

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO EN TERAPIA OCUPACIONAL



Distribución del gen Pou4f1 durante el desarrollo embrionario del sistema estato-acústico.

AUTOR: Morell Guerrero, Natalia.

Nº expediente: 703

TUTOR: De Puelles Martínez de la Torre, Eduardo.

Departamento de Histología y Anatomía.

Curso académico 2016-2017.

Convocatoria de mayo.

A la atención de la Vicedecana de Grado en Terapia Ocupacional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|------------------------------------|----|
| o Resumen y palabras clave | 1 |
| o Abstract and key words | 2 |
| o Introducción | 3 |
| o Hipótesis de trabajo..... | 10 |
| o Objetivo..... | 11 |
| o Material y métodos..... | 12 |
| o Resultados | 16 |
| o Discusión..... | 18 |
| o Conclusiones | 19 |
| o Anexos de figuras y tablas | 20 |
| o Bibliografía | 26 |

RESUMEN

Introducción: El sistema auditivo cumple funciones esenciales a lo largo de la vida. En cada una de las partes que lo componen aparecerán estructuras celulares estatoacústicas encargadas de cumplir estas funciones. El VIII par craneal cobra importancia en la transmisión de los impulsos nerviosos recibidos por estas estructuras al sistema nervioso. Una lesión o malformación de este nervio puede afectar tanto al sistema auditivo como al vestibular.

Hipótesis de trabajo: El estudio de la distribución de Pou4f1 en estadios tardíos aportará una mejora a la comprensión de la formación del VIII par craneal.

Objetivo: Realizar un estudio descriptivo de la distribución de las proteínas β - Galactosidasa e Islet1 durante el desarrollo embrionario del sistema auditivo en el ratón Pou4f1TAULacZ.

Material y métodos: Este estudio se ha llevado a cabo utilizando técnicas de inmunohistoquímica y de tinción histológica básica en secciones de cerebro de embrión de ratón en tres estadios diferentes.

Resultados: El marcador Pou4f1 muestra el desarrollo del VIII par craneal. El marcador Islet1, evidencia el epitelio sensitivo de la zona y la tinción histológica revela las estructuras celulares. Se muestran los componentes neuronales del sistema auditivo en los diferentes estadios.

Discusión: El presente estudio sigue la investigación de uno anterior en estadios muy tempranos, donde, también se describe la expresión de los genes utilizados en las células proliferantes.

Conclusiones: Se concluye que el ratón utilizado permite observar la formación del VIII par craneal, tanto de sus poblaciones neuronales como de sus proyecciones axonales.

Palabras clave: embriología, VIII par craneal, sistema auditivo/vestibular, Pou4f1, Islet1.

ABSTRACT

Introduction: The auditory system performs essential functions throughout the life. In each of the parts that compose it will appear statoacoustic cellular structures in charge of performing these functions. The VIII cranial pair gains importance in the transmission of the nerve impulses received by these structures to the nervous system. An injury or malformation of this nerve can affect both the auditory system and the vestibular system.

Working hypothesis: The study of the distribution of Pou4f1 in late stages will improve the understanding of the formation of the VIII cranial pair.

Objective: To perform a descriptive study of the distribution of the proteins β -Galactoxidasa and Islet1 during the embryonic development of the auditory system in the mouse Pou4f1TAULacZ.

Materials and methods: This study has been developed using immunohistochemical method and basic histological staining in mouse embryo brain sections at three different stages.

Results: The marker Pou4f1 shows the development of the VIII cranial pair. The Islet1 marker, shows the sensitive epithelium of the area and the histological staining reveals cellular structures. The neural components of the auditory system are shown in different stages.

Discussion: The present study follows the research of one earlier in very early stages, where we also described the expression of genes used in proliferating cells.

Conclusions: It is concluded that the mouse used allows to observe the formation of the VIII cranial pair, both its neuronal populations and its axonal projections.

Key words: Embryology, VIII cranial pair, auditory/vestibular system, Pou4f1, Islet1.

INTRODUCCIÓN

Funciones tan importantes como la audición, el lenguaje y el mantenimiento del equilibrio dependen, fundamentalmente, del desarrollo embrionario del sistema auditivo.^{1,2}

Este desarrollo comienza hacia los 22 días de la gestación gracias a una serie de fenómenos inductivos donde se puede apreciar que el ectodermo superficial sufre tres inducciones; por parte de la notocorda, por el mesodermo paraaxial y, por último, a cada lado del rombencéfalo, el ectodermo sufre un engrosamiento llamado placoda auditiva que dará lugar al oído interno, constituido por el órgano vestibulococlear, imprescindible para desarrollar la audición y el equilibrio.^{3,4}

Hacia la 4ª semana, dicho engrosamiento se separa e invagina formando las vesículas óticas o auditivas. Durante su formación se desprende un pequeño grupo de células que formarán el ganglio estatoacústico.³

- La vesícula auditiva se divide en dos segmentos:

1. Segmento sacular ventral: el sáculo y el conducto coclear son originarios de éste.

El conducto coclear (porción vestibular del caracol), hacia la 8ª semana, cuenta con dos vueltas y media de espiral y queda conectado mediante un conducto estrecho llamado conducto de Hensen con el sáculo. El conducto coclear queda rodeado de mesénquima que pronto se diferenciará en cartílago, el cual, hacia la 10ª semana, experimenta vacuolizaciones para formar dos espacios perilinfáticos; rampa vestibular y rampa timpánica. En este periodo, la rampa vestibular y el conducto coclear quedan separados por la llamada membrana vestibular y, mediante la membrana basilar, el conducto coclear queda separado de la rampa timpánica.³

La pared interna del conducto coclear no se separa, si no que queda unida y sostenida por la columela, larga porción cartilaginosa y futuro eje del caracol óseo.¹

El conducto coclear posee células epiteliales que dan lugar a dos crestas; la interna formará el limbo de la lámina espiral y, la externa, hileras de células ciliadas cubiertas por la membrana tectoria. Las células ciliadas junto la membrana tectoria forman el órgano de Corti situado en la membrana basilar.³ La función de este órgano consistirá en transmitir los impulsos nerviosos que recibe al ganglio espiral y, posteriormente, mediante el VIII par craneal (nervio estatoacústico o vestibulococlear) al sistema nervioso.⁵

