_A$ están presentes con mayor magnitud en edades embrionarias tempranas como E15 y E17 (Cortes et al., 2013). Por otro lado, al estudiar las respuestas a baclofén mediadas por los receptores metabotrópicos $GABA_B$, observamos que son de mayor magnitud conforme el sistema va madurando, por lo tanto podemos suponer que se inicia una expresión funcional del receptor metabotrópico a GABA, la cual adquiere mayor fuerza en edades cercanas a la eclosión.

El único antecedente que se tiene de la participación de los receptores $GABA_B$ en el vestíbulo es el trabajo realizado por Lapeyre y colaboradores (1993) donde describieron los efectos de GABA en las propiedades electrofisiológicas de células vestibulares tipo I aisladas de crestas ampulares de cobayo. Ellos observaron que GABA induce una disminución en las corrientes de salida provocadas por la despolarización de la membrana, estas corrientes son conocidas como corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+}. Este efecto fue imitado por baclofén y no fue afectado por picrotoxina, una antagonista para $GABA_A$. Lo que indicaría que la participación de los receptores $GABA_B$ en la sinapsis aferente vestibular tendría una actividad neuromoduladora. Esta actividad neuromoduladora la propone de igual forma Foster y colaboradores (1995) en su estudio al tratar de interpretar el rol de GABA en órganos vestibulares. Donde propone que el receptor $GABA_B$ funcionaría como un autorreceptor con actividad neuromoduladora localizado en las células ciliadas. Sin embargo, no se descarta su participación en la postsinapsis e incluso como receptores extrasinápticos activados por GABA liberados desde terminales eferentes, y de esta forma modular la actividad de respuesta de las terminales aferentes vestibulares. Esta posible participación de los receptores extrasinápticos en modular la actividad aferente vestibular a través de su participación en la neurotransmisión eferente se ha observado en el sistema auditivo, en cóclea. Basados en el entendimiento del circuito neuronal coclear, receptores $GABA_B$ en la sinapsis entre terminales aferentes y células ciliadas

internas pueden responder postsinapticamente a GABA liberado por las terminales eferentes OC (Maison et al., 2008).

GABA actúa clásicamente como un neurotransmisor inhibidor en la comunicación sináptica y puede tener una función importante en el desarrollo, siendo capaz de modular los pasos claves en la formación de redes neuronales como la migración, sobrevivencia celular, formación y maduración sináptica (Owens and Kriegstein, 2002; Ben Ari et al., 2007; Sernagor et al., 2010). Hasta al momento se ha dado un mayor papel al receptor ionotrópico de GABA en aspectos tróficos, esto debido a que en el desarrollo el receptor $GABA_A$ acoplado a un canal de cloro, al ser activado induce una despolarización en la membrana que aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular (Owens and Kriegstein 2002). Como se ha mencionado anteriormente, este cambio en la respuesta del receptor $GABA_A$ resulta por el aumento de Cl^- intracelular durante el desarrollo provocado por una alta expresión del co-transportador NKCC1. Conforme se avanza en las etapas de desarrollo, hay un cambio en la expresión de este co-transportador NKCC1, y aumenta la expresión del co-transportador KCC2, el cual extrae el cloro de las células (Rivera et al., 1999). No obstante, hay evidencia que la activación del receptor metabotrópico $GABA_B$ promueven la migración celular, diferenciación, y la sinaptogénesis, por ello es importante cuestionar el papel de $GABA_B$ durante la ontogenia en el sistema vestibular.

Durante la maduración del sistema nervioso, se han consolidado distintos mecanismos en los cuales hay una participación secuencial de distintos receptores. Uno de estos sinergismos es el sugerido por Ben Ari en 1997; en el cual explica que el receptor NMDA es el primero en ser funcional en la transmisión glutamatérgica. Sin embargo estos receptores presentan un bloqueo por Mg^{2+}, que en estados maduros es desactivado por las despolarizaciones producidas por los receptores AMPA. No obstante el sistema GABAérgico antecede al glutamatérgico, y con ello GABA, el principal neurotransmisor inhibidor en el SNC maduro actúa como un excitador en el desarrollo a través de su receptor ionotrópico $GABA_A$ debido a un mecanismo dependiente de la concentración intracelular de Cl^- ya antes mencionado. La activación del receptor $GABA_A$ facilita el desbloqueo por Mg^{2+} del receptor

NMDA, llevando a cabo el rol del receptor AMPA en estados maduros. De esta forma donde el sistema glutamatérgicos esta pobremente desarrollado, GABA provee el estímulo para incrementar el $[Ca^{2+}]i$ y llevar a cabo eventos donde la excitación es parte importante de periodos críticos en el desarrollo; sin embargo, una vez que las sinapsis van madurando se requiere un periodo de control para evitar la excitoxicidad provocada por intensas despolarizaciones. Este control es guiado por el receptor $GABA_A$ una vez en su rol de inhibidor y por el receptor $GABA_B$ (Ben Ari Y et al., 1997) La activación del receptor $GABA_B$ en neuronas maduras y en desarrollo causa la hiperpolarización de la membrana y una disminución en $[Ca^{2+}]i$. Lo que con lleva a que la activación de este receptor en neuronas inmaduras produce la inhibición del incremento del $[Ca^{2+}]i$ (Obrietan K and Van den Pol A. 1998). Sin embargo $GABA_BR$ puede ejercer un efecto opuesto. La activación de $GABA_BR$ potencia el incremento de $[Ca^{2+}]i$ provocado por la activación de mGluR I (Hirono et al 2001). No obstante, nosotros observamos un incremento en la frecuencia de descarga basal de las aferentes vestibulares ante la aplicación de baclofén, sin embargo no podríamos atribuir el incremento en la frecuencia de descarga basal en la aferente vestibular provocada por la activación del receptor metabotrópico $GABA_B$, a un mecanismo que depende de las concentraciones de Cl- intracelular como lo hace $GABA_A$. Debido a que $GABA_B$ pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Por ello para entender el efecto observado en nuestro estudio, nos basamos en ciertos modelos reportados en diferentes regiones cerebrales que podrían explicar el aumento en la frecuencia de descarga basal en la aferente vestibular durante el desarrollo

Cada célula usualmente expresa diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G, debido a la gran codificación que presentan. Tan solo en humanos existen 900 receptores. Por lo tanto hay una integración de sus señales tanto espacial como de forma temporal en la célula que los expresa (Selbie and Hill, 1998). Sin embargo aún está por dilucidarse si esta integración está a nivel de la cascada de señalización o incluso a nivel de los receptores.

Cuando se habla de una capacidad de integración de las vías de señalización a nivel de los receptores, es debido a la facilidad con la que los GPCR forman

dímeros u oligomeros. Incluso a la capacidad de formar complejos por la interacción entre dos tipos diferentes de GPCRs. Como por ejemplo, en rata, la oligomerizacion de mGlu2 y el receptor a serotonina 5-HT2A controla la acción de alucinógenos en la corteza prefrontal (Gonzalez-Maeso et al., 2008). En el caso del receptor $GABA_B$ se han detectado dímeros, tetrámeros u oligomeros en sistemas heterologos. $GABA_B$ presenta una preferencia en la formación de tetrámeros y octámeros, pero siempre mostrando un equilibrio entre heterodimeros y oligomeros de un orden mayor (Maurel et al 2008.; Calebiro et al., 2013) y en neuronas nativas (Schwenk et al., 2010). Esta facilidad de interacción entre los GPCR proporciona cualidades farmacológicas y funcionales que generarían una respuesta fisiológica celular específica. Por lo tanto al evaluar la funcionalidad y la participación del receptor metabotrópico a GABA podríamos proponer un "crosstalk" entre $GABA_BR$ y mGluR1a en la sinapsis aferente vestibular durante el desarrollo.

