UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

Implicación de las vías de señalización del ácido retinoico en la especificación del epitelio ótico durante el desarrollo embrionario de aves

SHEILA CARDEÑA NÚÑEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMARCADORES DE SALUD Y ESTADOS PATOLÓGICOS

Conformidad del director y coodirector:

Matías Hidalgo Sánchez

Luis Óscar Sánchez Guardado

Esta tesis cuenta con la autorización del director y el coodirector de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2023

Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar.

Hipatia de Alejandría

Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para temer menos.

Marie Curie

Un país sin investigación es un país sin desarrollo.

Margarita Salas Falgueras

«En realidad, habría que ir más allá de la dicotomía, haciendo una alabanza de la diversidad de los científicos, cuyos estilos personales son variadísimos, igual que ocurre con los músicos o los escritores. Aquellos que ven la ciencia como un puro desarrollo lógico, en el que los elementos humanos deben reprimirse en aras de la objetividad, ignoran que su riqueza está también en las emociones, las costumbres y los estilos de quienes la crean. Por eso dice el historiador George Sarton (G. Sarton, 'The study of the history of science', Dover Publications, New York, 1957) "así como se necesitan toda clase de hombres para formar una comunidad, así también son necesarios toda clase de científicos para empujar la ciencia en todas las direcciones posibles. Algunos son profundos, pero de mente estrecha, otros, superficiales y de mente amplia. Muchos, como Aníbal, saben conquistar, pero no utilizar sus victorias. Otros son colonizadores, más no exploradores. Algunos son pedagogos. Otros quieren hacer medidas más precisas que nadie …" Esto es bueno, porque el proceso del descubrimiento es múltiple, variado y diverso. El día que todos los científicos sean del mismo talante vital, la ciencia se estancará completamente."»

Antonio Fernández-Rañada, "Los muchos rostros de la ciencia", Premio Internacional de ensayo Jovellanos. Ediciones Nobel, 1995. ISBN 13: 9788484597209; ISBN 10: 8484597202. Pág. 55-56.

A mi madre Anabel, por sostenerme cada vez que no he tenido fuerzas, por desvelarse con cada problema y por saltar de alegría con cada logro.

A mi abuelo Severiano y mi abuela Julia, por estar siempre conmigo, aunque no estén.

AGRADECIMIENTOS

“Si se quiere ascender por cuestas empinadas, es necesario al principio andar despacio” - William Shakespeare.

Porque esta tesis ha sido una cuesta empinada, serpenteante, con tramos arenosos en los que los pies se hundían y retrocedían en lugar de avanzar, tramos pedregosos en los que no se sabía dónde pisar, y tramos fangosos de estancamiento.

Si bien es cierto que una tesis, a pesar de llevar el nombre de un estudiante, es un trabajo de muchos, con aportaciones grandes y pequeñas, pero que forman parte del trabajo final, y sin las cuales el trabajo no sería el que es, mejor o peor, pero único.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi codirector Luis Óscar Sánchez Guardado; y a mi tutor y director Matías Hidalgo Sánchez, por darme una segunda oportunidad de poder realizar una labor científica. Cuando la situación parecía insostenible y estancada, y aunque los problemas siempre han sido una constante de esta aventura, ha podido hacer los ajustes necesarios para que no cayéramos.

En segundo lugar, quiero agradecer a la Universidad de Extremadura y al Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, por hacerme un hueco, por darme el lugar donde aprender cada día un poquito. Quiero dar un gracias a todos aquellos que han resuelto mis dudas, que han compartido experiencias, que han dado ánimos, que han perdonado mis torpezas, y que han preguntado de manera sincera cómo estaba.

En tercer lugar, quiero señalar que esta tesis no habría sido posible sin las entidades financiadoras que apuestan por la investigación básica, esa que no tiene una aplicación directa y no aparece en las noticias por sus grandes logros ni por cambiar el mundo, pero sin la cual no habría una base sobre la que avanzar.

En cuarto lugar, a todos a los que debo mi formación actual: al primer maestro, don Juan Sánchez, que despertó mi interés por la Biología; a mi maestro don Agustín y mi profesora doña Carmen, que me enseñaron a escribir correctamente, a ser puntillosa con la gramática; a don Juan González, que me enseñó a hacer los cálculos más sencillos, y a don Justo, que luego los complicó; a mi querido maestro don Pedro, que me enseñó que el futuro se construye sobre el pasado, y que no hay que olvidar a todos los que nos precedieron; a don Estanislao, que me enseñó a mirar una imagen con muchos ojos; a quienes me mostraron las maravillas de la música (que ha sido imprescindible en la enorme cantidad de horas de trabajo de esta tesis); a don Pedro Casero, que me enseñó a mirar por un microscopio; a Javier de Francisco, que me ayudó a comprender la inmunohistoquímica; … a tantos y tantas maestros y maestras, profesores y

profesoras, tutores y tutoras, directores y directoras que han hecho de esta mente más formada, más curiosa, más abierta y ávida de conocimiento.

No puedo olvidar a Eduardo Ortega Rincón y Carlos Gutiérrez Merino, antiguos integrantes de la Comisión Académica de este programa de doctorado, por atender siempre a mis consultas, su interés, preocupación, consejos, paciencia, y saber entender mis circunstancias. Igualmente a dos mujeres que en el último momento han hecho todo lo que estaba en su mano para que esta tesis fuera entregada

En quinto lugar, y el MAS IMPORTANTE, a mi madre, pues sin entender el trabajo, no paraba de preguntar qué hacía, cómo iba, en qué andaba metida. Ha soportado mis frustraciones y mis enfados como si fuera su culpa, aguantando el chaparrón, escuchando, aconsejando y animando. Sin ella no habría podido con esto. Ha sido una roca cuando necesitaba apoyo, una brisa cuando necesitaba respirar, un pañuelo cuando necesitaba llorar, y sujetaba el saco de arena cuando necesitaba algo que golpear.

Y también quiero dar las gracias a todas aquellas personas que no han creído en mí, que incluso me han utilizado y se han aprovechado de mi trabajo, y que han puesto piedras en mi camino, a las que lo han hecho inconscientemente, pero sobre todo a las que lo han hecho conscientemente. Las piedras en el camino pueden ser superadas o no. Si las superas, ganas fortaleza. Si no las superas, conoces tus limitaciones. Y esa es una lección importante. Gracias a esas personas también, ahora soy más fuerte y más humilde.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN. 15
1.2. ANATOMÍA DEL OÍDO INTERNO. 15
1.2. OÍDO INTERNO DE VERTEBRADOS: DESARROLLO EMBRIONARIO. 22
1.2.1. PLACODAS CRANEALES E INDUCCIÓN DE LA PLACODA ÓTICA. 23
1.2.2. FORMACIÓN DE LA VESÍCULA ÓTICA. 24
1.2.3. DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO TRAS EL CIERRE DE LA VESÍCULA ÓTICA. 25
1.2.4. NEUROGENESIS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL OÍDO INTERNO. 28
1.3. ESPECIFICACIÓN DEL DESTINO CELULAR: LA TEORÍA DE LOS COMPARTIMENTOS LIMITADOS DE RESTRICCIÓN CLONAL. 29
1.3.1. FACTORES DIFUSIBLES Y LA ESPECIFICACIÓN INICIAL DEL EPITELIO ÓTICO. 32
1.3.2. ÁCIDO RETINOICO. 33
1.3.3. GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL ÁCIDO RETINOICO. 36
2. OBJETIVOS. 46
3. MATERIALES Y MÉTODOS. 49
3.1. MATERIAL DE ESTUDIO. 49
3.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL. 49
3.2.1. FIJACIÓN. 49
3.2.2. CONGELACIÓN. 50
3.2.3. MICROTOMÍA. 52
3.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU*. 52
3.3.1. OBTENCIÓN DE LAS SONDAS. 52
3.3.2. SÍNTESIS DE SONDAS A PARTIR DE PLÁSMIDOS LINEALES. 58
3.3.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* SOBRE SECCIONES DE CRIOSTATO. 60
3.4. INMUNOCITOQUÍMICA POST-HIBRIDACIÓN *IN SITU*. 65
4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* 68
4.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA (HH18) 68
4.2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN LOS ESTADIOS HH24/25 69
4.3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO HH27 73
4.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO HH34 75
5. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CRABP-1 79
5.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CRABP-1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA (HH18-20) 79
5.2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CRABP-1* EN LOS ESTADIOS HH24/25 81
5.3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CRABP-1 EN EL ESTADIO HH27 85
5.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CRABP-1 EN EL ESTADIO HH34 88

6. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *CYP26A1, CYP26B1* Y *CYP26C1* 92

6.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1, CYP26B1* Y *CYP26C1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA (HH18-20) 92

6.2. PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1*, *CYP26B1* Y *CYP26C1* EN LOS ESTADIOS HH24/25 93

6.3. PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1*, *CYP26B1* Y *CYP26C1* EN EL ESTADIO HH27 . 99

6.4. PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1*, *CYP26B1* Y *CYP26C1* EN EL ESTADIO HH34 103

7. DISCUSIÓN 109

7.1. EL GEN *CYP1B1* PODRÍA DETERMINAR EL DESARROLLO DE LOS ELEMENTOS SENSORIALES. 109

7.1.1. EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA: PATRONES Y MORFOGÉNESIS. 110

7.1.2. ESPECIFICACIÓN DE LAS CRESTAS Y DE LOS CANALES SEMICIRCULARES. 112

7.1.3. ESPECIFICACIÓN DE LAS MÁCULAS. 114

7.1.4. ESPECIFICACIÓN DEL SISTEMA AUDITIVO. 115

7.2. DIFERENTE GRADO DE SENSIBILIDAD DEL EPITELIO ÓTICO AL AR: LA PROTEÍNA CRABP-1. 116

7.2.1. VESÍCULA ÓTICA: PATRONES Y MORFOGÉNESIS. 117

7.2.2. ESPECIFICACIÓN DEL SISTEMA VESTIBULAR POR LA PROTEINA CRABP-I. 119

7.2.3. ESPECIFICACIÓN DE LA PAPILLA BASILAR POR LA PROTEINA CRABP-I. 121

7.2.4. CRABP-I Y LA NEUROGÉNESIS ÓTICA. 123

7.2.5. CRABP-I EN EL DESARROLLO DEL MESENQUIMATOSO PERIÓTICO. 124

7.3. POSIBLE PAPELS DE LAS ENZIMAS CYP26A1, CYP26B1 Y CYP26C1 EN LA ESPECIFICACIÓN DEL EPITELIO ÓTICO. 125

7.3.1. CYP26 Y LA PLACODA ÓTICA: INDUCCIÓN Y REGIONALIZACIÓN. 125

7.3.2. PAPEL DE LAS ENZIMAS CYP26S EN LA DIFERENCIACIÓN DE DOMINIOS EPITELIALES. 126

7.3.3. DIFERENCIACIÓN TERRITORIAL DEL CONDUCTO ENDOLINFÁTICO POR LAS ENZIMAS CYP26S. 129

7.3.4. DIFERENCIACIÓN DE ELEMENTOS SENSORIALES POR *CYP26S*. 129

8. CONCLUSIONES GENERALES 132

8.1. *CYP1B1*. 132

8.2. *CRABP*. 132

8.3. *CYP26s*. 133

1. REFERENCIAS GENERALES. 135

10. ANEXO: FAMILIA DE GENES *IRX*. 157

10.1. RESUMEN DE LA FAMILIA DE GENES *IRX*..... 157
10.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA DE GENES *IRX*. 157
10.1.2. FUNCIÓN DE LOS GENES *IRX* EN EL DESARROLLO DE VERTEBRADOS. 158
10.1.3. FUNCIÓN DE LOS GENES *IRX* EN EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE VERTEBRADOS. 159
10.2. MOTIVACIÓN 159
10.3. GENES *IRX* Y ÁCIDO RETINOICO..... 160
10.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 163
10.5. REFERENCIAS ESPECÍFICAS 163