2. Segmento utricular dorsal: da origen al utrículo, al conducto endolinfático y a los tres conductos semicirculares hacia la 5-6ª semana donde son necesarios factores de transcripción. Dichas estructuras epiteliales junto al sáculo, dan nombre al laberinto membranoso que contiene la endolinfa.^{1,5}

Del utrículo se originan los conductos semicirculares, dónde en uno de los extremos de éstos se sitúan las crestas, unas contienen ampollas y otras no. Las crestas ampollares poseen células ciliadas receptoras encargadas de detectar las aceleraciones angulares de la cabeza permitiendo la orientación y el mantenimiento del equilibrio durante el movimiento aún con los ojos cerrados. Dichas células también permiten la fijación de un objeto con la mirada.¹

En las crestas ampollares, donde no se hallan células receptoras, se observa una masa gelatinosa, llamada cúpula, donde quedan incrustados los cilios de éstas células.¹

El utrículo y el sáculo se sitúan en el vestíbulo, cavidad ósea situada en la región media del oído y, sus bolsas, se encuentran interconectadas por las ramas del conducto endolinfático.⁶

El sáculo es de menor tamaño y se sitúa en la región anteroinferior del vestíbulo comunicado con el caracol mientras que, el utrículo, se localiza en la región posterosuperior de éste conectado con los canales semicirculares.

Estas dos expansiones del laberinto membranoso denominadas vesículas vestibulares hallan en su interior las llamadas máculas, células ciliadas, sensitivas o de sostén, que poseen receptores de equilibrio estático y dinámico en aceleraciones lineales. Los cilios de estas células están cubiertos por una capa gelatinosa, membrana otolítica, que contiene cristales de carbonato cálcico, otolitos.

Una vez desarrollada la primera de las tres partes que constituyen el oído comienza la formación del oído medio compuesto por la cavidad timpánica, el conducto auditivo interno y tres pequeños huesecillos auditivos que conectan la capa interna de la membrana timpánica con la ventana oval del oído interno.⁴

La formación, de origen endodérmico, de la cavidad timpánica y del conducto auditivo interno, parte de una expansión de la primera bolsa faríngea denominada seno tubotimpánico. La parte distal de éste se ensancha y da lugar a la cavidad timpánica mientras que la parte proximal se mantiene estrecha y origina el conducto auditivo o trompa de Eustaquio que comunica dicha cavidad con la nasofaringe.³ Del conducto auditivo interno salen prolongaciones centrales que forman los nervios sacular, utricular y ampulares cuya unión, da origen a la porción vestibular del VIII par craneal.¹

Durante la primera mitad de la vida fetal se forman los huesecillos auditivos que, hasta el octavo mes se encuentran incrustados en el mesénquima. Finalmente, este último sufre un proceso apoptótico y quedan liberados. La cavidad timpánica los envuelve gradualmente y quedan extendidos entre la superficie interna de la membrana timpánica y la ventana oval. Del cartílago del primer arco faríngeo son originarios el martillo, incrustado en él, el músculo tensor del

tímpano inervado por la rama maxilar superior del V par craneal, y el yunque mientras que, el estribo es un derivado del cartílago del segundo arco. En él, está incrustado el músculo estapedio inervado por el VII par craneal.^{3,4}

Durante la última parte del período fetal, la cavidad timpánica sufre una expansión y da lugar al antro mastoideo, cavidad aérea existente en la apófisis mastoides del hueso temporal que comunica el tímpano con las celdillas mastoideas que hacia los dos años de edad completan su desarrollo y refuerzan la audición del sonido.⁴

La parte más externa del oído se conoce como oído externo y deriva de tejido mesenquimatoso del primer y segundo arco faríngeo. Está compuesto por el conducto auditivo externo, tímpano o membrana timpánica y por el pabellón auricular.

El conducto auditivo externo comunica la parte más externa del oído con la membrana timpánica. Al principio del tercer mes, se forma una placa epitelial sólida llamada tapón meatal que se debe disolver durante el séptimo mes para participar en la formación del tímpano definitivo, si esto no ocurre, se provoca sordera congénita.³

El tímpano, membrana timpánica, se desarrolla a partir de tres orígenes:

- El ectodermo formará la cubierta epidérmica en el fondo del conducto auditivo
- El mesodermo formará la capa intermedia de tejido conjuntivo
- El endodermo formará el revestimiento epitelial de la cavidad timpánica

Una gran parte del tímpano se encuentra unida al manubrio del martillo mientras que, la porción restante, separa el canal auditivo externo de la cavidad timpánica.

Las ondas sonoras en el aire entran en el conducto auditivo externo y golpean la membrana timpánica haciendo que vibre. Las vibraciones son transportadas a través de la cavidad del oído medio por la cadena de los tres huesecillos hasta la ventana oval de la cóclea.

Por último, el pabellón auricular se origina a partir de seis proliferaciones mesenquimatosas, tres a cada lado del conducto auditivo externo. Más tarde, dichas proliferaciones se fusionan y dan lugar al pabellón auricular definitivo. El lóbulo de la oreja es la última parte en desarrollarse del pabellón auricular.

Las orejas comienzan su desarrollo en la base del cuello, pero, a medida que la mandíbula va desarrollándose, las orejas adoptan su posición a ambos laterales de la cabeza.^{3,4}

Como ya se ha hablado anteriormente, en el oído reside el sistema vestibular; utrículo, sáculo y los tres canales semicirculares, utilizado, principalmente, para regular la postura y coordinar los movimientos de los ojos y la cabeza en el espacio. Los elementos encargados de recibir esta información son las células ciliadas localizadas tanto en las crestas ampollares de los conductos semicirculares que aportan información acerca de la magnitud y la dirección de las aceleraciones angulares en el plano de cada conducto, como en las máculas del utrículo y sáculo, situadas en ángulo recto y en posición horizontal y vertical respectivamente. Los órganos otolíticos detectan la posición de la cabeza respecto de la gravedad y responden a la aceleración lineal: el utrículo en las direcciones paralelas al movimiento e intraauricular, y el sáculo en las direcciones dorsoventrales y paralela al movimiento. Son los responsables de las funciones estáticas como el control de la postura.⁷