La participación del grupo I de receptores metabotrópicos a glutamato se ha demostrado en la sinapsis aferente vestibular en los canales semicirculares de rana. En este estudio se sugiere que la activación de mGluR localizados probablemente en las células ciliadas induce una facilitación en la liberación de glutamato produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva en la sinapsis aferente. (Guth et al., 1998a). Para corroborar la participación de los mGluR I, se ha identificado la expresión del ARNm para estos en células ciliadas de crestas, utrículo y sáculo, por si fuera poco se demostró la immunoreactividad para mGluR 1a en células ciliadas de crestas (Guth, et al 1998b; Hendricson and Guth, 2002b).

El receptor metabotrópico a glutamato del grupo I también pertenece a los GPCR de clase C, como el receptor $GABA_B$. El grupo I incluye a los receptores mGlu1 y mGlu5 los cuales están acoplados a proteínas Gq. Varias variantes de splicing alternativo se han identificado para mGlu1, el primero se conoce como mGlu1a (Houamed et al 1991; Masu et al., 1991). La isoforma PLCβ transduce la señal iniciada por la activación del receptor mGlu1, esta enzima cliva al fosfatidil inositol-4.5-bifosfato (PIP2) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacylglicerol (DAG), liberando Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y activa PKC respectivamente. La movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta

a la activación del receptor mGlu1 ocurre a través del receptor IP3 y el receptor a ryanodine. De igual forma la activación del receptor mGlu1 puede incrementar las concentraciones de calcio intracelular a través de canales de calcio sensibles a voltaje (VSCCs) (Ferraguti et al.,2008).

Se propone que la activación del receptor $GABA_B$ incrementa la respuesta a calcio generada por el receptor mGlu1a, como lo observado por Hirono y colaboradores en células Purkinje del cerebelo (Hirono et al., 2001). Incluso se ha reportado que ambos receptores se pueden co-immunoprecipitar, sugiriendo una interacción de tipo física formando un heterómero $GABA_B$- mGlu1a (Tabata et al, 2004). Sin embargo, Rives y colaboradores debaten esta interacción de tipo física demostrando que el "crosstalk" entre estos tipos de receptores es a nivel de sus cascadas de señalización y no necesariamente una interacción de tipo física. Observando que la potenciación de la respuesta de calcio mediada por los mGlu1a ocurre a través del receptor $GABA_B$ mostrando una dependencia en la activación del mecanismo mediado por las vías de sus respectivas proteínas G, Gq y Gi/o, en un punto de convergencia a nivel de IP3 producido por PLC. La producción de IP3 inducido por la activación de $GABA_B$ ocurre como una amplificación de la actividad constitutiva de mGlu1a, es decir, la baja activación de PLCs producida por la actividad constitutiva de mGlu1a, actuando como un primer evento, es potenciada por la estimulación del receptor $GABA_B$ (Rives et al 2009). Remarcando la importancia de integración de señales tanto temporal como espacial.

Otros efectos atribuidos a los receptores metabotrópicos del grupo I son el incremento de los niveles intracelulares de AMPc, a través de un mecanismo dependiente de proteínas Gs (Joly et al., 1995; Thomsen, 1996), y la activación de fosfolipasa D (Servitja et al., 1999; Shinomura et al., 2000). Por lo que el incremento en los niveles de AMPc y probablemente acciones excitatorias de los receptores $GABA_B$ son consecuencia de la activación de proteínas G las cuales dependen de la expresión de isoformas de adenil ciclasa y GPCRs acoplados a Gsα, como los mGluR (Bowery et al 2002). Las proteínas Giα y Goα acopladas a los receptores de $GABA_B$, inhiben la mayoría de estas (tipo I, III, V, VI). Sin embargo Gβγ estimulan a los tipos II, IV y VII, pero esta estimulación depende de la presencia de Gsα, que resulta de la activación de

GPCRs (Bettler et al, 2004). Mientras la proteína Gαi/o es inactivada por las proteínas reguladores de proteínas G (RGS), las subunidades βγ inhiben la actividad GTPasa de Gαs, esto se ha observado mientras se estimula receptores β-adrenergicos. Lo que conlleva a una afinidad de la Gαs por la adenil ciclasa. Por lo que la activación de receptores $GABA_B$ pueden asistir mediante una señalización indirecta el incremente de la actividad de la adenil ciclasa y un consecuente incremento en la actividad de la PKA (Robichon et al., 2004). Wackyn y colaboradores de muestran la expresión de la isoforma II, IV y V en órganos vestibulares y en el ganglio de Scarpa en rata e indican que se expresa una variante de rata de AC VII solo presente en órganos vestibulares pero no en ganglio de Scarpa (Wackym et al, 2000). No obstante cada isoforma de Adenil ciclasa tiene diferentes propiedades de regulación, la AC II es estimulada por Gβγ y PKC e inhibida por Gαi. AC IV es estimulada por PKC. AC VII es estimulada por Gβγ y PKC. Sin embargo el curso temporal de estimulación por PKC para ACII y AC VII es diferente. La estimulación de la actividad de la AC II por PKC es gradual por el otro lado para AC VII es rápida y de corta duración (Krupinski and Cali 1998) Estos patrones de regulación permite que las células en la periferia vestibular respondan a una variedad de señales extracelulares dependiendo de que isoforma se exprese.

Una modulación de la adenil ciclasa afectaría la activación de kinasas dependientes de AMPc y los factores intercambiadores de nucleótido de guanina (GEFs), lo que influiría en la actividad de canales iónicos como los canales de potasio activados por calcio (canales BK y SK) (Gerber and Gähwiler 1994). Una de la consecuencia en cambiar la cinética de los canales es la afectación en la entrada de calcio. El calcio como segundo mensajero es clave en vías de señalización. En el desarrollo el calcio participa en la diferenciación neuronal, regulando el fenotipo del neurotransmisor, la morfología dendrítica, la guía y crecimiento axonal. El calcio transitorio activa enzimas que transduce señales iónicas en bioquímicas, estas enzimas impactan en la diferenciación a través de mecanismos de transcripción o por la regulación de la dinámica del citoesqueleto. La activación o represión de factores de transcripción controlan la expresión del neurotransmisor, y el