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ae, aparato endolinfático;

ant, anterior;

AR, ácido retinoico;

bh, bolsa horizontal;

bv, bolsa vertical;

ca, cresta anterior;

cc, conducto coclear;

ce, conducto endolinfático;

cl, cresta lateral;

cn, cresta neural;

CO, copa ótica;

cp, cresta posterior;

CRABP-I, cellular retinoic acid binding protein-I

cs, conducto semicircular;

csa, canal semicircular anterior;

csl, canal semicircular lateral;

csp, canal semicircular posterior;

cus, conducto utrículo-sacular;

CYP1B1, cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1;

CYP26, cytochrome P450 family 26;

ENNE, ect. extraembrionario no neural;

ep-ot, epitelio ótico;

ect, ectodermo;

EP, epitelio faríngeo;

FGF, factor de crecimiento fibroblástico;

GA, ganglio acústico;

GAV, ganglio acústico-vestibular;

GV, ganglio vestibular;

HB, cerebro posterior (*hindbrain*)

HH, Hamburger y Hamilton;

Iro-C, complejo Iroquois;

Iro/Irx, *Iroquois*;

LB, lámina basal;

lp, línea primitiva;

ml, mácula de la lagena;

mn, mácula neglecta;

M, mesénquima;

ml, mácula de la lagena;

mn, mácula neglecta;

ms, mácula de sáculo;

MSP, mesodermo paraxial;

mu, mácula de utrículo;

NT, notocorda;

OT, otocisto;

pb, papila basilar;

pc, pie común (cruz común, **ccm**);

pf, placa de fusión;

PN, placa neural;

PNC, para-neural caudal;

PNR, para-neural rostral;

PO, placoda ótica;

po, poro ótico;

post, posterior;

PS, placa del suelo del tubo neural;

R, rombencéfalo;

r, rombómero;

RC, pro-rombómero C;

s, sáculo;

se, saco endolinfático;

SNC, sistema nervioso central

TALE, three-amino-acid loop extensión;

Td, tercio dorsal;

TN, tubo neural;

Tv, tercio ventral;

tv, *tegmentum vasculosum*;

u, utrículo;

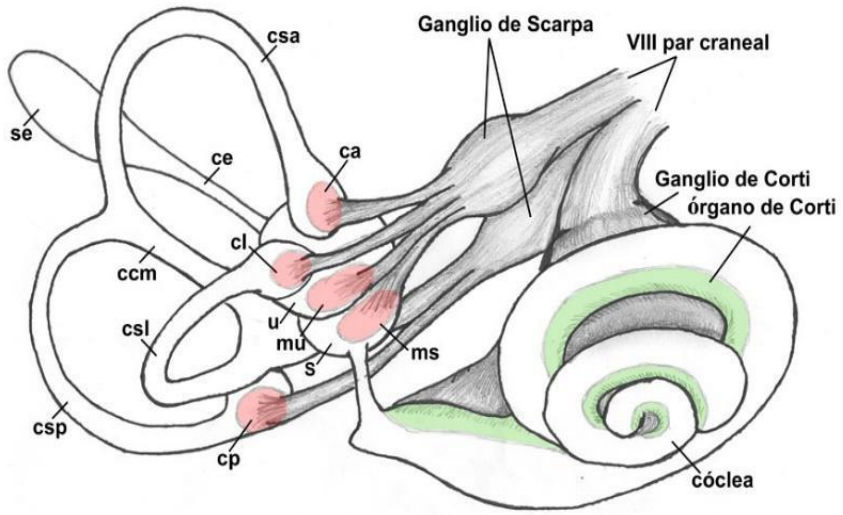
vo, vesícula ótica;

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.2. ANATOMÍA DEL OÍDO INTERNO.

El oído interno de vertebrados es una compleja estructura tridimensional, formada por una serie de cavidades y conductos comunicados entre sí. Este elemento sensorial está relleno de un fluido, la endolinfa, y definido por un tejido epitelial especializado, el laberinto membranoso. Funcionalmente, los constituyentes del oído interno se integran en dos sistemas, el vestibular y el coclear, responsables de la



percepción del equilibrio y la audición, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Esquema de los componentes del oído interno humano. Órganos sensoriales: (1) tres crestas (cresta anterior: ca; cresta lateral: cl; cresta posterior: cp), asociadas a sus correspondientes ámpulas; (2) dos máculas (la mácula del sáculo: ms; la mácula del utrículo: mu), localizadas en el sáculo (s) y el utrículo (u), respectivamente; (3) y el órgano de Corti, en la cóclea. Órganos no sensoriales: los canales semicirculares (anterior: csa; lateral: csl; posterior: csp; pie común: ccm) y el sistema endolinfático (conducto endolinfático: ce; saco endolinfático: se). Neuronas de los ganglios vestibular (de Scarpa) y acústico (de Corti). Adaptado de Purves et al., 2007.

Los diferentes componentes del oído interno ocupan una serie de cavidades interconectadas, las cuales se situadan en la porción petrosa del hueso temporal (laberinto óseo). En el interior de estas cavidades existen dos pequeñas formaciones saculares (el utrículo y el sáculo), tres conductos semicirculares que nacen del utrículo (por su orientación espacial considerados: anterior, posterior y lateral) y el conducto coclear, que ocupa un canal óseo espiral del laberinto óseo. La porción central del laberinto óseo, en la que se localizan principalmente el utrículo el sáculo, se denomina vestíbulo. Todas las porciones continuas del laberinto membranoso están separadas del laberinto óseo por el espacio perilinfático, que contiene un líquido de composición diferente llamado perilinfa.

El sistema vestibular contribuye a la percepción del propio movimiento, la posición de la cabeza y la orientación espacial en relación con la gravedad. También cumple funciones motoras, ayudando a estabilizar la postura. Este sistema está constituido por dos órganos, el utrículo (u) y el sáculo (s), y una serie de canales que forman los conductos semicirculares (csa, csl y csp) (Figura 1). En las situaciones de cambio súbito de la orientación, los receptores sensoriales de los conductos semicirculares y de los órganos vestibulares responden a la aceleración de la cabeza, generando impulsos nerviosos que se dirigen al cerebro y que inician los reflejos necesarios para el restablecimiento de la postura normal del cuerpo.

Los conductos semicirculares anterior (o superior, csa) y posterior (csp) están orientados casi verticalmente, mientras que el conducto semicircular lateral (csl) es casi horizontal. Los extremos de los tres conductos semicirculares se continúan con la pared del utrículo (u). El extremo medial del conducto semicircular anterior y el extremo superior del conducto semicircular posterior presentan confluencia, el llamado pie común (ccm; Figura 1). Por ello, en el utrículo sólo se abren cinco orificios de los conductos semicirculares (Figura 1).

Los receptores sensoriales de los conductos semicirculares se localizan en unas pequeñas dilataciones de los mismos, llamadas ámpulas, situadas a su vez en la zona de unión de los conductos con el utrículo (u). En el suelo de cada ámpula existe una cresta

transversal, la cresta ampular (Figura 2B), cuya orientación hace que quede afectada por cualquier movimiento de la misma con respecto a la endolinfa contenida en el conducto semicircular. De esta manera, los conductos semicirculares están implicados en las percepciones de las aceleraciones rotacionales (angulares) de la cabeza. Cuando la cabeza gira rápidamente, la endolinfa de los conductos semicirculares, que presenta una inercia considerable, tiende a permanecer estacionaria mientras se mueve la pared de los conductos. Existe, por tanto, un movimiento relativo ligero de la endolinfa en el interior de los conductos en dirección opuesta a la dirección de rotación de la cabeza. Las cúpulas de las crestas ampulares, que se proyectan en el fluido y donde están embebidos los cilios de las células ciliadas, se mueven ligeramente, dando lugar a la inclinación de los estereocilios hacia el quinocilio de las células ciliadas (Figura 2A), que responden incrementando la frecuencia de los impulsos nerviosos aferentes (Figura 2B).

En el suelo del utrículo (u) existe una zona engrosada del epitelio especializado que se denomina mácula utricular (mu; Figura 1). El epitelio de la mácula es esencialmente idéntico al de las crestas ampulares y consiste en células ciliadas y en células de sostén (Figura 2A). El quinocilio y los estereocilios de las células ciliadas se proyectan hacia la parte inferior de la denominada membrana otolítica, una capa relativamente gruesa de material gelatinoso similar al que forma la cúpula de la cresta ampular, con cuerpos cristalinos diminutos, los otolitos u otoconios, incluidos parcialmente en su superficie superior, que parecen proporcionar una inercia adicional frente al desplazamiento de la membrana por fuerzas externas. Por tanto, cuando se aplica una aceleración lineal a la cabeza, los otolitos de la membrana tienden a permanecer estacionarios, mientras que las células ciliadas situadas bajo los mismos se desplazan ligeramente, inclinando sus cilios hacia atrás. Esta inclinación de los cilios desencadena una serie de cambios en la frecuencia de los impulsos nerviosos que alcanzan el cerebro, de manera que se puedan iniciar los reflejos correctores.

El utrículo (u) comunica con el sáculo (s) a través de un estrecho conducto utrículo-sacular. El líquido endolinfático tiene diferentes concentraciones en los diferentes espacios. En la pared anterior del sáculo globular existe un engrosamiento ovoideo de la pared que se denomina mácula del sáculo (ms; Figura 1), que es

virtualmente idéntica en su organización a la mácula del utrículo (mu; Figura 1). Debido a que la mácula del sáculo se localiza en su pared anterior (vertical), sus cilios responden a los movimientos cuya dirección está en ángulo recto (perpendiculares) respecto de aquellos que activan la mácula del utrículo, que permanece en horizontal mientras la cabeza está en posición erguida. Por tanto, movimientos de las distintas posiciones de la cabeza estimulan diferentes células ciliadas, lo que proporciona al cerebro información sobre la posición de la cabeza con respecto a la fuerza de la gravedad. De esta manera, el utrículo y el sáculo están especializados en responder a las aceleraciones lineales de la cabeza y su posición estática relativa al eje gravitatorio.

Los pequeños conductos que salen del utrículo y del sáculo se unen formando el conducto endolinfático (ce; Figura 1), el cual discurre a través del acueducto vestibular, situado en la porción petrosa del hueso temporal, hasta finalizar en una pequeña dilatación llamada saco endolinfático (se; Figura 1), que se localiza entre las capas meníngeas.

El epitelio sensorial del sistema vestibular está constituido principalmente por células ciliadas y células de sostén (Figura 2A). Las células ciliadas son las células sensoriales o mecano-receptores que generan los impulsos nerviosos. Estas células presentan, en su superficie libre, un único quinocilio y un racimo de estereocilios especializados que se extienden hasta alcanzar la base de una estructura gelatinosa consistente: la cúpula en las crestas, que se extiende hasta alcanzar la luz de la ámpula (Figura 2B), y la membrana otolítica en las máculas (Figura 2C). Cuando la cabeza gira, estas estructuras acelulares se mueven ligeramente, dando lugar a la inclinación de los estereocilios hacia el quinocilio de las células ciliadas. Este movimiento de los cilios es responsable de la generación de los impulsos nerviosos.