Cuando se origina un cambio en la posición del cuerpo, el neurotransmisor liberado por las células ciliadas tanto en las ampollas como en las máculas se dirige a las prolongaciones periféricas de las neuronas sensitivas primarias del VIII par craneal, cuyos cuerpos celulares forman el ganglio vestibular (de Scarpa) situado en el conducto auditivo interno. Las

prolongaciones centrales de dichas neuronas dan origen a la parte vestibular del VIII par craneal que reside en el tronco encefálico al nivel de la unión pontobulbar.⁷ Estas prolongaciones viajan con los aferentes cocleares a través del conducto auditivo interno hasta los núcleos vestibulares en la unión de la protuberancia y el bulbo raquídeo.⁸

Dicho par craneal, el nervio vestibulococlear, transporta dos tipos de información: vestibular (equilibrio) y auditiva.⁸

Los núcleos vestibulares integran señales del aparato vestibular con aferencias sensitivas de la médula espinal, el cerebelo y el sistema visual, y coordinan actividades motoras involucradas en los movimientos oculares y esqueléticos. Todos los núcleos vestibulares envían una pequeña cantidad de axones a través del tálamo hacia la corteza cerebral, más concretamente a la corteza somatosensitiva, que, gracias a ello, se llega a tener una apreciación consciente del equilibrio y la posición de la cabeza.⁸

Las fibras vestibulares alcanzan el tálamo bilateralmente, algunas viajan con las fibras auditivas y, otras, atraviesan la formación reticular.

Varias áreas corticales reciben información vestibular desde el tálamo; una de ellas está situada en el lóbulo parietal, donde parten funciones principales como la interpretación de la posición del cuerpo de acuerdo con otros objetos a su alrededor, la integración y el procesamiento de la información sensorial, el procesamiento de la información simbólica (lenguaje) y el procesamiento de la información numérica. Otra de las áreas se sitúa en el surco central y otra, la que puede estar más relacionada con la información vestibular, se encuentra en la parte posterior de la ínsula, cerca de la corteza auditiva.⁹

Por lo que estimulando el sistema vestibular mediante cualquier movimiento de cabeza o cambio de posición controlado, estaremos estimulando alguna combinación de células ciliadas

receptoras vestibulares. Esta estimulación favorecerá a los mecanismos de control postural, tono muscular, control óculo-motor, coordinación motora bilateral, seguridad gravitacional y desarrollo del lenguaje entre otros.

Dado que el nervio vestibular afecta tanto a los movimiento oculares como los posturales, su función puede evaluarse observando el nistagmo, movimiento espasmódico involuntario y rápido de los globos oculares. Dicha evaluación es muy eficaz cuando existe sospecha del posible déficit en el sistema vestibular ya que la presencia de un nistagmo inapropiado puede indicar patología de la vía vestibular en algunas circunstancias.⁸

Por ello, es tan importante el buen desarrollo del oído durante el proceso embriológico y de cada una de sus estructuras. Se hace hincapié en la importancia del sistema vestibular y en su buena estimulación mediante actividades que promuevan la activación de este sistema puesto que, a partir de algún déficit en éste, se puede dar lugar a un mal procesamiento sensorial de este propio sistema, una falta de orientación espacial, control postural, pérdida de equilibrio tras cambios de posición, pobre mantenimiento de la postura y de una mirada fija e, incluso, la estimulación de éste, puede verse reflejado en el desarrollo del habla incrementando el lenguaje verbal espontáneo.¹⁰

El buen funcionamiento o no de este sistema puede llegar a interrumpir el desarrollo normal de las actividades de la vida diaria de una persona.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El ratón Pou4f1TAULacZ es una buena herramienta para estudiar la formación del VIII par craneal observando las dos ramificaciones que sufre este nervio, la acústica y la vestibular imprescindibles para el desarrollo de la audición, lenguaje y mantenimiento de equilibrio.



OBJETIVO

Llevar a cabo un estudio de la distribución de la proteína beta – Galactosidasa (β - Gal) durante el desarrollo embrionario del sistema auditivo en comparación con la proteína Islet1.



MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se ha llevado a cabo durante el periodo de tiempo comprendido entre el 16 de enero de 2017 y el 3 de abril de 2017 en el laboratorio 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

Se ha realizado un estudio observacional descriptivo, consistente en el análisis de 3 muestras de embriones de ratones en 3 estadios diferentes. . El ratón fue elegido como modelo por su similitud (siendo un vertebrado mamífero) con el humano. La cepa elegida fue Pou4f1TAULacZ¹¹, cepa transgénica que contiene la enzima β -Gal bajo el promotor del gen Pou4f1. La construcción génica contiene también la secuencia TAU que transporta dicho enzima por las prolongaciones neuronales. Esta herramienta nos será útil para estudiar el desarrollo de los pares craneales ya que el gen Pou4f1 se expresa en todos los ganglios neuronales.

Una vez seleccionados los embriones (E12.5, E15,5 y E17.5) con el fin de estudiar en profundidad el desarrollo embrionario del oído y los distintos patrones de distribución de los genes/marcadores de interés, se usó la técnica de inclusión en parafina. Los embriones fueron inmersos en butanol (2 cambios de 45 minutos) para retirar toda traza de etanol (no miscible con la parafina). A continuación, las muestras fueron incubadas en parafina líquida a 60°C, donde se realizaron entre 5 y 6 cambios de 30 minutos con el fin de eliminar totalmente los restos de butanol.

Una vez incluidas las muestras, se depositaron en 3 moldes de plástico, cada estadio en un molde (NM1- E12.5, NM2- E15.5 y NM3- E17.5), con forma de cubo donde se orientaron los embriones para realizar un corte coronal y se dejó solidificar la parafina a temperatura ambiente.

Cuando la parafina se solidificó, se extrajo el bloque del molde y se procedió a su sección, realizándose los cortes con un microtomo (Microm HM 335 E[®]). El grosor de cada sección se fijó en 10µm. Los cortes fueron montados en portaobjetos en 4 (E12.5), 5 (E15.5) y 6 (E17.5) series paralelas con la ayuda de un baño de agua templada.

Después de secar los cortes a 37°C durante un día, se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Posteriormente, se procedió a la realización de una técnica inmunohistoquímica y otra de tinción histológica básica llamada cresil violeta o tinción de Nissl para comenzar el estudio de las muestras.