remodelado del citoesqueleto regula la morfogénesis dendrítica y axonal (Rosenberg and Spitzer 2011). No obstante, la activación del receptor $GABA_B$ se le atribuye una atenuación, es decir, una reducción en la respuesta generada por la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, por lo que se presenta una disminución en la liberación de vesículas sinápticas, este es uno de los mecanismos por el cual se ha reconocido al receptor $GABA_B$ como un mediador de efectos inhibitorios. Sin embargo, hay datos que confirman que el receptor $GABA_B$ no produce estos efectos inhibitorios, ya que es capaz de incrementar el calcio intracelular no solo mediante la liberación de los almacenes intracelulares, sino por la activación de corrientes de calcio tipo L. Así lo demuestra Mynlieff y colaboradores, mediante el cultivo de células en desarrollo de hipocampo de ratas, la activación del receptor $GABA_B$ incrementa corriente de calcio tipo L (Carter and Mynlieff 2004; Bray and Mynlieff 2009; Bray and Mynlieff 2011). Este mecanismo en el cual la activación de $GABA_B$ incremente la entrada de calcio se ha identificado en células retinales de salamandra (Shen and Slaughter 1999). Esto con lleva a un pensamiento en el cual se manifiesta una expresión del receptor $GABA_B$ para modular la concentración de Ca^{2+} intracelular de acuerdo a los eventos ontogénicos en los que las células estén participando. Cabe mencionar que los canales de tipo L son los primeros canales de calcio que se expresan en neuronas; el calcio que fluye a través de esos canales es la responsable del inicio de eventos regulatorios que influyen en la diferenciación neuronal (Pravettoni et al., 2000). Estudios indican que la activación de receptores $GABA_B$ regulan la sinaptogenesis (Chattopadhyaya et al., 2007), esto puede ser como lo mencionamos anteriormente, que la activación de $GABA_BR$ induzca la formación de DAG y una consecuente activación de PKC que provocaría la apertura de los canales de calcio tipo L. El calcio intracelular se incrementaría e iniciaría la secreción de BDNF que actuando en Trk-B y modularía la formación y eficacia de la sinapsis GABaergica (Fiorentino et al., 2009; Kuczewski et al., 2011). No obstante hay datos que sugieren un “cross-talk” entre los dos receptores a GABA, es decir, $GABA_A$ y $GABA_B$. Los cuales modulan la tasa de proliferación dependiendo de la viabilidad de GABA y el nivel de expresión de ambos receptores y los efectores de las cascadas de señalización. Mediante una elevación sinérgica

de Ca^{2+} intracelular en células madres embrionarias de ratón (Schwirtlich et al., 2010). Incluso se ha reportado una interacción física entre subunidades de los receptores $GABA_A$ y $GABA_B$ La asociación entre $GABA_{B1}$ con la subunidad Y2S del receptor $GABA_A$, promueve la expresión en la superficie celular de $GABA_{B1}$ en ausencia de $GABA_{B2}$ (Balasubramanian et al., 2004). Por otro lado la activación de $GABA_BR$ promueve la expresión de $GABA_AR$ en la superficie celular a través del incremento en la secreción de BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) y la activación de PLC/DAG/PKC (Kuczewski et al., 2011).

Estudios previos en nuestro laboratorio, se ha observado que el uso del agonista especifico (1S-3R-ACPD) de los mGluRs de los grupos I y II provocan un aumento en la frecuencia de descarga basal en la sinapsis aferente vestibular que es dependiente de la concentración y edad del embrión, produciendo el efecto máximo en la edad E21. Mientras que los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo III tienen su mayor efecto en edades más tempranas en el desarrollo, E16, y disminuye conforme se acerca a la eclosión. (Varela et al; 2010). Estos datos concuerdan con nuestros resultados observados en el estudio de la participación de los receptores $GABA_B$ en la sinapsis aferente vestibular, ya que se observa un efecto dependiente de la edad y concentración tras la aplicación de baclofén un agonista específico para el receptor $GABA_B$, en el cual su efecto máximo es de igual forma en E21. Lo que podría asumir que la interacción entre los receptores metabotrópicos del grupo I y el receptor metabotrópico a GABA podría ser funcional en la ontogenia vestibular del pollo. Al observar el efecto de saclofén, un antagonista del receptor $GABA_B$ sobre el efecto de baclofén en la descarga basal aferente vestibular, empleamos las edades E17, E19 y E21, debido a que en E15 no se muestra un efecto en la descarga basal. Observamos que el efecto de baclofén es disminuido en presencia de saclofén en todas las edades, siendo mayor en E19 y E21, y dependiente de la concentración administrada de saclofén. Por lo que podríamos suponer una mayor densidad de receptores funcionales a $GABA_B$ y una consolidación sináptica entre las células ciliadas y aferentes vestibulares, así como un mayor desarrollo en el sistema GABAergico interaccionando con el sistema glutamatérgico.

En nuestros resultados observamos el comportamiento de la descarga basal aferente vestibular al aplicar antagonistas para receptores a glutamato tipo NMDA y no- NMDA y analizamos su efecto sobre la respuesta aferente vestibular inducida por baclofén en E21, edad previa a la eclosión, donde se han observado y estudiado en nuestro laboratorio que los agonistas para receptores a glutamato tipo NMDA(Ramírez et al 2014) y no-NMDA (Varela et al 2010) ocasionan un efecto máximo al igual que baclofén. El receptor $GABA_B$ no está envuelto directamente en la neurotransmisión excitatoria rápida, la cual esta mediada por los iGluR. Adrianov y colaboradores (1995) sugieren que en la postsinapsis aferente vestibular hay una interacción entre los receptores AMPA y NMDA con los receptores metabotrópicos a glutamato. En esta interacción la activación de los mGLuR potencia la respuesta mediada por los receptores AMPA y NMDA (Adrianov et al., 2005). Quizás por esta razón, en nuestra sección experimental donde aplicamos antagonistas tipo NMDA y no NMDA observamos una disminución significativa en el efecto de baclofén sobre la frecuencia de la descarga basal aferente vestibular. No obstante, Podríamos sugerir que la activación de los receptores $GABA_B$ potencian la respuesta mediada por los mGluR, debido a que se considera que los mGluR podrían tener baja afinidad a glutamato, o en una localización extrasinápticos y que por ende su participación en la actividad basal aferente vestibular sea muy baja o nula, pero podrían participar cuando la concentración del neurotransmisor en la sinapsis sea muy alta o alcance niveles críticos (Scanziani et al., 1997).

El receptor $GABA_B$ está constituido por dos subunidades, $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$, para que este receptor sea funcional se requiere una heterodimerizacion por parte de estas subunidades. El extremo N terminal de la subunidad $GABA_{B1}$ es suficiente para la unión a ligando, sin embargo el acople con la subunidad $GABA_{B2}$ incrementa la afinidad por el agonista. Ambas subunidades poseen un dominio extrecelular VFTM, el cierre del VFTM de $GABA_{B1}$ es facilitado por la subunidad $GABA_{B2}$ y el acople a la proteína G por parte de la subunidad $GABA_{B2}$ es potenciado por la subunidad $GABA_{B1}$ (Kornau 2006) Estos datos demuestran por que se requiere una heterodimerizacion para que el receptor $GABA_B$ sea funcional. Sin embargo es posible que cada subunidad