Existen dos tipos reconocidos de células ciliadas en el aparato vestibular (Figura 2A). En el caso de las células ciliadas de tipo I, los nervios penetran entre las células de sostén y forman una terminación con forma de cáliz que rodea completamente la base redondeada de este tipo de células. Los nervios de las células ciliadas de tipo II no forman

una terminación en cáliz, sino que finalizan en varios botones terminales relativamente pequeños.

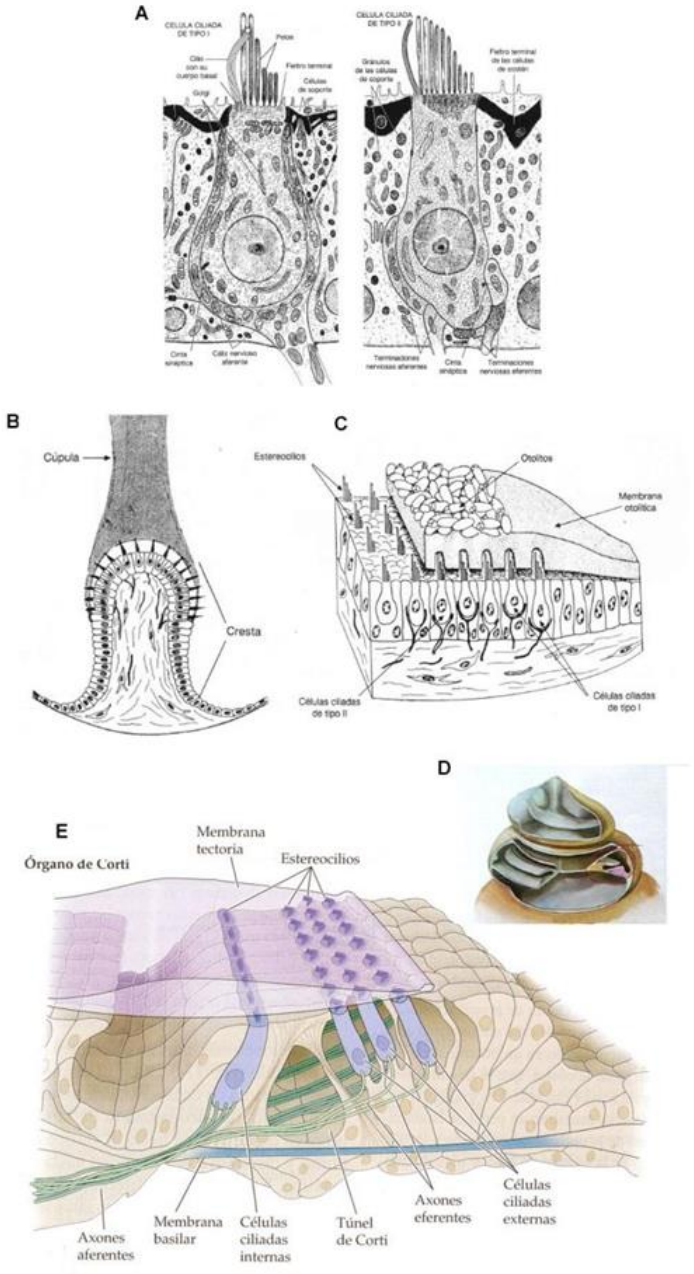


Figura 2. **A)** Esquemas de las principales características ultraestructurales de las células ciliadas vestibulares de tipo I y de tipo II, rodeadas de las células de sostén (Fawcett, 12ª Edición). **B)** Cresta ampular de un conducto semicircular (adaptado de D.E. Parquer, Scientific American. 243:120, 1980) (Fawcett, 12ª Edición). **C)** Esquema de una porción de la mácula del utrículo en el que se muestra la relación que existe entre la membrana otolítica y las células ciliadas. La membrana se ha eliminado, en la parte izquierda, para representar los estereocilios de las filas de células ciliadas (adaptado de D.E. Parker, Scientific American 243:125, 1980) (Fawcett, 12ª Edición). **D)** Visión del interior de la cóclea (López

Antunes y Amendola, 1988). **E)** Ampliación del órgano de Corti que muestra que las células ciliadas se localizan entre la membrana basilar y tectoria, la última está transparente en el dibujo (Purves et al., 2007).

Las células de sostén, que las hay de muy diversos tipos, se cree que pueden contribuir a la nutrición de las células ciliadas o que pueden estar implicadas en la producción de endolinfa.

La cóclea es la estructura sensorial del sistema auditivo (Figura 2D). Desde su extremo basal hasta su extremo apical, la cóclea está dividida en varias cavidades o escalas espirales: la escala vestibular (por encima), la escala timpánica (por debajo) y la escala intermedia (entre las dos anteriores). La escala intermedia contiene endolinfa, mientras que las escalas vestibular y timpánica son espacios perilinfáticos y contener la perilinfa. La escala intermedia presenta un aspecto triangular en los cortes transversales. Su techo es la membrana vestibular o de Reissner. Su suelo lo forman la lámina espiral y la membrana basilar. Deriva directamente del conducto coclear (cc, ver más adelante) durante el desarrollo embrionario. En el epitelio que tapiza la membrana basilar (que separa las escalas intermedia y timpánica) las células se hacen cilíndricas altas en el borde lateral del surco espiral interno y forman el complejo órgano sensorial auditivo, llamado órgano de Corti (papila basilar en vertebrados no mamíferos, Figura 2E). La membrana tectoria forma una capa cuticular cubriendo el órgano de Corti (Figura 2E). Esta membrana está formada por filamentos finos incluidos en una matriz rica en mucopolisacáridos. Las puntas de las largas células ciliadas de este órgano se unen a la parte inferior de la membrana tectoria.

En la cóclea existen dos tipos de células ciliadas. Las células ciliadas internas se disponen en una sola fila a lo largo de todo el órgano de Corti. Las células ciliadas externas forman tres filas y están alojadas entre las células ciliadas internas y las células falángicas externas (un tipo de células de sostén). En el ser humano se observa una cuarta e incluso una quinta fila de células cerca del ápice de la cóclea. Las células ciliadas internas se parecen en muchos aspectos a las células de tipo I del aparato vestibular. Entre las especializaciones de su superficie libre se encuentran estereocilios (cilios) distribuidos por la superficie celular con un patrón en "U". No existe quinocilio, aunque

esta estructura está representada por un cuerpo basal con centríolo asociado en la membrana plasmática apical.

Las células ciliadas externas difieren significativamente de las internas en sus características ultraestructurales, lo que ha llevado a suponer que ambos tipos de célula poseen funciones muy distintas. Los cilios de su superficie libre se distribuyen con un patrón típico en "W" y existen más filas de cilios que en las células ciliadas internas. No existe quinocilio, pero, bajo la base de la "W", se encuentra un cuerpo basal. La base de las células ciliadas externas se sitúa en una depresión con forma de copa que existe en el extremo superior del cuerpo celular de su célula falángica de sostén. Las terminaciones nerviosas aferentes (procedentes del ganglio acústico-vestibular) y eferentes (procedentes de neuronas del rombencéfalo) establecen contacto con la célula ciliada en esta región.

Las ondas de sonido dan lugar a vibraciones de la membrana tímpánica (oído externo) que se transmiten a través de los huesecillos del oído medio (el yunque, el martillo y el estribo) hasta el líquido del canal coclear. Estos huesos del oído medio producen un efecto de amplificación, transformando la pequeña presión del tímpano en una presión 20 veces mayor sobré el líquido de la cóclea. La base del estribo actúa como un pistón, aplicando y quitando alternativamente la presión sobre el líquido. Las vibraciones resultantes de la membrana basilar originan un movimiento de balanceo del órgano de Corti (Figura 2E). Las fuerzas de vaivén mueven los estereocilios de las células ciliadas con respecto a la membrana tectoria. El desvío resultante de los estereocilios hacia el lado más alto del haz causa la despolarización de las células ciliadas con la consiguiente generación de impulsos en los nervios aferentes asociados, que permanecen en contacto sináptico en su base.

La capacidad del oído para distinguir la frecuencia, o el tono, de los sonidos ha sido tradicionalmente atribuida a las diferencias en la anchura de la membrana basilar en toda su longitud y a las diferencias en la longitud de los estereocilios de las células ciliadas. Se considera que cada tono producía una amplitud máxima de vibración en una región diferente de la membrana, de manera que los sonidos de mayor frecuencia daban

lugar a un efecto mayor en la zona de la membrana próxima a la base de la cóclea, mientras que los de baja frecuencia producían la máxima vibración en la proximidad del helicotrema (orificio que se encuentra en el vértice de la cóclea, a partir de la cual ésta comienza a arrollarse en espiral). Se aceptaba que las fibras nerviosas de cada nivel de la membrana conducen los impulsos hasta un área específica del cerebro en la que las neuronas son activadas por frecuencias también específicas. Se acepta este mecanismo, aunque se han obtenido pruebas que indican un ajuste fino activo de la selectividad de las frecuencias por parte de la actividad motora de las células ciliadas. A parte se han sugerido otros mecanismos, por lo que el problema no está resuelto.

Existen neuronas que constituirán el ganglio de Scarpa (vestibular) y el ganglio de Corti (acústico), ambos implicados en la inervación de los elementos sensoriales del oído interno y en la formación del VIII par craneal (Figura 1).

El oído interno contiene otros tejidos, a parte del epitelio sensorial, implicados principalmente en la secreción, como son (Figura 1): (1) un epitelio simple cuboidal, que reviste los tres canales semicirculares; (2) el conducto y saco endolinfático (ce y se), que regulan la composición de la endolinfa y la canalizan fuera del oído interno al sistema ventricular del cerebro; (3) la estría vascular en mamíferos o el *tegmentum vasculosum* (no mostrado) en aves, localizados en el conducto coclear (cc).

1.2. OÍDO INTERNO DE VERTEBRADOS: DESARROLLO EMBRIONARIO.

El oído interno de los vertebrados es uno de los modelos más complejos de organogénesis y especificación celular, regulado por intrincados sistemas moleculares dedicados a la creación de compartimentos de restricción clonal y linaje celular. La adquisición de los diferentes elementos sensoriales y no sensoriales, así como su disposición tridimensional, es un aspecto clave en el desarrollo embrionario del oído interno. Durante la gestación, se puede observar una gradual aparición de los componentes del oído interno.

1.2.1. PLACODAS CRANEALES E INDUCCIÓN DE LA PLACODA ÓTICA.

Durante la embriogénesis temprana, el oído interno deriva de unos engrosamientos transitorios del ectodermo cefálico, que forman dominios de células ectodérmicas localizadas una a cada lado de los rombómeros 4 a 6 del cerebro posterior durante el desarrollo embrionario (Knowlton, 1967; Vaage, 1969; Álvarez et al., 1988, 1989 y 1990; Álvarez et al., 2003; Sánchez-Guardado et al., 2014), conocidos como las placodas óticas (PO; Figuras 3A y B).