A continuación se procede a describir la técnica de inmunohistoquímica empleada:

Esta técnica permite detectar la expresión de una variedad de antígenos presentes en las células. Se basa en aplicar un anticuerpo primario al tejido que reconozca la proteína de interés, para después añadir un anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconozca el anticuerpo primario, amplificando así la señal y posibilitando el revelado posterior.

Los cortes de parafina fueron desparafinados en xilol (disuelve la parafina) durante una noche. Al día siguiente los cortes fueron rehidratados en una serie decreciente de alcoholes al 100%, 96%, 70% hasta agua. Cada paso fue de 10 minutos.

Posteriormente se procedió a una técnica de re-exposición de los epítomos. La técnica consiste en la aplicación de calor por hervido en un tampón de citrato sódico a 0,01M en agua. El hervido se llevó a cabo en un microondas a 750 vatios de potencia en 4 tiempos de 4 minutos. En el anexo (*Tabla 1. Lista de anticuerpos y concentraciones utilizados en la técnica de*

immunohistoquímica) se detallan los dos anticuerpos utilizados en este estudio, la concentración a la que se usaron, si necesitaron hervido o no y qué anticuerpo secundario se usó.

Después del tratamiento, los cortes fueron lavados en PBS con tritón (PBST) al 0,1% para eliminar los restos de citrato sódico. A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido con H_2O_2 durante 30 minutos a temperatura ambiente en un copling protegido de la luz. Y para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se utilizó lisina al 10% en PBST. El anticuerpo primario se incubó a la concentración indicada en albúmina de suero bovino (BSA) al 1% con azida al 0,1% en PBST. Se dejó actuar durante una noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron los portaobjetos varias veces en PBST. Se usó el anticuerpo secundario biotinilado a 1:200 de concentración en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PBST se añadió el complejo ABC (Avidin Biotin Complex) de Vector Laboratories^(R) a la concentración de 1:300 en PBST. Este complejo contiene avidina y la peroxidasa del rábano biotinilada. La avidina tiene una gran afinidad por la biotina y forma un complejo donde se unen la peroxidasa biotinilada a la avidina dejando al menos un sitio de unión libre para la biotina del anticuerpo secundario. Al añadirlo a los portaobjetos, la avidina se une al secundario biotinilado y ancla la peroxidasa al lugar de expresión de la proteína. Para el revelado se usó como substrato de la peroxidasa 1 ml de diaminobenzidina (DAB) con H_2O_2 al 0,6% y 0,025 mg de níquel por cada 100ml de PBS. El níquel provoca que el precipitado aparezca de color negro en vez del marrón habitual de la DAB. Se muestra un esquema de este proceso en el anexo final (*Figura 1. Técnica de inmunohistoquímica*). La reacción se paró con PBS y se deshidrataron los portaobjetos en una serie creciente de etanoles hasta llevarlos a 100% etanol, desde donde se pasaron a xilol, para luego montarlos con Eukitt^(R) (cubreobjetos) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C.

Los dos anticuerpos usados fueron anti- β -gal para detectar el encima de la construcción génica y anti-Islet1. Este último es un factor de transcripción que se localiza en epitelios sensitivos, motoneuronas y ganglios neuronales.

Tras el procesamiento de las muestras, éstas fueron conservadas en el laboratorio hasta el inicio del presente estudio, cuando se procedió al análisis microscópico de las muestras y posterior toma de fotografías de las secciones consideradas de interés. Para visualizar las muestras se utilizó el microscopio esteroscópico de fluorescencia manual modelo LEICA^(R) MZ 16FA (motorizado) a 10 aumentos y para realizar las fotografías se utilizó una cámara digital de alta resolución modelo LEICA^(R) DC500.

Posteriormente se llevo a cabo el tratamiento de fotos con el software de edición de imagen Adobe Photoshop Cs6 y se montaron las figuras con el programa de maquetación Adobe Illustrator Cs6. Se obtuvieron 4 figuras, en 3 de ellas se observará el proceso de formación de las estructuras auditivas comparado lo marcado por cada gen y en otra, se observará el recorrido y las ramificaciones del VIII par craneal.

RESULTADOS

A continuación se va a proceder a describir las figuras obtenidas de la formación de las estructuras estatoacústicas a lo largo del desarrollo embrionario (*Figura 2. E12.5*), (*Figura 3. E15.5*), (*Figura 4. E17.5*) y (*Figura 5. Comparativa entre los tres estadios del recorrido de las fibras nerviosas del VIII par craneal*)

En el primer estadio analizado, podemos observar con el marcaje contra la proteína β -Gal como las fibras del octavo par craneal ya han formado un esbozo del nervio (*VIII_n*) acercándose a los componentes acústicos (*acus*) y vestibulares (*vst*; *Figura. 2A, D y G*). Gracias al marcaje contra la proteína Islet1 podemos observar tanto el nervio mencionado anteriormente como el epitelio sensitivo de la región acústica y vestibular (*flechas en Figura. 2B, E y H*). Cabe destacar que este marcaje nos permite también observar las neuronas pertenecientes al núcleo abducens o VI par y al núcleo facial o VII par. Por último, realizamos una tinción histológica básica para desvelar en su totalidad todas las estructuras celulares presentes en la sección (*Figura. 2C, F e I*). Se puede observar en esta serie de secciones que la vesícula ótica es una única estructura que se va alargando y diferenciando para dar lugar a todos los componentes de este aparato.