desempeña funciones individuales, sin importar si actúan como heterodímeros o solos, debido a que $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ no siempre exhiben el mismo patrón de expresión (Bettler and Tiao, 2006). Es posible que receptores $GABA_B$ sean funcionales en neuronas que normalmente carecen de la subunidad $GABA_{B2}$. Co-immunoprecipitación y FRET sugieren que las subunidades $GABA_{B1}$ puede asociarse como homodímeros estables (Villemure et al., 2005). Immunoreactividad para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ se ha observado tanto en presinapsis y más abundante en postsinapsis. Presinápticamente el receptor $GABA_B$ se detecta mayormente en extrasinapticamente y ocasionalmente sobre la membrana presináptica en sinapsis glutamatérgicas y en menor proporción en terminales GABAérgicas. La asociación observada de los receptores $GABA_B$ con sinapsis glutamatérgicas en pre- y post-sinapsis sugieren una estrecha relación entre excitación e inhibición. Mediante microscopia electrónica, las subunidades GABAB1 yGABAB2 se encuentran tanto en niveles pre- y post- sinápticos en el cerebelo en desarrollo (Lujan and Shigemoto, 2006), neocortex (Lopez-Bendito et al., 2002) e hipocampo (López-bendito et al 2004) en etapas de post natal temprano. A nivel postsináptico, ambas subunidades están presentes en tallo dendrítico y espinas dendríticas y en sitios extrasinápticos y perisinápticos. De acuerdo a estudios de la ontogenia de los receptores $GABA_B$ y su función, indican que los receptores $GABA_B$ son funcionales y están presentes en desarrollo temprano, sin embargo hay ciertas distinciones de acuerdo a su localización en la sinapsis. Por ejemplo, los receptores $GABA_B$ postsinápticos actúan a través de la activación de los canales GIRK, sin embargo ante la aplicación de baclofén en hipocampo, la activación de estos canales no se reporta en el nacimiento (Gaiarsa et al., 1995; Caillard et al., 1998; Nurse and Lacaille, 1999; Verheugen et al., 1999) y neocortex (Luhmann and Prince, 1991; Fukuda et al., 1993, kirmse and kirischuk, 2006), mientras que los receptores $GABA_B$ presinápticos son funcionales y controlan la liberación de GABA y glutamato (Luhman and Prince 1991; Fukuda et al 1993; McLean et al., 1996; Caillard et al., 1998). En la revisión elaborara por Gairsa y Porcher en 2013, sugieren que a pesar que los receptores $GABA_B$ post sinápticos están presentes y funcionales en desarrollo temprano, existe la posibilidad que no estén envueltos en el control de excitabilidad mediante la activación de los GIRK en muchas áreas del

cerebro en desarrollo, no obstante, estén acoplados a vías de señalización que podría instruir o modular el desarrollo neuronal (Gairsa and Porcher, 2013) sin embargo, este cambio en la respuesta mediada por los receptores $GABA_B$ sigue sin dilucidarse.

La distribución del ARNm que codifica para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ esta diversamente expresada en el SNC de varias especies. En cerebro de rata, el ARNm de la subunidad $GABA_{B1}$ se puede detectar en la mayoría de las poblaciones de células neuronales con una alta expresión en hipocampo, núcleos talámicos y cerebelo; por otro lado el ARNm para la subunidad $GABA_{B2}$ es altamente expresado en la corteza piriforme, hipocampo y medial habénula. Sin embargo el ARNm para $GABA_{B2}$ es más abundante en las capas de la corteza, en tálamo y células Purkinje de cerebelo. No obstante se observa una diferencia en el patrón de expresión de los transcriptos para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$, la mayor diferencia se observa en el estriado y caudado putamen, donde altos niveles de ARNm que codifica para $GABA_{B1}$ contrasta el bajo nivel de expresión de ARNm para $GABA_{B2}$, sin embargo, con un estudio immunohistoquimico se observa la proteína de $GABA_{B2}$ esta significativamente expresado en esta estructura. En el desarrollo temprano, el ARNm está expresado en varias áreas del cerebro, sin embargo se sugiere que la subunidad $GABA_{B1}$ podría participar en la formación pre y post sinaptogénica, proliferación, migración y maduración neuronal. Particularmente esta subunidad tiene una mayor influencia que $GABA_{B2}$ en el desarrollo del sistema nervioso central (Kim et al., 2003). Ahora, los resultados electrofisiológicos demuestras una ausencia de la funcionalidad al aplicar baclofén en E15, sin embargo, nuestros datos en expresión génica del ARNm para ambas subunidades del receptor $GABA_B$ se muestra a partir de E15, lo que podría indicar un posible retardo en el acople entre ambas subunidades. De igual forma, la falta de funcionalidad de los receptores $GABA_B$ en E15 se puede deber a un crosstalk entre receptores NMDA. Esto se ha demostrado en espinas de neuronas piramidales en hipocampo, donde el influjo de Ca^{2+} a través de receptores NMDA activan CaMKII, la cual fosforila S867 en $GABA_BR$ e induce su endocitosis (Maier et al., 2010). De igual forma la activación de receptores NMDA induce una rápida fosforilación en S783 en

$GABA_{B2}$ por parte de PP2A y contribuye a la degradación de $GABA_BR$ (Terunuma et al 2010). Sin embargo, estas conclusiones dilucidan un tipo de interacción pero en estados maduros y no en desarrollo.

Nuestros datos revelan una respuesta a baclofén en el periodo de neurodesarrollo del sistema vestibular, por lo que sugerimos una presencia de estos receptores. Con los resultados previos podemos inferir una coexistencia entre los receptores metabotrópico de glutamato del grupo I y el receptor $GABA_B$. Sin embargo para dilucidar completamente a que nivel en la vía de señalización sucede esta interacción, tendríamos que realizar otro tipo de protocolos experimentales. Se observó previamente que en la sinapsis aferente vestibular GABA podría participar como un neuromodulador y facilitador de la descarga basal. Nuestros datos indican que los receptores $GABA_B$ no fungen con su habitual rol de inhibidores o controladores de la excitabilidad neuronal en la sinapsis aferente vestibular en el desarrollo embrionario, por lo que podemos sugerir que mediante los mecanismos ya discutidos y observados en otras regiones cerebrales los receptores $GABA_B$ mantienen una interacción con los receptores mGluI y que este mecanismos tenga como función modular la liberación de glutamato en la sinapsis aferente vestibular y por su naturaleza desencadenar procesos ontogénicos.

Conclusiones:

1.- Los receptores $GABA_B$ participan en la descarga basal aferente vestibular durante el desarrollo embrionario.

2.- La activación de los receptores $GABA_B$, mediante la aplicación de baclofén, incrementan la respuesta de la descarga basal aferente vestibular. Dicha respuesta es dependiente de la edad del embrión observándose un mayor efecto en el desarrollo tardío

3.- Los resultados obtenidos mediante ensayos de expresión génica demuestran la presencia del ARNm que codifica para las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ del receptor $GABA_B$ en cresta y ganglio vestibular en todas las edades estudiadas.

4.- El antagonista saclofén disminuye el efecto producido por baclofén en edades cercanas a la eclosión.

5.- Los antagonistas para receptores glutamatérgicos tipo no-NMDA (CNQX, MCPG,) y NMDA (MK-801) disminuyen considerablemente el efecto producido por la aplicación de baclofén en E21.

REFERENCIAS:

Adrianov G.N., Puyal J., Raymond J., Venteo S., Dememes D., Ryzhova J. (2005). Immunocytochemical and pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors of the vestibular end organs in the frog. *Hearing research* **204** 200-209

Alburquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89:**73-120

Akerman CJ., and Cline HT (2006). Depolarizing GABAergic conductances regulate the balance of excitation to inhibition in the developing reinotectal circuit in vivo. *J. Neurosci*.**26**:5117-5130.

Akerman CJ, and Cline HT (2007). Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. *Trends Neurosci*. **30**:382–389

Balasubramanian S, Teissere JA, Rahy CV, Hall RA (2004). Heterooligomerization between $GABA_A$ and $GABA_B$ receptors regulates GABAB receptor trafficking. *J.Biol Chem* **279**:18840-18850

Baird RA, Desmadryl G, Fernandez C. Goldberg JM. (1988). The vestibular nerve of the chinchilla II. Relation between afferent response properties and peripheral innervations patterns in the semicircular canals. *J. Neurophysiol*. **60**:182-203

Bartheld CS, Rubel EW (1989). Transient GABA immunoreactivity in cranial nerves of the chick embryo. *J Comp Neurol* **286**:456– 471

Bartual,(1998) "*El sistema vestibular y sus alteraciones: fundamentos y semiología*", Elsevier España.