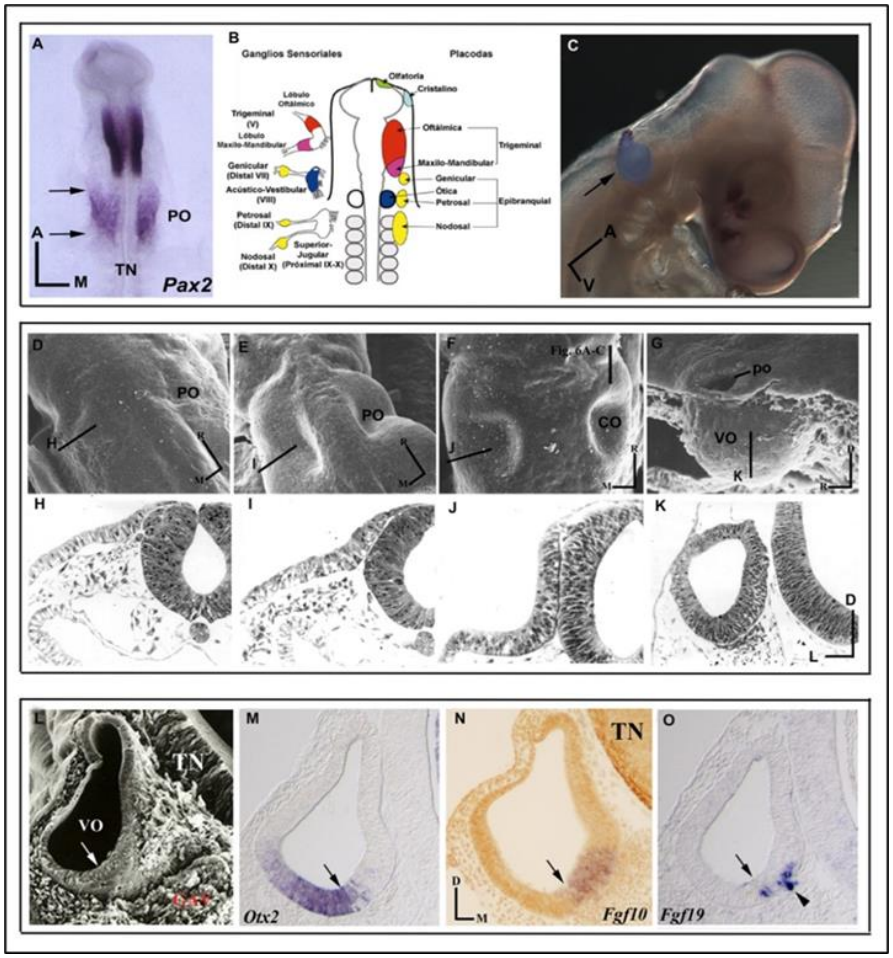


Figura 3. **A)** Hibridación in situ de un embrión de pollo tratado con la sonda Pax2. La placoda ótica (PO) está marcada en su totalidad por el gen *Pax2* (entre flechas en A) (Sánchez-Guardado et al., 2011). **B)** Representación esquemática de la distribución de las placodas craneales en un embrión de pollo de 10 somitas (adaptación de Baker y Bronner-Fraser, 2001). **C)** Localización de la vesícula ótica en un embrión de estadio HH20 (flecha). **D-K)** Imágenes de microscopía electrónica de barrido **(D-G)** y de secciones semifinas **(H-K)** de las primeras etapas del desarrollo embrionario del oído interno de aves: **(D, H)** placoda ótica (PO); **(E, I)** inicio de la invaginación de la placoda ótica (PO); **(F, J)** copa ótica (CO); **(G, K)** vesícula ótica (VO). Las líneas en D-G indican los planos de cortes de **H-K**. **D-G** Álvarez y Navascués, 1990; **H-K** Álvarez, 1988. **L-O**) Migración de los neuroblastos en la formación del ganglio acústico-vestibular (GAV):

microscopía electrónica de barrido (L) y secciones transversales a la vesícula ótica **(M-O)**. Las sondas utilizadas en las hibridaciones in situ se indican en cada imagen. L) Adaptado de Álvarez y Navascués, 1990. **M-O)** Adaptado de Sánchez-Guardado et al., 2011. Abreviaturas: GAV, ganglio acústico-vestibular; PO, placoda ótica; po, poro ótico; TN, tubo neural; VO, vesícula ótica. Orientación: A, anterior; D, dorsal; L, lateral; M: medial; R: rostral; V, ventral.

La adquisición de la competencia del primordio placodal ótico es el primer paso en el desarrollo del oído interno, comenzando en el estadio de gástrula temprana. La placoda ótica da lugar a la vesícula ótica (VO; Figura 3C). El tejido preplacodal primero se especifica y después se compromete a su destino ótico por señales inductivas procedentes del neuroectodermo adyacente y del mesodermo subyacente. Así, el campo ótico adquiere progresivamente su identidad, llegando a ese compromiso con su destino ótico y, finalmente, alcanzando un estadio irreversible de determinación (Sánchez-Guardado et al., 2011).

Mientras que el ectodermo y el mesodermo contienen las señales iniciales para la inducción de la placoda, el ectodermo neural (es decir, el rombencéfalo o cerebro posterior) se piensa que contribuye a estas señales dirigiendo etapas posteriores, tales como el mantenimiento de la placoda y su invaginación para formar la copa ótica.

1.2.2. FORMACIÓN DE LA VESÍCULA ÓTICA.

Desde los primeros momentos de su formación, la placoda ótica se presenta ligeramente invaginada (Figura 3D y H) y hundida en la cabeza del embrión (Figura 3E e I), dando lugar a la llamada copa ótica (CO; Figura 3F y J). Durante el proceso de invaginación, los bordes de la copa ótica se elevan y se acercan entre sí (Figura 3F y J). De esta manera, la comunicación entre el esbozo ótico y la cavidad amniótica del embrión se cierra gradualmente. En estos momentos del desarrollo se observa el poro ótico o fosita ótica (po; Figura 3G y K). Durante este proceso, la porción más dorso-medial del epitelio ótico queda en estrecho contacto con el tubo neural que dará lugar al cerebro posterior, mientras que la porción más ventral mantiene su interacción con el mesénquima embrionario subyacente (Álvarez y Navascués, 1990). Este hecho va a determinar el posterior desarrollo y diferenciación de estas dos regiones del esbozo ótico.

Cuando los bordes de la copa ótica contactan (Figura 3G y K), el esbozo ótico se separa del ectodermo cefálico del que se originó, dando lugar a una estructura casi esférica que se denomina otocisto o vesícula ótica (VO; Figura 3K-O) (O´Rahilly, 1963; Knowlton, 1967; Álvarez y Navascués, 1990). La pared del esbozo ótico sigue estando constituida por un epitelio pseudoestratificado que delimita una cavidad simple o ventrículo. El epitelio ótico dará lugar al laberinto membranoso del oído interno de vertebrados y la cavidad será rellenada por la endolinfa.

1.2.3. DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO TRAS EL CIERRE DE LA VESÍCULA ÓTICA.

La vesícula ótica sufre importantes cambios morfogenéticos y de especificación celular para determinar las áreas sensoriales y no sensoriales en el laberinto membranoso en desarrollo, así como la neurogénesis ótica, todas ellas con un alto número de interacciones moleculares (Figura 4). Los mecanismos moleculares y celulares responsables de esta transformación son similares a los observados en la formación de otras estructuras embrionarias huecas que derivan de un epitelio embrionario (ectodermo o endodermo), por ejemplo, el tubo neural, la vesícula del cristalino, el sistema olfativo, el esbozo del tiroides, entre otros. Hay que considerar los procesos de proliferación y muerte celular, remodelación celular medida por el citoesqueleto, interacciones célula a célula, adhesión celular y una estrecha relación con la matriz extracelular. Estos eventos son responsables de un crecimiento diferencial que conduce a la creación de las diferentes cavidades en las que está subdividido el oído interno en el adulto, una compleja estructura sensorial tridimensional formada por componentes vestibulares y auditivos (Kikuchi et al., 1988, Morsli et al., 1998; Fekete y Wu, 2002; Lin et al., 2005; Bok et al., 2007; Schneider-Maunoury y Pujades, 2007; Alsina et al., 2009; Groves y Fekete, 2012; Wu y Kelley, 2012; Chen y Streit, 2013; Lassiter et al., 2014; Sánchez-Guardado et al., 2014; Nakajima, 2015; Whitfield, 2015; Raft y Groves, 2015; Basch et al., 2016; Fritzsch y Elliott, 2017; Varela-Nieto et al., 2019; entre otros).

En el cuarto día de incubación del embrión de aves, el esbozo ótico aparece claramente dividido por una estrangulación en dos protuberancias o partes (Figura 4B): dorsal (*pars superior*) y ventral (*pars inferior*). La protuberancia dorsal dará lugar a los canales/conductos semicirculares (anterior/superior: csa; lateral/horizontal: csl; y posterior: csp), las ámpulas (anterior/superior: ca; lateral/horizontal: cl; y posterior: cp), el sistema endolinfático (ce y se) y el utrículo (u). La protuberancia ventral dará lugar al sáculo (s) y al conducto coclear (cc).

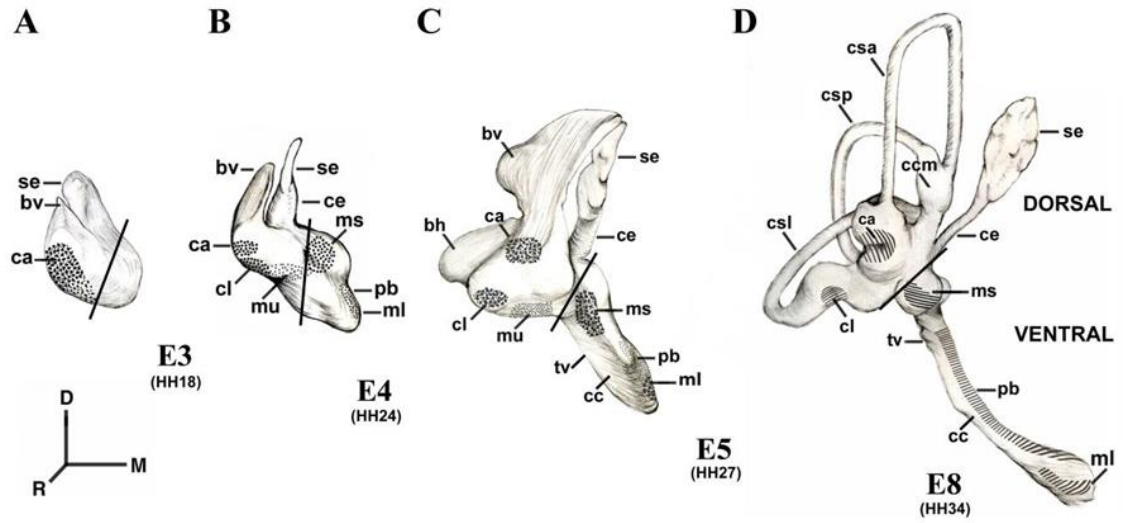


Figura 4. Desarrollo del oído interno de aves visto en cuatro estadios: **A)** HH18 (tres días de incubación), **B)** HH24 (cuatro días de incubación), **C)** HH27 (cinco días de incubación), y **D)** HH34 (ocho días de incubación). Visión anterior. Se observan los cambios morfogenéticos, así como las porciones dorsales y ventrales del esbozo ótico, separadas por la línea negra.