En el segundo estadio analizado, se observa como las fibras del VIII par se desplazan hasta cubrir toda la parte coclear en los ganglios espirales (*flechas en Figura 3A y D*), encargados de transmitir el impulso nervioso a este nervio y, posteriormente, al sistema nervioso. Este nervio sufre dos ramificaciones, hacia arriba se observa la parte vestibular (*vst.*), responsable de transportar la información sobre el equilibrio, cómo se va alargando y orientando hacia los canales semicirculares y, hacia abajo, la rama coclear (*acus.*) que transporta la información del sonido (*Figura. 3G*). El nervio vestibulococlear o estatoacústico se trata de un nervio aferente de tipo sensorial y gracias al marcaje contra la proteína Islet1 podemos ver marcado toda la zona sensitiva de éste (*flechas en Figura 3B, E y H*). En este estadio, realizando la tinción histológica,

se empieza a observar la aparición de cartílago que posteriormente osificará alrededor de las estructuras sensitivas del oído interno (*Figura. 3C, F e I*)

En el último de los estadios analizados, la estructura sigue desarrollándose y optando la forma del pabellón auricular. Las dos ramificaciones del VIII par quedan bien diferenciadas y cada una de éstas va cubriendo las estructuras que inervará (*Figura. 4A, D y G*). Se puede observar el núcleo del nervio trigémino (*V*) y la estría acústica dorsal compuesta por fibras acústicas (*ead*). Gracias al marcaje contra la proteína Islet1 seguimos observando el epitelio sensitivo de la zona (*flechas en Figura 4B, E y H*), así como las neuronas del VII par o nervio facial que migran y van ocupando su lugar y el núcleo de la parte motora del X par o nervio vago. En la última columna, gracias a la tinción histológica, seguimos observando el marcaje en un lila más oscuro del cartílago adoptando la forma final del oído interno y como empiezan a aparecer pequeños núcleos de osificación en dicho cartílago.

En la última de las figuras (*Figura. 5*) se compara los componentes neuronales del tracto de los tres estadios analizados. En una sucesión progresiva de los estadios, se puede observar como los núcleos cocleares de las neuronas del VIII par van formando las fibras nerviosas de esta ramificación acústica (*Figura. 5A, B y C*). Éstas van creciendo hacia abajo hasta contactar con el complejo olivar inferior (OI), importante componente neuronal de la vía auditiva (*Figura. 5G, H e I*)

Por último, la tinción histológica, nos permite observar como de un estadio a otro, las estructuras celulares estatoacústicas se van desarrollando, en este caso, vemos con detalle el comienzo de formación de los canales semicirculares (*Figura. 5E, F y L*).

DISCUSIÓN

El sistema auditivo, más concretamente el oído interno, es una de las estructuras más elaboradas entre los órganos de los mamíferos por ello, los procesos embrionarios de las estructuras celulares que lo componen cuentan con una especial importancia para el desarrollo del ser humano.

Artículos publicados anteriormente por Deng y coautores ¹² utilizaron los marcadores POU4f1 e Islet1, los mismos que en el presente estudio, para observar el desarrollo de los pares craneales. Con especial atención a la neurogénesis sensorial y a su posible defecto. El primero de los marcadores se expresa en todos los ganglios neuronales y, el segundo, en epitelios sensitivos, motoneuronas y ganglios neuronales también

Dicho estudio está centrado en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario (E9.5, E10,5 y E11.5) donde han realizado una comparativa de los marcadores expresados en las fibras nerviosas y en el epitelio sensorial durante el desarrollo de las neuronas en el oído interno. Por lo tanto, no era todavía conocido como se comportaban estos marcadores a partir de la media gestación. Cabe destacar que en nuestro estudio hemos encontrado que los genes POU4f1 e Islet1 se expresan en las células proliferantes al igual que fue descrito en los estadios más jóvenes.

El hecho de que estos genes sigan expresándose de forma correcta hasta el E17.5 (el embrión de ratón nace a los 18 días) hace suponer que, en lo que refiere a los ganglios neuronales, motoneuronas y epitelio sensitivo, el desarrollo óptimo de estas estructuras necesita el mantenimiento de la función de los dos genes analizados.

CONCLUSIONES

El ratón Pou4f1TAULacZ y sus respectivos embriones utilizados en el presente estudio en estadios 12.5, 15.5 y 17.5 nos ha permitido observar la formación y distribución del VIII par craneal o nervio vestibulococlear/estatoacústico. Así mismo ha sido posible observar el comienzo de la formación de algunas de las estructuras estatoacústicas y poblaciones neuronales integradas en la vía auditiva.

Por tanto, esto confirma nuestra hipótesis planteada. Este modelo transgénico presenta una gran utilidad para estudiar los procesos de formación y sus posibles alteraciones a lo largo del desarrollo embrionario. La importancia de una buena comprensión de los procesos embrionarios que dan lugar a la formación del sistema auditivo y vestibular es vital para poder comprender las malformaciones o déficits en ambos sistemas provocados por lesiones o malformaciones en el oído interno o en el VIII par craneal repercutiendo en el desarrollo de la vida diaria de quien lo sufre.

ANEXOS DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Lista de anticuerpos y concentraciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

| Anticuerpo | Concentración | Hervido | Ac. 2 ^{ario} | Casa comercial |
|-----------------------|---------------|---------|-----------------------|----------------------------|
| α Islet1 | 1:300 | Si | α Mouse | Hybridoma Bank N°39.4D5 |
| β Galactoxidasa | 1:500 | Sí | α Chicken | Abcam ab9361 |



Figura 1. Técnica de inmunohistoquímica.