Behar TN., Smith SV, Kennedy RT., McKenzie JM., Maric I and Barker JL. (2001). GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb.Cortex* **11**, 744–753.

Bettler B, Tiao JY (2006). Molecular diversity, trafficking and subcelular

localization of GABAb receptors. *Pharmacol Ther* **110**:533-543

Benarroch EE., (2012) $GABA_B$ receptors: structure, functions and clinical implications. *Neurology*, **78**(8):578-84.

Ben-Ari Y., Cherubini E., Corradetti, R and Galarsa JL (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampus neurones. *J. Physiol*. **416,** 303-325

Ben-Ari Y (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 728-739

Ben-Ari Y., Gaiarsa JL., Tyzio R., and Khazipov R (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol.Rev.* **87**, 1215–1284

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O and Gaiarsa, J (1997). $GABA_A$, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated “ménage a trios”. *Neuroscience* **20**: 523-529

Benke D., Honer M., Michael C., Bettler B., Mohler H (1999). Gamma aminobutyric acid receptor B, splice variant proteins GBR1 and GBR1b are both associated with GBR2 in situ and display differential regional and subcelular distribution *J. Biol Chem* **274**, 27323-27330

Bray JG, Mynlieff M. (2009). Influx of Calcium Through L-Type Calcium Channels in Early Postnatal Regulation of Chloride Transporters in the Rat Hippocampus. *Dev Neurobiol;* **69**: 885- 896.

Bray JG. & Minlieff M. (2011) Involvement of PKC and PKA in the enhancement of L-type calcium current bye $GABA_B$ receptor activation in neonatal hippocampus. *Neuroscience* **179**: 62-72

Bettler B. Kaupmann K. Mosbacher J. Gassmann M (2004). Molecular Structure and physiological Functions of GABAB receptors. *Physiol Rev* **84**: 835-867

Bissonnette J Pand Fekete DM (1996) Standar atlas of Gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *J Comp Neurol* **368:**620-630

Bony G., Szczurkowska J., Tamagno I., Shelly M., Contestabile A., and Cancedda L. (2013). Non-hyperpolarizing $GABA_B$ receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat.Commun.* **4**, 1800.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W.Gallagher JP, Marchall F, Raiteri M, Boner TI, Enna SJ (2002). International Union of Pharmacology XXXVIII.

Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* **54**: 247-264

Bowery NG, and Hudson AL. (1979). Gamma-aminobutyric acid reduces the evoked release of [3h]-noradrenaline from sympathetic nerve terminals. *Brithish Journal of Pharmacology*, **66**, 108.

Bozovic D, Hudspeth AJ. (2003). Hair-bundle movements elivited by transepithelial electrical stimulation of hair cells in the sacculus of the bullfrog. *Proc. Natl. ACAD. Sci*. **100**:958-963.

Bruce M. Koeppen. (2009). "*Berne y Levy Fisiología"*. Elsevier España. 6°Edición.

Calebiro D., Rieken F., Wagner J., Sungkaworn T., Zabel U., Borzi A., et al. (2013). Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* **110**, 743–748.

Caillard O., McLean HA., Ben-Ari Y and Gaïarsa JL. (1998). Ontogenesis of presynaptic $GABA_B$ receptor-mediated inhibition in the CA3 region of the rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **79**, 1341–1348.

Carter TJ, Mynlieff M. (2004). Gamma-aminobutyric acid type B receptors facilitate L- type and attenuate N- Type Ca^{2+} currents in isolated hippocampal neurons *J Neurosci Res* **76**: 323-333

Chattopadhyaya B., di Cristo, G., Wu C.. Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y et al. (2007). GAD67- mediated GABa synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* **54**, 889-903

Cortes 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:**374-381

Crouch JJ, Sakaguchi N, Lytle C, Schulte BA (1997). Immunohistochemical Localization of the Na-K-Cl Co transporter (NKCC1) in the Gerbil Inner Ear. *J Histochem Cytochem* vol. 45 no. 6 773-778.

Daudet N., Lewis J. (2005). Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair cell differentiation. *Development*. 132, 541-551.

Demarque M., Represa A., Becq H., Khalilov I., Ben-Ari Y., and Aniksztejn L. (2002). Paracrine intercelular communication by a Ca(2+)- and SNARE-

independent reléase of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* **36**, 1051–1061.

Dernedde J, Weise C, Müller EC, Hagiwara A, Bachmann S, Suzuki M, Reutter W, Tauber R, and Scherer H. (2014). Cupulin is a Zona Pellucida-like Domain Protein and Major Component of the Cupula from the Inner Ear. *PLoS One*; **9** (11): e111917

Desai SS and Dua A, (2014). History of Research in the Vestibular System: A 400-year- old story. *Anat Physiol* **4**:138

Desai SS, Zeh C, Lysakowski A. 2005b. Comparative morphology of rodent vestibular periphery I. Saccular and utricular maculae. J. Neurophysiol. 93(1):251-66

Didier A. Dupont J., Cazals Y. (1990). GABA immunoreactivity of calyceal nerve endings in the vestibular system of the guinea pig. *Cell and Tissue Research* **260**:415-419

Dowdall MJ, Boyne AF, Whittaker VP (1974). Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J* **140**: 1-12

Drucker, (2005). "*Fisiología Medica*" Editorial el manual moderno, México

Eatock RA., and Songer JE. (2011). Vestibular Hair Cells and Afferents: Two Channels for head motion Signals. *Annu. Rev. Neurosci*. **34**:501-34

Eccles JC.(1964). Ionic mechanism of postsynaptioc inhibition. *Science* **145**, 1140e1147.

Eckhard F., Rust MB., Schulenborg T. Hirtz JJ. (2011). Chloride cotransporters, chloride homeostasis, and synaptic inhibition in the developing auditory system. *Hearing Research* **279** 96-11.

Ecker RA. (1997). Sensing the environment. In: animal physiology: mechanisms and adaptation. (Ed),Randall, frnch and Bruggen. Freeman, N.Y pp:216-250.

Eybalin M (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* **73**:309-373

Felix D, Ehrenberger K. (1982). The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth. *Acta Otolaryngol (Stockh*) **93**:101–105.

Ferraguti F, Crepaldi L & Nicoletti F. (2008) Metabotropic Glutamate 1 receptor: Current Concepts and Perspectives. *Pharmacol Rev* **60**:536-581

Fernandez C and Goldberg JM (1976b). Physiology of peripheral neurons

innervating otolith organs of the squirrel monkey. III. Response dynamics. *J. Neurophysiol*. **39**:996-1008

Fink DJ., and Norest DK. (1977). Formation of synaptic endings by colossal fibers in the vestibular epithelium of the chick embryo. Neuroscience 2:226

Flock A, and Lam D. (1974). Neurotransmitter synthesis in the inner ear and lateral line sense organs. *Nature* **249**:142–144.

Goldberg JM., and Fernandez C. 1980. Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity. *J. Neurophysiol*. **43**(4):986-1025.