Los tres canales semicirculares se originan a partir de dos expansiones o bolsas: la bolsa vertical (bv) y la bolsa horizontal (bh), situadas en la porción dorso-lateral y lateral del esbozo ótico, respectivamente. La bolsa vertical dará lugar al canal semicircular anterior/superior (csa) y posterior (csp), con una porción común, el pie común (ccm). La bolsa horizontal dará lugar al canal semicircular lateral/horizontal (csl). Las tres ámpulas se desarrollarán como expansiones de dichos tubos en la cercanía del vestíbulo, siendo las ámpulas cámaras en las que se localizan las tres crestas (ca y cl; Figura 5; cp no mostrada, ver Figuras de Resultados). Mecanismos de muerte celular

programada o de transdiferenciación celular estarían implicados en la morfogénesis de estos canales.

En aves existen dos elementos vestíbulo-sensoriales más: la mácula neglecta (mn) y la mácula de la lagena (ml). El primero es un elemento dorsal, observado sólo en algunos mamíferos, que se ubica en una pequeña expansión cercana a la cresta posterior (no mostrado, ver Figuras de Resultados). La mácula de la lagena (Figura 5B-D) se sitúa en el extremo del conducto coclear (cc).

De la cara medial de la protuberancia dorsal (*pars superior*) emerge un tubo hueco, el conducto endolinfático (ce), en cuyo extremo se formará el saco endolinfático (se). El utrículo (u), con su correspondiente mácula (mu), se origina como una expansión de la protuberancia dorsal, justo es su porción más ventral, cercana a la protuberancia ventral.

De la protuberancia ventral (*pars inferior*), en concreto de su cara antero-medial, emerge el esbozo del sáculo (s; mácula del sáculo, ms), situado siempre cerca del utrículo. El conducto coclear (cc) surge en estrecha relación con el sáculo. El sáculo forma una evaginación tubular en su polo inferior. Este brote, el conducto coclear, se introduce en el mesénquima circundante, se alarga de manera espiral, en mamíferos, y se extiende ventro-medialmente hasta completar dos vueltas y media alrededor del helicotrema, situándose ligeramente por debajo del rombencéfalo. En aves, este conducto presenta una orientación rectilínea.

El órgano de Corti (papila basilar en vertebrados no mamíferos, pb) se desarrollará en la pared medial de dicho conducto coclear (cc). La mácula de la lagena (ml), ausente en mamíferos, se localizará en la parte más distal del conducto coclear (Fekete et al., 1997). La estría vascular en mamíferos, o *tegmentum vasculosum* (tv) en aves, se desarrolla en la pared lateral del conducto coclear en desarrollo.

Los conductos semicirculares aparecen en forma de evaginaciones aplanadas de la porción utricular del esbozo ótico en desarrollo. Las porciones centrales de la pared

de estas evaginaciones eventualmente se adosan entre ellas y desaparecen, y así se originan los tres conductos semicirculares. Mientras un extremo de cada conducto se dilata y forma la ámpula, el otro, denominado no ampular, no se ensancha. Sin embargo, puesto que dos de los extremos rectos se fusionan, se advierten solamente cinco ramas que entran en el utrículo (u): tres con ámpulas y dos sin estas dilataciones.

El mesénquima circundante se organiza como una envuelta ósea, que recibe el nombre de cápsula ótica. La cápsula envuelve directamente al otocisto, aunque posteriormente se pierde la relación directa entre las dos formaciones por la creación de un espacio de reabsorción, denominado espacio perilinfático o cisterna periótica, que jugará un importante papel en el proceso de excitación.

1.2.4. NEUROGENESIS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL OÍDO INTERNO.

La especificación de algunas células del epitelio ótico en neuroblastos es quizás la decisión más temprana del destino celular que tiene lugar en el desarrollo embrionario del oído interno de vertebrados. Al mismo tiempo que ocurre la invaginación de la placoda ótica (PO), una población de células del epitelio ótico se desprenderá de él, justo de la parte más ventro-medial de la vesícula ótica (VO), atravesando la lámina basal del epitelio ótico y sin alterar la integridad del mismo. Estas células migratorias, que invaden el mesénquima subyacente, son precursoras de neuronas (neuroblastos) (Álvarez et al., 1989). Los neuroblastos, *Fgf19* positivos, se desprenden del epitelio ótico en el límite de la expresión de dos genes, *Fgf10* y *Otx2* (flechas en Figura 3L-O; Sánchez-Calderón et al., 2007). De esta manera se formará el ganglio acústico-vestibular (GAV), el VIII ganglio craneal, que inervará a los diferentes elementos sensoriales del laberinto membranoso.

La formación de las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV) es un proceso secuencial que comprende: primero, la especificación de los precursores neuronales en el epitelio ótico; segundo, el desprendimiento y la migración de los neuroblastos epiteliales; y, finalmente, la diferenciación de las neuronas que conectan con las células

ciliadas de los órganos sensoriales, tanto vestibulares como cocleares (Alsina et al., 2004; Sánchez-Calderón et al., 2007; Sánchez-Guardado et al., 2009). Estos resultados han sido confirmados en humanos (Müller y O´Rahilly, 1986, 1987 y 1988).

Una vez en el mesénquima cercano al esbozo ótico, los neuroblastos ganglionares, tras un largo proceso de diferenciación celular, darán lugar a neuronas pseudomonopolares que constituirán el ganglio acústico-vestibular (GAV) y GV). Estas neuronas, durante su maduración, emitirán una prolongación que se bifurcará en "T" para inervar, por una parte, a cada uno de los elementos sensoriales que se diferenciarán en el laberinto membranoso ótico, guiados por factores difusibles y atravesando la correspondiente porción de la lámina basal. Por otra parte, estas neuronas del ganglio acústico vestibular inervarán también a neuronas de determinados núcleos de la vía auditiva o vestibular situados en el rombencéfalo o cerebro posterior (Whitehead y Morest, 1985a y b; Ramón y Cajal, 1908a y b; Carney y Silver, 1983). Según avanza el desarrollo embrionario, se produce la segregación del ganglio acústico-vestibular. El ganglio vestibular (GV) o de Scarpa se sitúa en la porción más anterior y lateral, mientras que el ganglio acústico (GA) o coclear o de Corti se dispondrá más ventralmente (Knowlton, 1967; Ramón y Cajal, 1908a y b; Altman y Bayer, 1982; Carney y Silver, 1983).

1.3. ESPECIFICACIÓN DEL DESTINO CELULAR: LA TEORÍA DE LOS COMPARTIMENTOS LIMITADOS DE RESTRICCIÓN CLONAL.

De lo expuesto hasta ahora se concluye que el desarrollo embrionario del oído interno de vertebrados requiere la coordinación entre la morfogénesis del esbozo ótico y la especificación del destino celular en el propio epitelio ótico. La morfogénesis transforma un territorio epitelial plano (la placoda ótica, PO) en una esfera hueca (el otocisto o vesícula ótica, VO; Figura 3). Las células de la placoda ótica proliferan, algunas mueren de una manera programada y se especifican en los diferentes tipos celulares que constituyen el laberinto membranoso:

(1) Las células ciliadas (mecano-receptores sensoriales; Figura 2);

(2) Células de sostén de los distintos órganos sensoriales (Figura 2);

(3) Las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV; Figuras 3 y 5);

(4) Los tejidos no sensoriales, algunos de ellos de naturaleza secretora (Figura 1 y 4).

La audición y el equilibrio requieren que dominios discretos de células ciliadas mecánico-sensoriales se posicionen con precisión en lugares discretos dentro del intrincado y altamente asimétrico laberinto membranoso del oído interno. El proceso de modelado se inicia poco después de que la placoda ótica sea morfológicamente discernible, siendo perceptible a través de la generación de dominios de expresión específicos de genes reguladores, generalmente factores de transcripción. Estos patrones de expresión se establecen entonces en la copa/vesícula ótica, estableciendo el esquema molecular para los siguientes procesos morfogenéticos (Fekete y Wu 2002). Los límites de dichos dominios pueden iniciar posteriormente una liberación de factores de señalización que a su vez subdividen los territorios especificados (Meinhardt, 1983). Este proceso se denomina especificación del destino celular, estando controlada por la expresión asimétrica de determinados genes reguladores e interacciones celulares locales (Fekete, 1996; Whitfield et al., 1997; Lang y Fekete, 2001; Fekete y Wu 2002). Por lo tanto, el patrón celular preciso, la diferenciación morfológica y la inervación, por lo tanto, dependen de los eventos de desarrollo temprano y están determinados por las vías moleculares que regulan la diferenciación terminal y la morfogénesis (Kelly y Chen, 2007).

Un objetivo clave de los estudios de desarrollo en este campo es comprender los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en el patrón temprano del primordio ótico. En particular, una cuestión central es cómo se diferencian los diversos epitelios sensoriales y no sensoriales, dispuestos en un patrón espacial específico. Se cree que este proceso está controlado por una red de morfógenos difusibles y patrones de expresión dinámicos superpuestos de moléculas difusibles a través de un mecanismo de múltiples pasos (Romand et al., 2006a, b; Abelló y Alsina, 2007; Bok et al., 2007;

Fekete y Campero, 2007; Ohyama et al., 2007; Sánchez-Calderón et al., 2007; Schimmang, 2007; Schneider-Maunoury y Pujades, 2007; Whitfield y Hammond, 2007; Kelly y Chen, 2009; Frenz et al., 2010; Ladher et al., 2010; Groves y Fekete, 2012; Chen y Streit, 2013), que establecen dominios de destinos diferenciales dentro del laberinto membranoso en desarrollo (Fekete, 1996; Brigande et al., 2000; Fekete y Wu, 2002; Sánchez-Guardado et al., 2014). Destaca también la regionalización del epitelio ótico en desarrollo para aun correcta neurogénesis, es decir, determinar la región en donde se especifican los neuroblastos óticos (Sánchez-Guardado et al., 2019).

Basándose en la teoría de los compartimentos limitados, Brigande y colaboradores (2000) propusieron el siguiente modelo para facilitar el entendimiento de la formación de este elemento sensorial:

(1) En el oído interno, diferentes dominios epiteliales se segregan en compartimentos de linaje restringidos, definidos por amplios dominios de expresión de factores de transcripción.
(2) La identidad de los compartimentos especificaría las partes estructurales del oído interno (canales semicirculares, utrículo, sáculo, cóclea, conducto endolinfático) y
(3) La localización de los órganos sensoriales, así como la migración de los precursores neuronales, todo ello por medio de señales de corto rango. Los órganos sensoriales se formarían adyacentes a los límites definidos por estos dominios de expresión génica.
(4) La identidad del compartimento también podría determinar el tipo de órgano sensorial generado: los órganos sensoriales alargados requerirían la intersección de sólo dos compartimentos para definir su localización espacial (órgano de Corti, en mamíferos; papila basilar, en vertebrados no mamíferos; o las máculas vestibulares), mientras que los órganos sensoriales puntuales (las crestas) requerirían la intersección de al menos tres compartimentos (Brigande et al., 2000; Fekete y Wu, 2002).

1.3.1. FACTORES DIFUSIBLES Y LA ESPECIFICACIÓN INICIAL DEL EPITELIO ÓTICO.

Un aspecto clave en el desarrollo del esbozo ótico es la definición de los ejes antero-posterior, latero-medial y dorso-ventral, todo ello vinculado con los cambios morfogenéticos de esta compleja estructura tridimensional, así como diferente actividad de proliferación, muerte y migración celular (Whitfield y Hammond, 2007; Bok et al., 2007; Brigande et al., 2000; Fekete y Wu, 2002). La expresión regionalizada de estas familias de genes en el propio epitelio ótico puede ser inducida y mantenida por señales externas que emanan desde los tejidos cercanos (incluido el cerebro posterior, el ectodermo cefálico, el mesénquima subyacente y la propia notocorda) u otras generadas por el propio epitelio ótico. Estas moléculas organizadoras o morfógenos (exógenos o endógenos) inducirían a su vez la expresión génica que controla el crecimiento y modelado de los compartimentos creados (Ohyama et al., 2007; Whitfield y Hammond, 2007; Bok et al., 2007; Schimmang, 2007; Scneider-Maunoury y Pujades, 2007).