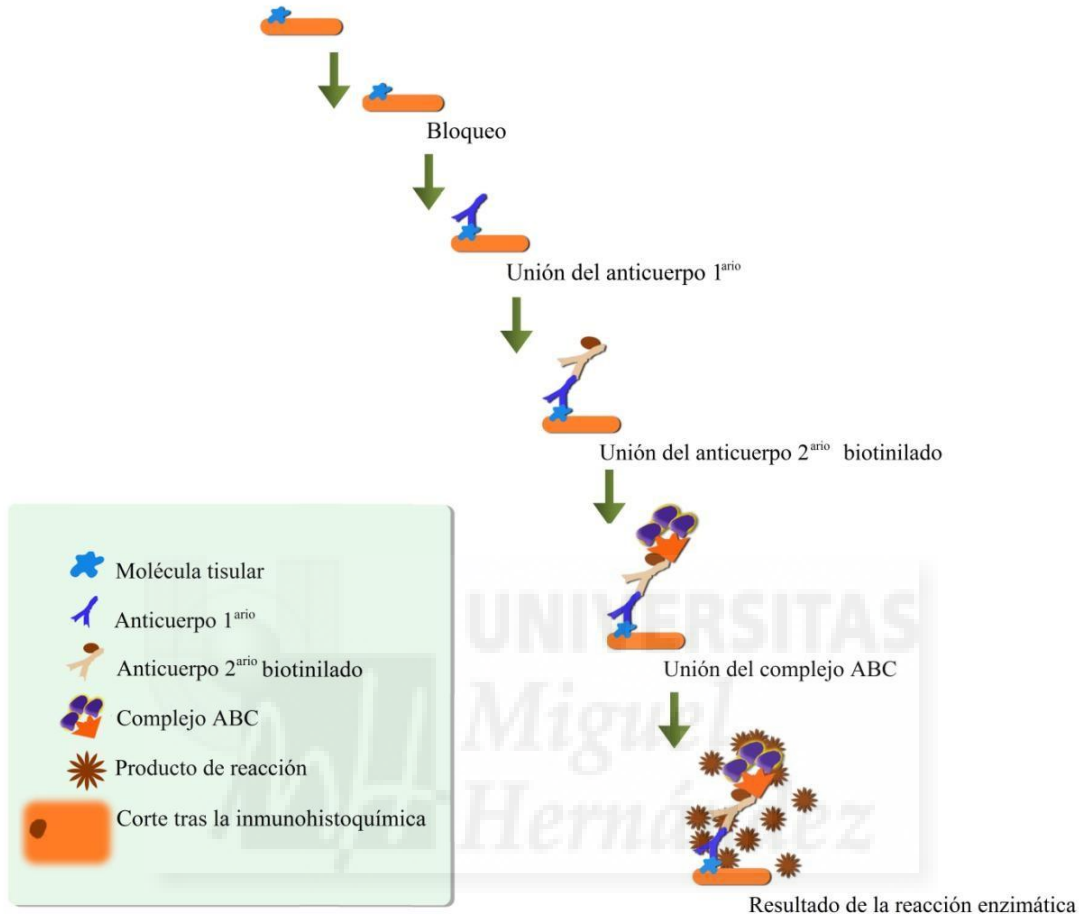
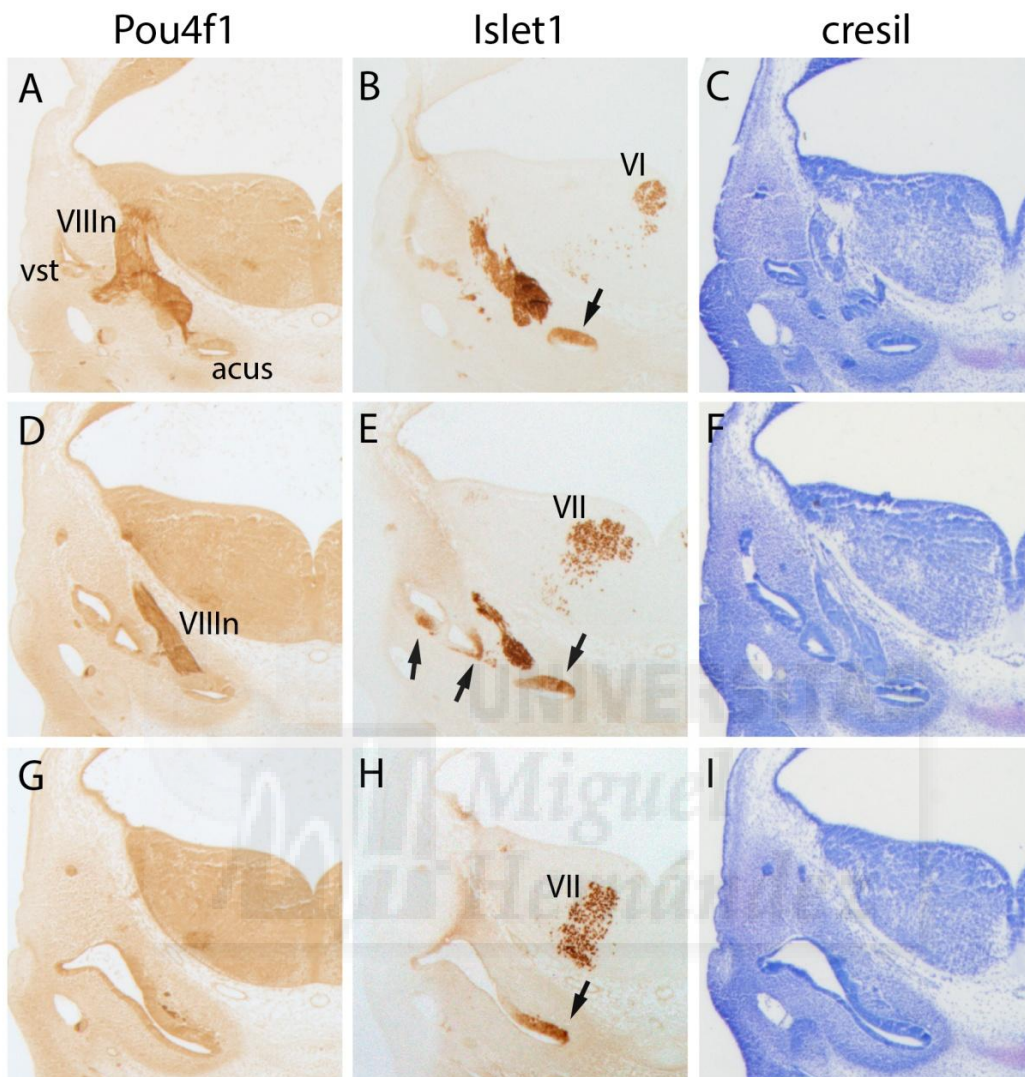
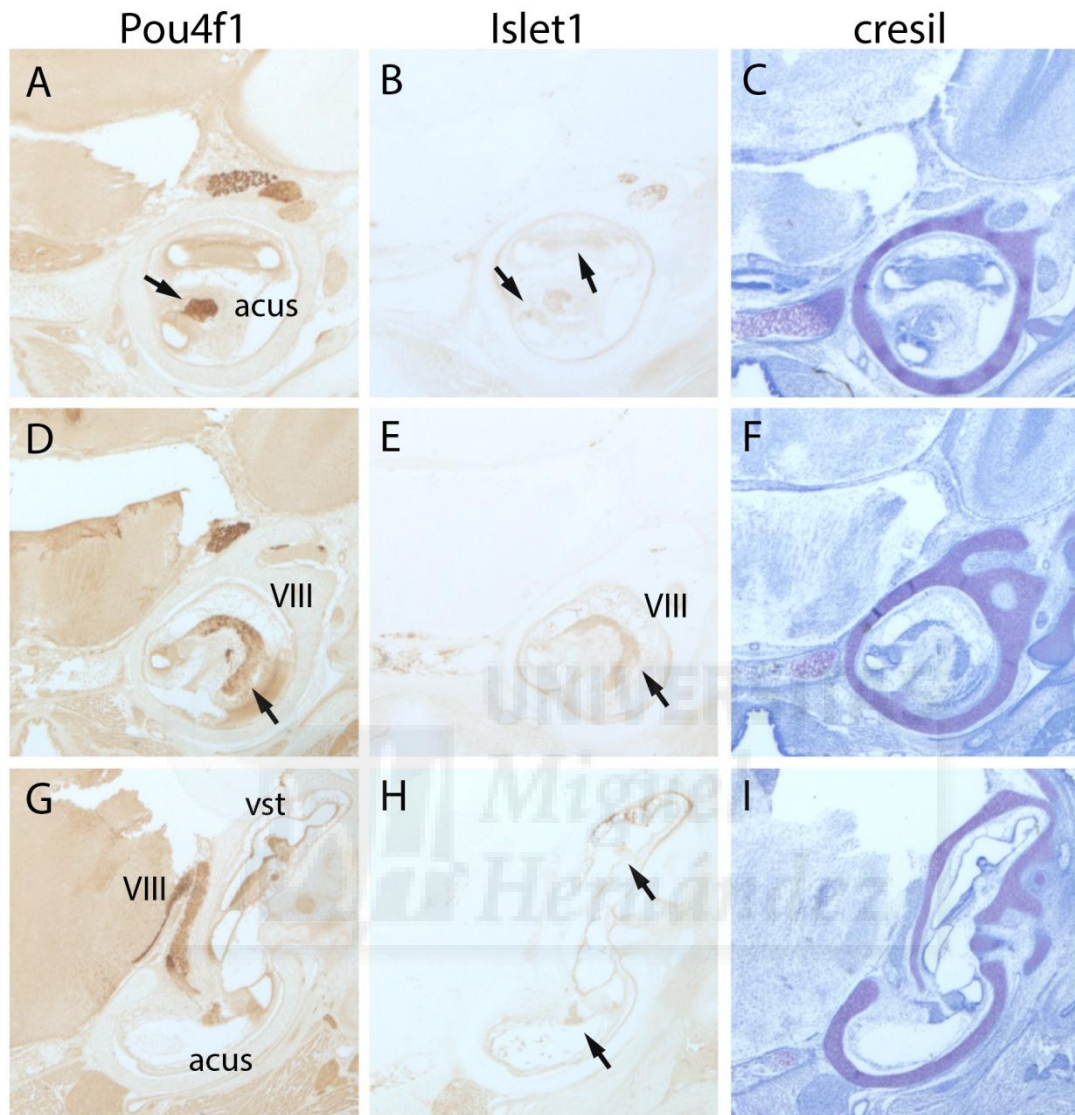