Fiorentino, H., Kuczewski N., Diabira, D., Ferrand N ., Pangalos MN. Porcher C, et al (2009). $GABA_B$ receptor activation triggers BDNF release and propmotes the maturation of GABAergic synapses *J. Neurosci*. **29**, 11650-11661

Fontaine B, Klarsfeld A, Hôkfelt T, Changeux JP (1986). Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo yotubes. *Neurosci Lett* **71**:59-65

Foster JD, Drescher MJ, Drescher DG. (1995) immunohistochemical localization of GABAA receptors in the mammalian crista ampullaris.

Froestl W. (2010). Chemistry and pharmacology of $GABA_B$ receptor ligands. *Advances in Pharmacology* Vol **58** 19-62

Fukuda A., Mody I., and Prince DA. (1993). Differential ontogénesis of presynaptic and postsynaptic $GABA_B$ inhibition in the rat somato sensory cortex. *J. Neurophysiol.* **70**, 448–452

Gaïarsa JL., Tseeb, V. and Ben-Ari Y. (1995). Postnatal development of pre- and postsynaptic GABAB-mediated inhibitions in the CA3 hippocampal región of the rat. *J. Neurophysiol.* 73, 246–255.

Gaiarsa JL. and Porcher (2013). Emerging neutrophic role of $GABA_B$ receptors in neuronal circuit development*. Frontiers in cellular Neuroscience*. **7**:

Galvez T., Duthey B., Kniazeff, J., Blahos J., Rovelli G., Bettler, B., et al. (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* **20**, 2152–2159.

Gassmann M. and Bettler Bernhard. (2012). Regulation of neuronal $GABA_B$ functions by subunit composition. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 380-

394.

Gao XB., and Van den Pol AN. (2000). GABA reléase from mouse axonal growth cones. *J. Physiol.* **523**(Pt 3),629–637

Geng Y., Bush M., Mosyak L., Wang F., and Fan QR. (2013).Structural mechanism of ligand activation in human $GABA_B$ receptor. *Nature* **504**, 254–259.

Geng Y., Xiong D., Mosyak L., Malito DL., Kniazeff J. Chen Y. et al (2012). Structure and functional interaction of the extracellular domain of human $GABA_B$ receptor GBR2. *Nat. Neurosci.* **15**, 970-978.

Gerber U, Gähwiler BH (1994) $GABA_B$ and adenosine receptors mediate enhancement of the K current, IAHP, by reducing adenylyl cyclase activity in rat CA3 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **72**: 2360- 2367

Gillespie PG, Cyr JL. (2004) Myosin-1c, the hair cell`s adaptation motor. *Annu. Rev. Physiol* **66**:521-545.

Gillespie PG, and Mûller U. (2009). Mechanotranduction by Hair Cells: Models, Molecules and Mechanisms. *Cell*. **139**(1):33-44.

Ginzberf R.D., and Gilula B.N., (1980). *Journal of Neurocytology* **9**, 405-424

Greger R and Windhorst U. (1996). Comprehensive human physiology: from cellular mechanisms to integration, Volumen 1. Springer

Glowatzki E., Grant L. Fuchs P. (2008). Hair Cells Afferent Synapses. *Curr opin Neurobiol*. **18(4**): 389-395.

Goldberg JM. (1991). The vestibular end organs: morphological and physiological difersity of afferents. *Curr. Opin. Neurobiol*. **1**: 229-35

Goldberg JM, Desmadryl G, Baird RA, Fernandez C. (1990b). The vestibular nerve of the chinchilla. V. Relation between afferent discharge properties and peripheral innervations patterns in the utricular macula. *J. Neurophysiol*. **63**:791-804.

Goldberg JM, Fernandez C. 1977. Conduction times and background discharge of vestibular afferents. *Brain Res.* **122**: 545-50.

Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV; Lopez-Gimenez JF, Zhou M, okawa Y, Callado LF, Millimgam G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC (2008). Identificatio of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**: 93-97

Guth P.S.,Perin P., Norris C.H., Valli p. (1998a) the vestibular hair cells post-

transductional signal processing. *Prog. Neurobiol* **54**:193-247.

Guth P.S., Holt, J.C., Perin P., Athas, G., Garcia M., Puri A., Zucca G., Botta L., Valli P., (1998b) The metabotropic glutamate receptor of the vestibular organs. *Hear Res* **125**, 154-162

Hamburger V and Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* vol **88** no 3

Harada Y. (1983) the function of the otolithic organs. Atlas of the Ear. Pp 36-39

Hendricson AW, Guth PS. (2002b). Signal discrimination in the semicircular canals: a role for group I metabotrópico glutamate receptors. *NeuroRepor*t **13**, 1765-1768

Highstein MS., Fay RR., Popper NA., "T*he vestibular system*" Editorial Springer 2004.

Hirono M., Yoshioka T and Konishi S., (2001) $GABA_B$ receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. *Nature neuroscience* vol **4**:12

Holstein GR., Martinelli GP., Henderson SC., Friedrich VL., Rabbitt RD., and Highstein SM. (2004a). γ Aminobutyric Acid is present in a spatially discrete Subpopulation of hair cells in the crista Ampullaris of the Toadfish *Opsanus tau*. *The Journal of comparative Neurology* **471**:1-10

Holstein GR, Rabbitt RD, Martinelli GP, Friedrich VL Jr, Boyle RD, Highstein SM. (2004b). Convergence of excitatory and inhibitory hair cell transmitters shapes vestibular afferent responses. *Proc Natl Acad Sci* USA **101**:15766–15771

Holt JC. Lysakowski A., Goldberg JM. (2011). The Efferent vestibular system. Springer Handbook of Auditory Research 38.

Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, and Hagen FS (1991) Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252:**1318–1321.

Howard J, Hudspeth AJ. (1987). Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechanoelectrical transduction by bullfrogs sacular hair cell. Proc. Natl. Acad. Sci. **84**:3064-3068.

Hudspeth AJ., (2014) Integrating the active process of hair cells with cochlear function. *Nature Reviews Neuroscience* **15**, 600-614

Jacob TC, Moss JS, Jurd R. (2008). $GABA_A$ receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience* **9**, 331-343.

Jorgensen F and Kroese AB. (1995), Ca selectivity of the transduction channels in the hair cells of the frog sacculus. *Acta Physiol. Scand*. **155**(4):363-76,

John V.B, Amy E.K, Xiaoying G., Laurie E.I., Fekete D. (2000). Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: Do compartment boundaries play a role?. *PNAS* vol. **97** no. 22 .11700-11706.

Johnston G.A.R.(2005). $GABA_A$ Receptor Channel Pharmacology. *Current Pharmaceutical Design* 11, 1867-1885.

Kachar B, Parak M, Kurc M, Zhao Y, Gillespie PG. (2000) High-resolution structure of hair-cell tip links. PNAS vol 97 no. 24 **36**-13341

Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997). Expression cloning of $GABA_B$ receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**:239-246

Kazmierczak P, and Müller U. (2012) Sensing sound: molecules that orchestrate mechanotransdutction by hair cells. *Trends Neurosci*. 35(**4**):220-229

Kim MO., Li S., Park MS., and Hornung JP. (2003). Early fetal expression of $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ receptor mRNAs on the development of the rat central nervous system. Brain Res. *Dev. Brain Res*. **143**, 47-55

Kirmse K., and Kirischuk S (2006). Ambient GABA constrains the strength of GABAergic synapses at Cajal-Retzius cells in the developing visual cortex. *J. Neurosci.* 26, 4216–4227

Kitahara T, Takeda N, Ohno K, Araki T, Kubo T, Kiyama H. (1994). Expression of GABAA receptor g1 and g2 subunits in the peripheral vestibular system of the rat. *Brain Res* **650**:157–160

Koeppen B.M. & Stanton B.A. (2008). Berne and Levy Principles of Physiology. Mosbi 6º Edicion.