La adquisición de un fenotipo ventral o dorsal en el epitelio ótico vendría determinada por la acción conjunta de varias señales generadas por el ambiente tisular que rodea al esbozo ótico en los primeros estadios del desarrollo (Figura 5):

(1) Las proteínas BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) y WNTs (*Wingless-type MMTV integration site family*), desde la porción dorsal del embrión, determinarían un fenotipo dorsal (parte dorsal);
(2) SHH (*Sonic hedgehog*), secretado por la notocorda (NT) y la placa del suelo (PS) del tubo neural (TN), determinaría un fenotipo ventral (parte ventral) y el desarrollo del ganglio acústico-vestibular (GAV);
(3) FGF3 (*Fibroblast Growth Factor 3*), desde el tubo neural, promovería un fenotipo lateral;
(4) Señales procedentes del ectodermo cefálico a este nivel, probablemente miembros de la familia de los BMPs, controlarían la adquisición de un fenotipo lateral en la vesícula ótica;

(5) (5) El ácido retinoico, desde los primeros somitas, controlaría la adquisición de un fenotipo posterior en la vesícula ótica (Barald y Kelley, 2004; Schneider-Maunoury y Pujades, 2007; Schimmang, 2007).

Durante el desarrollo, los morfógenos difusibles, como el FGF, WNT, BMP, SHH y el ácido retinoico (AR), participan en el establecimiento de gradientes de fuentes confinadas, en algunos casos con sumideros restringidos (Meinhardt, 2008; Schilling et al., 2012; Durston, 2015; Tuazon y Mullins, 2015; Nesterenko et al., 2017; Dubey et al., 2018). Estas interacciones dinámicas, espaciales y temporales, también gobiernan los eventos morfogenéticos y de especificación que ocurren durante el desarrollo de los oídos internos de vertebrados (Romand et al., 2006a; Bok et al., 2007; Ohyama et al., 2007; Schimmang, 2007; Whitfield y Hammond, 2007; Schneider-Maunoury y Pujades, 2007; Chatterjee et al., 2010; Ladher et al., 2010; Wu y Kelley, 2012; Chen y Streit, 2013; Munnamalai y Fekete, 2013; Nakajima, 2015; Raft y Groves, 2015; Su et al., 2015; Alsina y Whitfield, 2017; Ebeid y Huh, 2017; Ohta y Schoenwolf, 2018; entre otros).

1.3.2. ÁCIDO RETINOICO.

El ácido retinoico (AR) es el principal metabolito biológicamente activo de la vitamina A (retinol). El AR desempeña funciones pleiotrópicas, con más de un efecto, afectando a múltiples aspectos del desarrollo embrionario (McCaffery y Dräger, 2000; Tzimas y Nau, 2001; Balmer y Blomhoff, 2002; Blentic et al., 2003; Maden, 2006; Niederreither y Dolle, 2006; Romand et al., 2006a; Hans y Westerfield, 2007; Gudas y Wagner, 2011; Tonk et al., 2015; Xavier-Nieto et al., 2015; Ealy et al., 2016; Stefanovic y Zaffran, 2017; Piersma et al., 2017; Dubey et al., 2018; Frank y Sela-Donenfeld, 2019), pero también causa defectos de nacimiento cuando está presente en exceso o deficiencia (Mason, 1935; Wilson et al., 1953; Cohlan, 1953, 1954; Kalter, 1960; Kalter y Warkany, 1961; Kochhar, 1967, 1973; Geelen, 1979; Kwasigroch y Kochhar, 1980; Kessel, 1992; See et al., 2008). En consecuencia, se han desarrollado varios mecanismos para optimizar la obtención y retención de vitamina A, así como para controlar la exposición de los tejidos a su forma activada (Mason, 1935; Wilson et al., 1953; See et al., 2008).

La biosíntesis del AR se produce en un proceso de dos fases: en primer lugar, el retinol precursor (vitamina A) se oxida a retinaldehído por las deshidrogenasas citosólica del alcohol (ADH) y las deshidrogenasas del retinol (RDH). A continuación, el retinaldehído es transformado en AR por los miembros de la familia aldehído deshidrogenasa (ALDH), conocida como deshidrogenasas de retinaldehído (RALDH) (Figura 6; Ross et al., 2000; Duester et al., 2003; Blomhoff y Blomhoff, 2006; Dubey et al., 2018). Las acciones de control del AR se producen por la regulación de la actividad de la familia de receptores nucleares del AR, los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores de retinoide X (RXR), para regular la expresión de los genes diana, las cuales se unen a los elementos de respuesta del ácido retinoico (RAREs) presentes en las secuencias reguladoras de estos genes regulados por el AR (Blomhoff y Blomhoff, 2006; Mark et al., 2006; Gudas y Wagner, 2011; Benbrook et al., 2014).

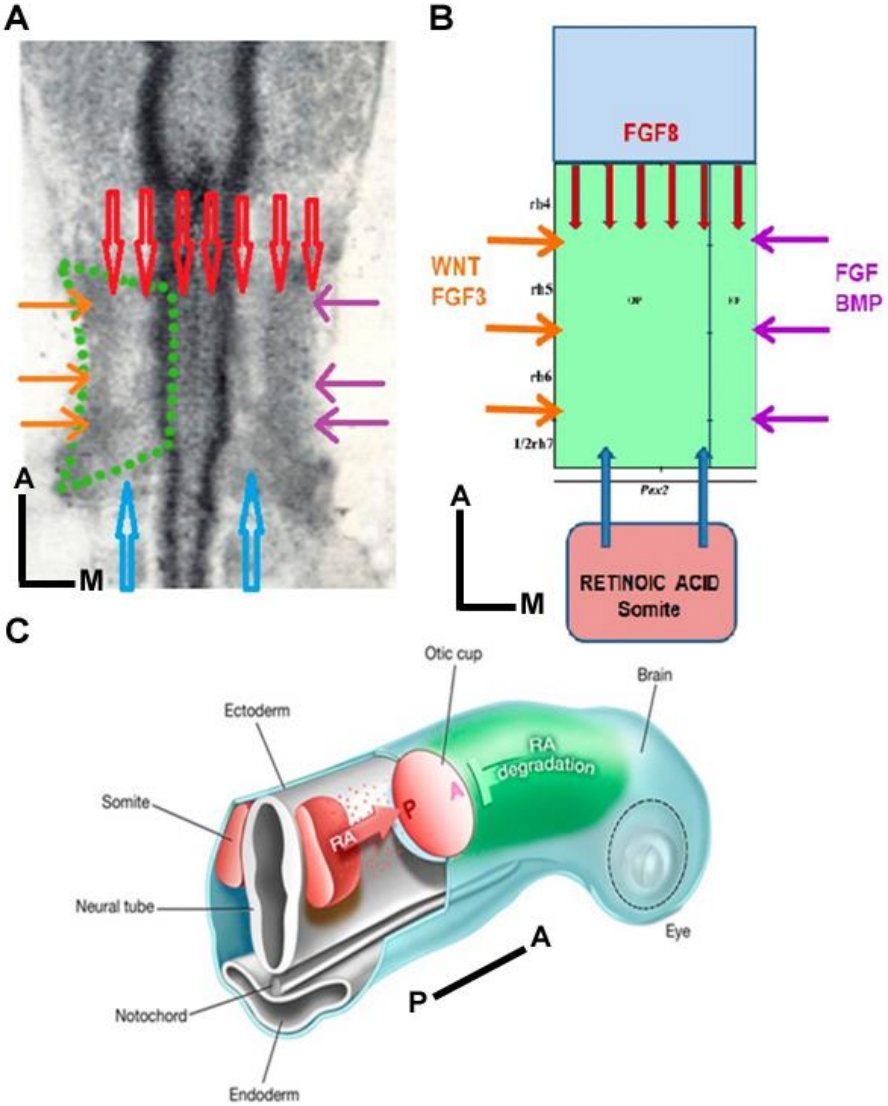


Figura 5. A) Visión dorsal de un embrión de pollo de estadio HH10 (10 somitas) en la que se muestra la extensión de la placoda ótica (definida por la línea de puntos verdes) y la acción de diferentes vías de señalización que actúan sobre ella, e implicadas en su especificación y regionalización. **B**) Esquema simplificado de la acción de diferentes vías de señalización: FGF8 desde la placoda del trigémino), WNT y FGF3 desde el tubo neural, FGFs y BMPs desde porciones laterales y ventrales del embrión y el ácido retinoico desde los primeros somitas. **C**) Esquema tridimensional de un embrión de pollo de estadio HH12-13 en donde se representa la acción del ácido retinoico en la especificación antero-posterior de la copa ótica (adaptada de Bok et al., 2011). Orientación: A, anterior; M, medial; P, posterior.

Durante la embriogénesis, la vitamina A se obtiene por vía materna. La deficiencia materna de vitamina A (VAD) en roedores resulta en altas tasas de reabsorción y muerte fetal, junto con defectos que involucran principalmente el desarrollo del ojo, el corazón y el tracto genitourinario, además de alteraciones severas

en varios otros órganos y tejidos (Mason, 1935; Wilson et al., 1953; See et al., 2008). Por el contrario, las consecuencias teratogénicas de la exposición excesiva a la vitamina A materna están igualmente bien definidas y dependen tanto de la dosis como de la etapa de tratamiento. Las malformaciones congénitas que se observan durante la gestación incluyen: (1) anencefalia, cuando el extremo encefálico o cabeza del tubo neural no logra cerrarse; (2) exencefalia, cuando el cerebro está situado fuera del cráneo; (3) problemas craneofaciales y paladar hendido); y (4) defectos de ojos y oídos, espina bífida, defectos de extremidades y genitourinarios, entre otros (Cohlan, 1953, 1954; Kalter, 1960; Kalter y Warkany, 1961; Kochhar, 1967, 1973; Geelen, 1979; Kwasigroch y Kochhar, 1980; Kessel, 1992). Por lo tanto, el control preciso de los niveles de AR durante la embriogénesis es esencial para el desarrollo normal de prácticamente todos los sistemas orgánicos. En este sentido, se han caracterizado componentes de las vías de señalización y metabólica del AR, lo que ha permitido confirmar que la alteración del sistema de control del AR por manipulación genética o farmacológica tiene consecuencias devastadoras para el desarrollo (Pennimpede et al., 2010). Además, los retinoides tienen efectos antiproliferativos y de diferenciación. Por ello, se utilizan para la prevención y el tratamiento del cáncer, pero potencialmente también pueden aumentar el riesgo de tumoraciones (Bushue y Wan, 2010).

Uno de los mecanismos para controlar la actividad del AR es la conversión a metabolitos inactivos polares (enzimas CYP; White et al., 2000; Chithalen et al., 2002; Taimi et al., 2004; ver más adelante) para facilitar la excreción (Collins y Mao, 1999). La distribución apropiada del AR dentro de los tejidos embrionarios viene determinada, por tanto, por el equilibrio entre su síntesis y degradación, siendo esencial para el desarrollo normal (revisado en Ross et al., 2000; Romand et al., 2006a; Pennimpede et al., 2010; Piersma et al., 2017).