Figura 2. Estadio de gestación de 12.5 días.



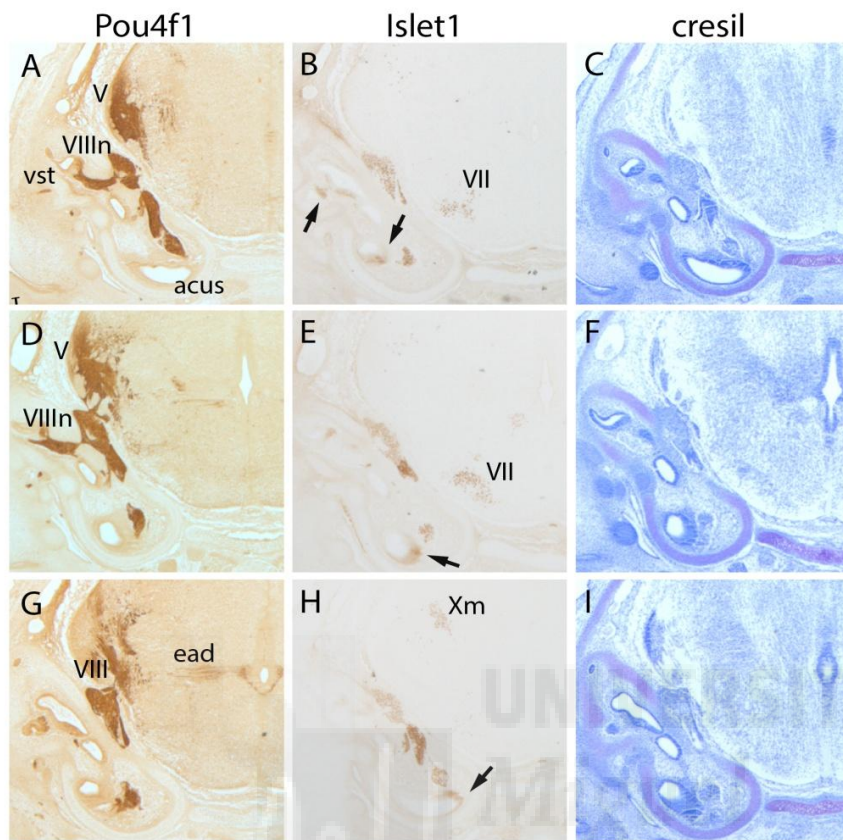
Abreviaturas: VIIIIn (núcleo del VIII par craneal/ nervio vestibulococlear o estatoacústico), vst (ramificación vestibular del VIII par craneal), acus (ramificación acústica del VIII par craneal), VI (núcleo del VI par craneal/ nervio abducens), VII (núcleo del VII par craneal/ nervio facial).

Figura 3. Estadio de gestación de 15.5 días.



Abreviaturas: VIII (recorrido del VIII par craneal/ nervio vestibulococlear o estatoacústico), vst (ramificación vestibular del VIII par craneal), acus (ramificación acústica del VIII par craneal).