Krupinski J. Cali J.J. (1998). Molecular diversity of the adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein. Res*. **32** 53-79

Kornau HC. (2006) $GABA_B$ receptors and synaptic modulation

Kuczewski, N., Fuchs, C., Ferrand, N., Jovanovic, J. N. Gaiarsa, J.L., and Porcher, C. (2011). Mechanism of $GABA_B$ receptor induced BDNF secretion and promotion of $GABA_A$ receptor membrane expression. *J. Neurochem*. **118**, 533-545.

Lasserson D, Briar C. (2004). "*Lo esencial en sistema nervioso"*. Elsevier España.

Lapeyre P.N.M., Kolston P.J., Ashmore J.F. (1993). $GABA_B$ mediated modulation of ionic conductances in type I hair cellos isolated from guinea-pig semicircular canals. *Brain Research* Vol **609** (1-2), 269-276

Li GQ, Hevetter GA, Leonard RB, Prusak DJ, Wood TG, Correia MJ (2007) Muscarinic acetylcholine receptor subtype expression in avian vestibular hair cells, nerve terminals and ganglion cells. *Neurosciences* **146**: 384-402

Li K, Xu E. (2008). The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neurosci Bull*. **24**(3):195-200

Liu J. Maurel D. Etzol S. Braber. Ansanay et al (2004). Molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity in the GABAB receptor by the GABAB2 subunit. *J. Biol. Chem..* **279**, 15824-15830

Lopez I, Wu JY, Meza G (1992) immunocytochemical evidence for afferent GABAergic neurotransmission in the guinea pig vestibular system. *Brain Res* **589**:341-348

Lopez-Bendito G., Shigemoto R., Kulik A., Paulsen O., Fairen A., and Lujan,R. (2002). Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *Eur.J.Neurosci.* **15**, 1766–1778.

Lopez-Bendito,G.,Lujan,R.,Shigemoto,R.,Ganter,P.,Paulsen,O.,andMolnar,Z. (2003). Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb.Cortex* **13**, 932–942.

Lopez-Bendito,G.,Shigemoto,R.,Kulik,A.,Vida,I.,Fairen,A.,andLujan,R. (2004). Distribution of metabotropic GABA receptor subunits $GABA_{B1a/b}$ and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 14, 836–848

Lu, T. and Trussell, LO. (2001).Mixed excitatory and inhibitory GABA-mediated transmission in chick cochlear nucleus. J. Physiol. (lond) 535, 125-131

Luhmann HJ., and Prince DA (1991). Postnatal maturation o fthe GABAergic

system in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 247–263.

Lujan,R.,and Shigemoto,R.(2006).Localization of metabotropic GABA receptor subunits $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur.J.Neurosci.* 23, 1479–1490.

Lustig LR, Hiel H, Fuchs PA (1999) Vestibular hair cells of the chick express the nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 9. *J Vestib Res* **9**:359-367

Macdonald, R.L., & Olsen R.W. (1994). GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci* **17**:569-609.

McLean,H.A.,Caillard,O., Khazipov,R., Ben-Ari,Y., and Gaïarsa,J.-L.(1996). Spontaneous reléase of GABA activates $GABA_B$ receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 76, 1036–1046.

Maier PJ., Marin I., Grampp T., Sommer, and Benke D. (2010). Sustained glutamate receptor activation down-regulates $GABA_B$ receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. *J. Biol. Chem*. **285**. 35606-35614

Maison FS. Casanova E., Holstein G.G., Bettler B., & Liberman M.C., (2008) Loss of $GABA_B$ receptors in Cochlear Neurons : Theshold Elevation suggests Modulation of Outer Hair Cell Function by Type II Afferent Fibers. *JARO* **10** : 50-63

Marcotti W. and Masetto S. (2010). Hair Cells. Encyclopedia of life Sciences.

Martin SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH. (2004).Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *J Comp Neurol* 4**73**:16–29.

Marty, A., Llano, I., 2005. Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci*. **28**, 284e289.

Martyniuk CJ., Aris-Brosou S., Drouin g., Cahn J., Trudeau VL. (2007) Early evolution of GABA receptors and selective regimes actinf on the mammalian-specific Theta and Epsilon subunits

Masetto, S., Perin, P., Malusa, A., Zucca, G., and Valli, P. (2000). Membrane properties of chick semicircular canal hair cells in situ during embryonic

development. *J. Neurophysiol*. **83**. 2740-2756.

Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, Bazin H, Tinel N, durroux T, Prezeau L, Trinquet E, Pin JP. (2008) cell-surface protein-protein interaction analysis with time resolved FRET and snap-tag technologies:application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* **5**: 561-567

Meyer J., Furness DN., Zenner HP., Hackney CM., and Gummer WA. (1998) Evidence for opening of Hair-Cell Transducer Channels after Tip-Link Loss. *J. Neurosci.* **18**(17):6748-6756.

Meza G, Carabez A. Ruiz M (1982) GABA synthesis in isolated vestibular tissue of chick inner ear. *Brain Res* **241**:157-161.

Meza G, Guerra G, josé C, Wu YK (1997). Distribution and properties of vestibular glutamate decarboxylase in the rat. (Abstr). *J Neurochem* **69** (suppl):S164D

Mihic, S.J., and Harris, R.A. (1997). GABA and the GABA A receptor. *Alcohol Health & Research World* **21**(2):127–131.

Millar NS and Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **56**:237-246

Milligan CJ., Buckley NJ., Garret M., Deuchars J., Deuchars SA. (2004). Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAc receptor subunits in native central neurons. *J Nuerosci*. **33**:9241-50.

Mount, DB., Mercado A., Song, LY., Xu, J., George, AL., Delpire, E., Gamba, G., (1999) .Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation chloride cotransporter gene family. J. Biol. Chem. 274, 16355e16362.

Nurse,S.,andLacaille,J.C.(1999).Late maturation of GABA(B) synaptic trans-mission in área CA1of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 38, 1733–1742.

Olsen W.R. (2002). GABA receptors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.* American College of Neuropsychopharmacology.

Obrietan K, and Van den Pol AN (1995) GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca^2 elevating to depressing. *J Neurosci* **15**:5065–5077.

Obrietan K, and Van den Pol AN (1998). GABAB receptor-Mediated inhibiton of

$GABA_A$ receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* **79**:1360-1370

Owens,D.F.,and Kriegstein,A.R.(2002).Is there more to GABA tan synaptic inhibition? *Nat.Rev.Neurosci.* 3, 715–727

Parker DE (1981).El aparato vestibular. *Revista de investigación y ciencia* **52**

Patneau DK, Mayer ML. (1990) Structure –activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at NMDA and quisqualate receptors. *J.Neuroscience*. **10**: 2385-2399

Payne JA., Stevenson TJ., Donaldson, LF., (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. J. Biol. Chem. 271, 16245e16252.

Pravettoni E, Bacci A, Coco S, Forbicini P, Matteoli M, Verderio C. 2000. Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons *Dev Biol* 227:581–594

Pin JP., Kniazeff J., Binet V., Liu J., Maurel D., Galvez T., et al. (2004). Activation mechanisms of the heterodimérico GABA(B) receptor. *Biochem. Pharmacol*. **68**, 1565-1572.