1.3.3. GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL ÁCIDO RETINOICO.

1.3.3.1. CYP1B1.

Los citocromos P450 (CYP) son una superfamilia de enzimas con un dominio de unión hemo involucrado en la oxidación de una variada gama de sustratos endógenos y xenobióticos (Baldwin et al., 2009; Nelson, 2011; Zanger y Schwab, 2013; Dejong y Wilson, 2014). La familia de los genes *Cyp1* consta de tres genes estrechamente relacionados clasificados en dos subfamilias (*Cyp1A1*, *Cyp1A2*, *Cyp1B1*; Godard et al., 2000, 2005; Zanger y Schwab, 2013) y un pseudogen (Cyp1D) (Godard et al., 2000, 2005; véase también El-kady et al., 2004a, b; Itakura et al., 2005; Jönsson et al., 2007). En particular, el gen *Cyp1B1* se identificó en primer lugar en la línea de células derivadas de fibroblastos del embrión de ratón y en las células de la glándula suprarrenal de la rata (Pottenger et al., 1991; Otto et al., 1991, 1992; Savas et al., 1994; Sutter et al., 1994; Bhattacharyya et al., 1995). La estructura del gen humano *Cyp1B1* se ha descrito también en detalle (Tang et al., 1996; Murray et al., 2001). Como enzima inducible por dioxinas, CYP1B1 es clínicamente relevante en la inducción del cáncer, la progresión neoplásica y el metabolismo de tumores malignos de una amplia gama de cánceres humanos (Murray et al., 2001; Sissung et al., 2006). En particular, las mutaciones de *Cyp1B1* son la causa más frecuente de glaucoma congénito primario (Chavarria-Soley et al., 2008; Vasiliou y González, 2008; Badeeb et al., 2014). Sin embargo, las caracterizaciones histopatológicas y fisiológicas de los ratones *Cyp1B1*-null no mostraron alteraciones con respecto a los ratones normales, sugiriendo una acción redundante y compensatoria con otros genes relativos (Buters et al., 1999).

A diferencia de las enzimas CYP26A1-C1, CYP1B1 es incapaz de metabolizar completamente el AR en cualquiera de sus productos menos activos. Es de interés destacar que CYP1B1 participa en la síntesis de AR, catalizando la conversión de retinol en retinaldehído a través de una vía independiente de RALDH (Chen et al., 2000; Zhang et al., 2000; Choudhary et al., 2004; Chambers et al., 2007). Por lo tanto, CYP1B1 podría ser un excelente candidato para regular los procesos de desarrollo mediados por la AR como una fuente adicional. Utilizando varios enfoques metodológicos, se encontraron expresiones constitutivas de *Cyp1B1* en un gran número de tejidos embrionarios y adultos, tales como sistemas nerviosos centrales y visuales, arcos branquiales, corazón,

riñón, extremidades, entre otros (Otto et al., 1992; Sutter et al., 1994; Savas et al., 1994; Bhattacharyya et al., 1995; Christou et al., 1995; Shimada et al., 1996; Murray et al., 1997; Hakkola et al., 1997; Vadlamuri et al., 1998; Rieder et al., 2000; Muskhelishvili et al., 2001; Bejjani et al., 2002; Choudhary et al., 2003, 2005; Stoilov et al., 2004; Xu y Miller, 2004; Doshi et al., 2006; Chambers et al., 2007; Jönsson et al., 2007; Yin et al., 2008; Palenski et al., 2013; Williams et al., 2015, 2017). Se ha revisado la regulación, especificidad metabólica y expresión específica en varios tejidos en adultos, siendo un papel clave en varios aspectos fisiológicos de vertebrados (Murray et al., 2001). La expresión de *Cyp1B1* también ha sido descrita en tejidos embrionarios (Chambers et al., 2007), sugiriendo su participación en el desarrollo normal.

Además de los patrones de expresión de los genes de *Raldh*, la fuente más relevante de AR, los estudios detallados sobre la expresión del gen *Cyp1B1* podrían ser esenciales para comprender mejor el papel de la vía de señalización del AR en la morfogénesis y la especificación sensorial que se produce durante el desarrollo del oído interno de los vertebrados. Destacar que, en los embriones de pollo en estadio HH12+, la expresión de *Cyp1B1* es evidente en el ectodermo inmediatamente anterior a la vesícula ótica (Chambers et al., 2007). En este sentido, hemos realizado un análisis exhaustivo de la expresión del gen *Cyp1B1* en varios estadios de desarrollo del oído interno del pollo desde el estadio HH18-20 al HH34. Nuestro análisis de hibridación *in situ* reveló que la expresión de *Cyp1B1* se observó en primer lugar en un dominio situado en la pared ventromedial del primordio ótico, siendo coincidente con el dominio pan-sensorial *Fgf10*-positivo (Sánchez-Guardado et al., 2013), pero excluyendo al territorio presuntivo de la cresta posterior *Fgf10*-positiva. Poco después, la expresión de *Cyp1B1* se extendió caudalmente, incluyendo entonces a la cresta posterior. En el estadio HH24, todas las áreas identificadas como *Fgf10*-positivas fueron teñidas con *Cyp1B1*, siendo los niveles de expresión de *Cyp1B1* mayores en las crestas anterior y posterior y menores en las máculas utricular y sacular, así como en la papila basilar. Unas horas después, la cresta lateral era claramente *Cyp1B1* positiva. En el estadio HH34, cuando todos los elementos sensoriales están claramente identificados (Sánchez-Guardado et al., 2013), todos ellos fueron positivos para *Cyp1B1*, excepto la mácula neglecta. Curiosamente, varias áreas del mesénquima subyacente al epitelio ótico mostraron una fuerte

expresión de *Cyp1B1*, lo que sugiere claramente la participación de la actividad de *Cyp1B1* en el establecimiento de los ejes latero-medial y dorso-ventral del oído interno del pollo en desarrollo.

1.3.3.2. LAS PROTEÍNAS CRABPS.

Se han identificado varias proteínas de unión de retinoides celulares cuyas acciones rigen los efectos de los retinoides (Napoli, 2017). Se considera que el AR está ligado a las proteínas que unen el ácido retinoico celular (CRABP; Figura 6) (Budhu y Noy, 2002). Existen dos proteinas CRABPs: CRABP-1 y CRABP-2 (Blomhoff et al., 1990; Giguère et al., 1990; Stoner y Gudas, 1989). También se ha identificado una tercera proteína de unión al AR, xCRABP en *Xenopus laevis* (Dekker et al., 1994). Las similitudes en la secuencia sugieren que los miembros de esta familia han evolucionado a partir de un gen ancestral común, porque son proteínas altamente conservadas durante la evolución: ratón, bovino (Sundelin et al., 1985; Stoner y Gudas, 1989), humano (Aström et al., 1991; Giguère et al., 1990) (revisado por Chytil y Stump, 1991). Los distintos, pero altamente conservados, aspectos evolutivos de las dos proteínas CRABPs implican que ambas están bajo una fuerte presión selectiva y que las dos proteínas CRABPs interactúan con diferentes proteínas celulares. Tanto CRABP-1 como 2 se unen, *in vitro*, con alta afinidad a todas las formas trans de ácido retinoico (atRA) (Donovan et al., 1995; Shaw et al., 2003; Levi et al., 2013) y lo solubilizan intracelularmente (Aström et al., 1991; Delva et al., 1999; Budhu y Noy, 2002). Pero la afinidad de CRABP-2 para el AR parece ser menor que la de la CRABP-1 (ver Chytil y Stump, 1991). Además, sólo el CRABP-1 ha demostrado que se une al ligando *in vivo* (Saari et al., 1982). Esta diferencia en la afinidad para atRA sugiere que CRABP-1 y CRABP-2 tienen funciones diferentes en la célula y, quizás más importante aún, bajo condiciones de exceso de las proteínas de unión en relación con el AR, CRABP-1 sería la principal proteína de unión de AR.

Se considera que CRABP-1 facilita el catabolismo y/o el secuestro del ácido retinoico, haciéndolo inasequible para los receptores nucleares, mientras que el CRABP-2 facilitaría la transferencia de la forma all-trans de ácido retinoico al receptor nuclear, permitiendo la unión subsiguiente a los elementos de respuesta del ácido retinoico

(RARE) en ciertos genes diana y su activación (Akama et al., 2013). No se sabe si CRABP-1 y CRABP-2 tienen o no otros ligandos fisiológicos además de atRA, pero ninguno de ellos se puede unir a 9-cis RA, el ligando preferido para los receptores RXR, con alta afinidad (Allenby et al., 1993). Además, el AR induce la expresión de las CRABPs (1 y 2) (Giguère et al., 1990; Leroy et al., 1991a, 1991b; Smith et al., 1991; Kamei et al., 1993; Serpente et al., 2005). Por lo tanto, se sugirió que el papel de las proteínas CRABPs podría ser el control de la concentración real del AR libre en una célula determinada (Boylan y Gudas, 1991; Maden et al., 1988; Robertson, 1987; Ruberte et al., 1991; Smith et al., 1989).

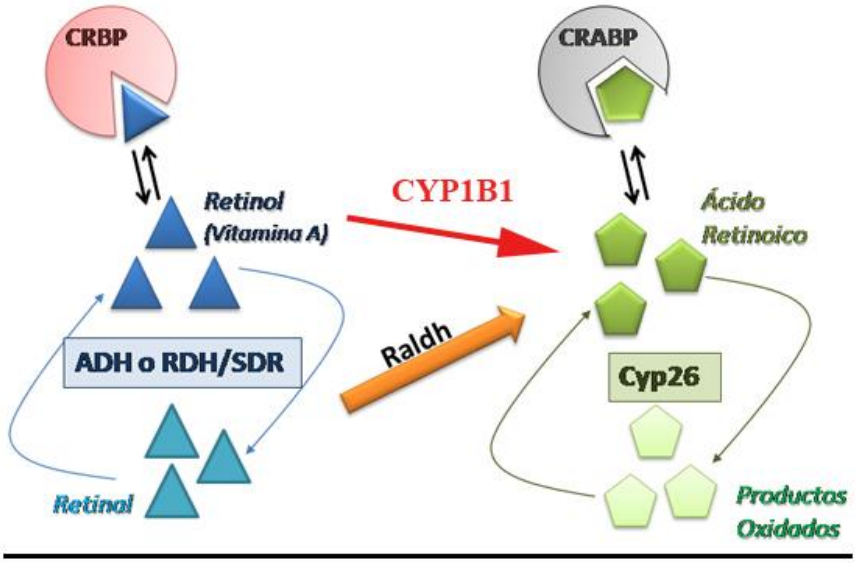


Figura 6. Esquema representativo de la síntesis, degradación y modo de acción del ácido retinoico. Ver texto.