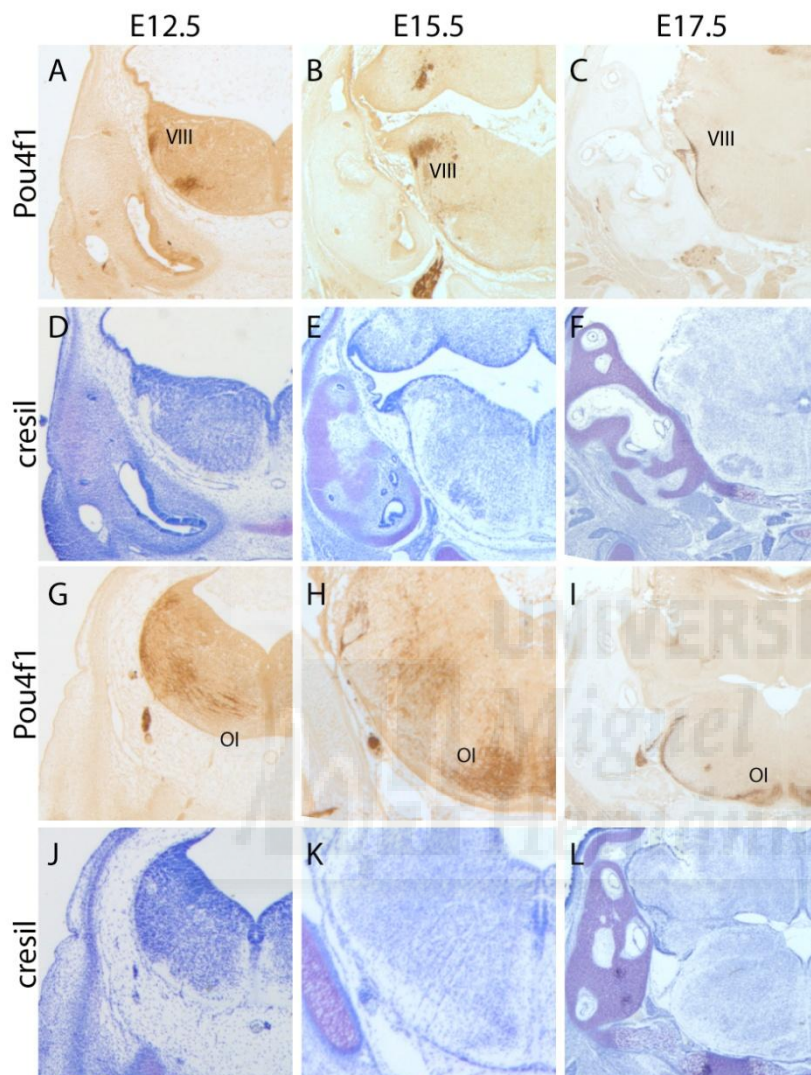
Figura 4. Estadio de gestación de 17.5 días.



Abreviaturas: VIIIIn (núcleo del VIII par craneal/ nervio vestibulococlear o estatoacústico), VIII (recorrido del VIII par craneal), vst (ramificación vestibular del VIII par craneal), acus (ramificación acústica del VIII par craneal), VII (núcleo del VII par craneal/ nervio facial), V (núcleo del V par craneal/ nervio trigémino), ead (estría acústica dorsal), Xm (núcleo de la parte motora del X par craneal/ nervio vago).

En las **Figuras 2, 3 y 4** se ha realizado una sucesión de cortes coronales en la parte medial de la cabeza. **A, D y G:** Se ha utilizado una tinción inmunohistoquímica para el gen POU4f1 expresado en todos los ganglios neuronales. **B, E y H:** Se ha utilizado una tinción inmunohistoquímica para la proteína Islet1 expresada en el epitelio sensitivo, motoneuronas y ganglios neuronales. **C, F e I:** Se ha utilizado una tinción histológica básica llamada cresil violeta o tinción de Nissl que marca las estructuras celulares presentes en la sección.

Figura 5. Comparativa entre los tres estadios del recorrido de las fibras nerviosas del VIII par craneal.



Abreviaturas: VIII (recorrido del VIII par craneal/ nervio vestibulococlear o estatoacústico), OI (complejo olivar inferior).

5A, B, C, G, H e I: Se ha utilizado una tinción inmunohistoquímica para el gen POU4f1 expresado en todos los ganglios neuronales. **5D, E, F, J, K y L:** Se ha utilizado una tinción histológica básica llamada cresil violeta o tinción de Nissl que marca las estructuras celulares presentes en la sección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith-Ágreda JM. Anatomía de los órganos del lenguaje, visión y audición. Ed. Médica Panamericana. 2004; 17: 197-208.
2. Smith-Ágreda JM. Anatomía de los órganos del lenguaje, visión y audición. Ed. Médica Panamericana. 2004; 18: 209- 214.
3. Sadler TW, Langman J. Embriología médica: con orientación clínica. Oído. 12ª ed: Ed. Médica Panamericana; 2012. p. 335-343.
4. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Embriología clínica. Desarrollo de los ojos y los oídos. 10ª ed: Ed. ELSEVIER; 2016. p. 428-434.
5. Contrera FH, Pérez RC, Amat AM. Embriología, anatomía y fisiología del oído. Fundamentos anatómofuncionales del cerebro humano. Propedéutica para una neurociencia aplicada e integrada. 2015; 1: 1-11.
6. Arruñada, F. Anatomía del aparato vestibular. Rev. FASO. 2015.
7. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. El sistema nervioso central humano. Sistema vestibular. Vol 2. 4ª ed: Ed. Médica Panamericana; 2009. p. 715-733.
8. Wilson-Pauwels L, Akesson E, Stewart P, Spacey S. Nervios craneales. En la salud y la enfermedad. Nervio vestibulococlear. 2ª ed: Ed. Medica Panamericana; 2003. p. 126-169.

9. Gentile M. Functional visual behaviour in children: An occupational therapy guide to evaluation and treatment options. Titulo capitulo. 2ª ed. ; 2005. p. 368-373.
10. Chacko L, Pechriggl E, Fritsch H, Rask- Andersen H, Blumer M, Schrott-Fischer A et al. Neurosensory differentiation and innervation patterning in the human fetal vestibular end organ between the gestational weeks 8-12. 2016; 10: 111.
11. Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y et al. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. J Neurosci. 2005; 25(50): 11595-604.
12. Deng M, Yang H, Xie X, Liang G, Gan L. Comparative expression analysis of POU4F1, POU4F2 and ISL1 in developing mouse cochleovestibular ganglion neurons. Gene Expression Patterns. 2014; 15(1): 31-37