Popova E. (2014). Ionotropic GABA Receptors and Distal Retinal ON and OFF Responses. *Scientifica* Vol 2014, article ID 149187, 23 pages.

Qian H., Ripps H., F. (2009). Focus on molecules: the GABAc receptor. *Exp Eye Res*. **88** (6): 1002-1003.

Ramirez AM. (2014). Caracterización de los receptores NMDA en el Sistema vestibular del pollo durante el desarrollo embrionario. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología BUAP

Represa A. Ben Ari Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *TRENDS in Neurosciencies* Vol.**28** No.6

Rezaee A, Robinson AM, Zhao JCh, Pitovski DZ. (1997). Expression of $GABA_A$ receptor subunits in mammalian vestibular en organs by mans of polymerase chain reaction. Otolaryngol *Head Neck Surg* **117**:P145.

Richard L. Drake , Wayne Vogl , Adam W. M. Mitchell. (2005). “Gray *anatomía para estudiantes*”. Elsevier España.

Rives ML., Vol C., Fukazawa Y., Tinel N., Trinquet E., Mohammed AA., Shigemoto R., Pin Jp., Prezeau L., (2009). Crosstalk between $GABA_B$ and

mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration. *The EMBO Journal* **28**, 2195-2208.

Robichon A., Tinette S., Corutial C andPelletier F., (2004). Simultaneous stimulation of GABA and beta adrenergic receptors stabilizes isotypes of actiated adenyl cylcase heterocomplex. *BMC Cell Biol*. **5**, 25

Varela R. (2010) Receptores metabotrópicos a glutamato en el sistema vestibular del pollo. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiologia BUAP

Romand R. and Varela-Nieto I. (2003) Development of Auditory and Vestibular Systems. Current Topics in Developmental Biology Vol 57. Elsevier

Rondard P., Huang S., Monnier C., Tu H., Blamchard B. Oueslati N., et al (2008). Functioning of the dimeric $GABA_B$ receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning *EMBO J*. **27**, 1321-1332.

Rosenberg SS. and Spitzer NC. (2011) Calcium Signaling in Neuronal Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a004259

Russel JM., (2000). Sodium-potassium.chloride cotransport. *Physiol. Rev 80*, 211-276.

Sadeghi SG, Goldberg JM, Minor LB, Cullern KE.2009. Efferent-mediated responses in vestibular nerve afferents of the alert macaque. *J. Neurophysiol*. 101(**2)**:988-1001

Sauer, G., Richter, C.P., Klinke, R., 1999. Sodium, potassium, chloride and calcium concentrations measured in pigeon perilymph and endolymph. *Hear. Res.* **129** (1–2), 1–6.

Scanziani M., Salin PA., Vogt KE., Molenka RC., Nicoll RA., (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* **385**, 630- 634

Schwander M, Karchar B, Müller U. (2010). The cell biology of hearing. *J Cell biol*. 190(**1**):9-20

Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., et al, (2010) Native $GABA_B$ receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* **465**, 231-235

Schwirtilch M, emir Z, antal k, Mate Z, Katarova Z, and Szabo G. (2010). GABAA and GABAB receptors of disctinct properties affect oppositely the proliferation of mouse embryonic stem cells through synergistic elevation

of intracellular Ca^{2+}. The FASEB journal Vol **24**:1218-1228

Selbie L., A. and Hill SJ.(1998) G protein- coupled-receptor crosss-talk: the fine tuning of multiple receptor- signaling pathways. *Trends Pharmacol.* Sci. 19, 87-93

Sernagor E., Chabrol F., Bony G., and Cancedda,L.(2010).GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front.Cell.Neurosci.* **4**:11.

Shen W, Slaughter MM. (1999) Metabotrópico GABA receptors facilitate L- type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons. *J physiol* ; **516** (Pt3): 711-718

Simmons DD, and Morley BJ. (2011) Spatial and temporal expression pattenrs of nicotinic acetylcholine alpha 9 and alpha 10 subunits in the embryonic and early postnatal inner ear. *Neuroscience* **194**, 326-336

Soto E and 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: 61-68.

Steyger P.S., Gillespie P.G., Baird R.A. (1998). Myosin Iβ is located at Tip Limk Anchors in Vestibular Hair Bundles. *J.Neurosci*., **18**(12):4603-4615

Tabata T, Araishi K, Hashimoto K, hashimotodani Y, van der Putten H, Bettler B,Kano M. (2004) Ca2+ activity at $GABA_B$ receptors constituively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**. 16952-16957

Taylor J., and Gordon-Weeks PR. (1991).Calcium-indenpendentg-aminobutyric acid reléase from growth cones: role of g-aminobutyric acid transport. *J. Neurochem.* **56**, 273–280.

Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009) Nicotinic receptors : allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**:733-750

Terunuma, M et al. (2010) prolonged activation of NMDA receptors pro,otes dephosphorylation and alters postendocytic sorting of $GABA_B$ receptors. *Proc.Natl Acad- Sci. USA* **107**, 13918-13923

TURGEON, S. M. AND ALBIN, R. L. Postnatal ontogeny of GABAB binding toxin-sensitive calcium current that is required for synaptic transmission in rat brain. *Neurosci.* **62**: 601–613, 1994.

Usami S., Hozawa J., Tazawa M., Igarashi M, Thompson GC, Wu JY, Wenthold RJ. (1989) Immunocytochemical study of GABA system in chicken vestibular

Verheugen, JA., Fricker D., and Miles,R. (1999). Noninvasive measurements of the membrane potentia land GABAergic action in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 2546–2555

Villemure J.-F., Adam, L., Bevan, NJ., Gearing, K., Chénier, S., and Bouvier, M. (2005). Sub-cellular distribution of $GABA_B$ receptor homo- and heterodimers. *Biochem. J*. **388**, 47–55

Vollrath MA, & Eatock RA. (2003). Time course and extent of mechanotransducer adaptation in mouse utricular hair cells: comparison with frog sacccular hair cells. *J. Neurophysiol*. **90**(4):2676-89.

Von Bartheld C.S & Rubel E.W. (1989). Transiente GABA immunoeactivity in cranial nerves of the chick embryo. *J Comp Neurol.* **286**(4): 456-71.

Wackym PA, Chen CT, Ishiyama A, Pettis RM, Lopez IA, Hoffman L (1996) Muscarinic acetylcholine receptor subtype mRNAs in the human and rat vestibular periphery. *Cell Biol Int* **20**:187-192.

Wackym PA, Troyanovskaya M, Popper P. (2000). Adenylyl cyclase isoforms in the vestibular periphery of the rat. *Brain Research* **859** 378-380

Wersall J. and Bagger-Sjöbäck D. (1974). Morfology of the vestibular sense organ. En: Handbook of sensory physiology Vol. VI: Vestibular system part I.H. H. Kornhuber Ed Springer- verlag, Alemania. p.p 53- 78, 123-170.

Xiang Y., Li Y., Zhang Z., Cui K., Wang S., Yuan X. B., et al. (2002). Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat. Neurosci.* **5** 843–848

Xu C., Zhang W., Rondard P., Pin J-p. & Liu J. (2014). Complex $GABA_B$ receptor complexes: how to generate multiple functionally distinct units from a single receptor. *Frontiers in Pharmacology* **5.**