La localización tisular de las proteínas CRABPs ha proporcionado algunas ideas sobre el papel potencial de estas proteínas en el metabolismo y la acción del AR (Dollé et al., 1990; Maden et al., 1988, 1991; Ruberte et al., 1992a; Ruberte et al., 1993). Con todo ello, se sugirieron tres funciones para las proteínas CRABPs: (1) secuestrar y acumular diferencialmente AR en el citoplasma en condiciones de escasez de vitamina A (Napoli, 1996; Singh et al, 1990), impidiendo su entrada en el núcleo y manteniendo el AR alejada de los RAR (Dollé et al., 1990; Maden et al., 1988, 1991; Ruberte et al., 1992b, 1993; Cai et al., 2012); (2) transportar el AR al núcleo para interactuar con los receptores nucleares, RARs, *in vitro* (Takase et al., 1979, 1986; Singh et al., 1990; Aström

et al., 1991; Napoli, 1996; Delva et al., 1999; Dong et al., 1999; Budhu y Noy, 2002; White y Schilling, 2008; Cai et al., 2012); y (3) hacer interaccionar al AR con las enzimas CYP26 para promover la degradación (Boylan y Gudas, 1991, 1992; Fiorella y Napoli, 1991, 1994; Dong et al., 1999; Chen et al., 2003; White y Schilling, 2008; Cai et al., 2012; ver más adelante). Estas funciones pueden diferir para cada subtipo CRABP y no son mutuamente excluyentes (White y Schilling, 2008). El CRABP-1 puede formar parte del catabolismo de retinoides porque la oxidación del AR exógena es más rápida en presencia de altos niveles de CRABP-1, lo que sugiere que protege a las células sensibles a sobredosis de AR o participa en la formación de gradientes morfogenéticos (Napoli, 1996; Singh et al., 1990). Por lo tanto, en los tejidos embrionarios, existe una clara correlación entre la vulnerabilidad al exceso de AR y la localización del CRABP-1 (Dencker et al., 1990; Dollé et al., 1990; Vaessen et al., 1990; Ruberte et al., 1991, 1992a, 1993; Maden et al., 1991; Lyn y Giguère, 1994; Leonard et al., 1995). Estos resultados son consistentes con la premisa de que los CRABPs actúan tanto facilitando las interacciones entre el AR y los RAR como promoviendo la degradación del AR. Es probable que CRABP-2 mejore los efectos transcripcionales del AR, mientras que CRABP-1 reduce sus efectos (Dong et al., 1999; Michalik y Wahli, 2007; Cai et al., 2012).

Más específicamente, la distribución de la transcripción de *CRABP-1* se correlaciona con estructuras que se sabe que son el blanco de la teratogénesis inducida por exceso de retinoides: las células que expresan *CRABP*-1 no pueden tolerar altos niveles de AR para sus funciones normales de desarrollo (Ruberte et al., 1992a). Estos datos han llevado a sugerir que el CRABP-1 actúa como un amortiguador en el citoplasma al limitar la disponibilidad de AR a sus receptores nucleares RAR (Dollé et al., 1990; Maden et al., 1988, 1991; Ruberte et al., 1992a, 1992b, 1993) y al facilitar su degradación por CYP26s (Boylan y Gudas, 1992; Fiorella y Napoli, 1991, 1994; Dong et al., 1999; Won et al., 2004; Thatcher e Isoherranen, 2009; véase apartado 1.4.3.).

Los patrones específicos de expresión de la distribución espacio-temporal de los CRABPs están bien documentados durante la embriogénesis, especialmente en el ratón (Dencker et al., 1990; Dollé et al., 1990; Lyn y Giguère, 1994; Maden et al., 1991; Ruberte et al., 1991, 1992a, 1993; Vaessen et al., 1989, 1990). La expresión de CRABP-1 durante

el desarrollo del sistema nervioso central, las células de la cresta neural, los ganglios craneales, la placoda ótica temprana y los tejidos adyacentes ya fue descrita (Kitamoto et al., 1989; Dollé et al., 1990; Singh et al., 1990; Ruberte et al., 1991, 1992a, 1992b). La eliminación de CRABP-1 y CRABP-2 en ratones causa dedos supernumerarios en el miembro anterior, pero los adultos son viables (de Bruijn et al., 1994; Gorry et al., 1994; Fawcett et al., 1995; Lampron et al., 1995). En los estudios de *knockout* de ratones, la interrupción de los genes *CRABP-1* o *-2* sólo muestra defectos leves en el desarrollo de las extremidades (Fawcett et al., 1995), lo que sugiere que: (1) otras proteínas pueden compensar las CRABPs en la señalización del AR (Romand et al., 2000) y que (2) las proteínas CRABPs pueden estar implicadas en la generación de gradientes de concentración apropiados de AR en las extremidades en desarrollo (Bushue y Wan, 2010).

La formación de divisiones romboméricas en el neuroepitelio del cerebro posterior durante la neurulación fue acompañada por un patrón de expresión cambiante de CRABP-1 y CRABP-2. Este patrón mostró diferentes niveles de intensidad de las transcripciones en diferentes etapas y en diferentes lugares (Ruberte et al., 1992a). Se propuso que el AR, unido a CRABP-1, estaría implicado en esta regulación (Dollé et al., 1990; Ruberte et al., 1991). Las observaciones de expresión de CRABP-1 indican que se expresa en posiciones apropiadas y en etapas apropiadas para jugar este papel (Ruberte et al., 1991, 1992a). Por otra parte, el patrón diferencial de la transcripción de *CRABP* en el cerebro posterior también es relevante para las contribuciones específicas de los rombómeros a la cresta neural (Müller and O'Rahilly, 1985; Tan y Morriss-Kay, 1986). Las primeras células de la cresta, que migran a los arcos faríngeos (Tan y Morriss-Kay, 1986; Clouthier et al., 2000), muestran un fuerte marcaje con la sonda CRABP-1, pero sólo están ligeramente teñidas para CRABP-2. Después de la formación de rombómeros, una segunda población de células de la cresta emigra para formar los ganglios craneales (Lammer et al., 1985; Morriss-Kay et al., 1991; Ruberte et al., 1993; Bard et al., 2008; Boddupally et al., 2016).

Para aclarar mejor las funciones de CRABP-1, describimos sus patrones de expresión y los comparamos con los patrones de expresión del AR durante el desarrollo

embrionario del oído interno del pollo. Por lo tanto, este análisis podría proporcionar una visión de cómo se regula la síntesis, el transporte, la localización y la acción del AR y cómo ésta se vincula a los procesos celulares.

1.3.3.3. LAS ENZIMAS CYP26.

La gran superfamilia del gen citocromo P450 (CYP) codifica las enzimas P450, que normalmente participan en la desintoxicación de sustancias químicas exógenas, como fármacos, carcinógenos químicos y contaminantes ambientales, así como en el metabolismo de sustratos endógenos, como esteroides, ácidos grasos, vitaminas y prostanoides (Nebert et al., 2004). Dentro de este grupo de enzimas está la familia del citocromo P450 tipo 26 (CYP26A1, B1 y C1), que son hidroxilasas de ácido retinoico (Niederreither et al., 2002; Figura 6). El control espacial y temporal preciso de la expresión de los genes *Cyp26* durante la embriogénesis es, por lo tanto, necesario para limitar la exposición de los tejidos al AR, un aspecto esencial de la morfogénesis normal. Aunque se ha sugerido que los metabolitos generados por las enzimas CYP26 pueden ser biológicamente activos, las evidencias moleculares indicas que el papel principal de las CYP26 es la degradación del AR (Niederreither et al., 2002; Pennimpede et al., 2010).

Es interesante destacar que, en el pez cebra, los efectos de la señalización del AR a lo largo del eje anterior-posterior (A-P) del cuerpo pueden no depender únicamente de la simple difusión de moléculas de AR a partir de una fuente posterior, sino más bien de la compleja regulación de los genes implicados en el metabolismo del AR, en particular los *Cyp26s* (White y Schilling, 2008). En consecuencia, los patrones de expresión de los genes *Cyp26A1*, *Cyp26B1* y *Cyp26C1* durante la organogénesis son distintos y se limitan principalmente a los tejidos que son particularmente sensibles a los efectos reguladores y teratogénicos del AR (Fujii et al., 1997; MacLean et al., 2001). Por lo tanto, las enzimas CYP26 son altamente específicas para el AR y su función principal es crear una barrera para mantener los tejidos en un estado libre de AR (Abu-Abed et al., 2001; MacLean et al., 2007).

El primer miembro de la familia CYP26 en ser identificado, *Cyp26A1*, ha sido descrito en los embriones de *Xenopus*, pollo y ratón (Fujii et al., 1997; Hollemann et al., 1998; de Roos et al., 1999; Swindell et al., 1999; Blentic et al., 2003). *Cyp26A1* tiene un patrón de expresión dinámico en la región anterior del epiblasto, el esbozo de la cola y el tubo neural dorsal. En ratones con el gen *Cyp26A1* bloqueado, los fenotipos observados son consistentes con el exceso de administración de AR, incluyendo regresión caudal y espina bífida (Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001). Estos defectos sugieren un papel para CYP26A1 en la regulación de los niveles del AR en el extremo caudal del embrión (Reijntjes et al., 2004). Un segundo miembro de la familia, *Cyp26B1*, ha sido descrito en ratón (MacLean et al., 2001; Abu-Abed et al., 2002) y en aves (Maden et al., 2007), donde sin duda se ha demostrado su regulación en el metabolismo del AR (Reijntjes et al., 2003). El patrón de expresión de *Cyp26B1* en el embrión del pollo sugeriría un papel para este gen en la vasculogénesis (Reijntjes et al., 2003). El tercer miembro de la familia, *Cyp26C1*, ha sido descrito en la embriogénesis de ratones. En los primeros estadios de desarrollo, su expresión se encuentra en los rombómeros prospectivos 2 y 4, así como en el primer arco branquial. Durante la gestación tardía, se detecta una expresión evidente de *Cyp26C1* tanto en el laberinto membranoso en desarrollo como en el epitelio dental (Tahayato et al., 2003). También se sugirió que la enzima CYP26C1 es claramente responsable de generar el gradiente de AR en el eje rostro-caudal del mesodermo en etapas tempranas de desarrollo, prediciendo que los ratones mutantes nulos para *Cyp26C1* muestran un fuerte fenotipo anterior del SNC (Reijntjes et al., 2004). Curiosamente, todos estos genes *Cyp26* difieren en los detalles de sus patrones de expresión entre el pollo y el ratón (Reijntjes et al., 2004).

La caracterización de los patrones de expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la homeostasis del AR puede proporcionar información sobre las funciones del AR en el oído interno en desarrollo. Con este fin, hemos realizado un análisis exhaustivo de la expresión de los genes *Cyp26s* en varias etapas de desarrollo durante la embriogénesis de los pollos. Nuestro análisis de hibridación *in situ* reveló que la expresión de los *Cyp26s* está muy a menudo confinada a diferentes tejidos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

El oído interno de vertebrados es un complejo órgano sensorial con funciones vestibulares y auditivas, el cual deriva de las placodas óticas, porciones engrosadas del ectodermo cefálico que sufren importantes cambios morfogenéticos tras su invaginación para formar la vesícula ótica. La especificación del epitelio ótico parece estar regulada por la expresión asimétrica de diversas familias de genes, proporcionando una identidad posicional a cada parte durante el desarrollo embrionario de esta compleja estructura tridimensional. En la actualidad, uno de los objetivos principales en el estudio del desarrollo del oído interno es determinar los factores moleculares y celulares implicados en la regionalización del epitelio ótico, así como en la especificación y determinación de los diferentes elementos sensoriales y no sensoriales que se desarrollan a partir del epitelio ótico.

El propósito de nuestro grupo de investigación es conocer los genes implicados en el desarrollo del oído interno. Hemos tomado el oído interno de aves, considerado como un modelo de estudio en trabajos experimentales en Biología del Desarrollo. Algunas de las razones para optar por aves es que su oído es más complejo, contando con dos zonas sensoriales adicionales respecto del oído de mamíferos (mácula neglecta, mn, y mácula de la lagena, ml), con lo que puede aportar más información como modelo. Pero principalmente, su elección se debe a que se tiene un amplio conocimiento del mapa de destino para el oído interno de aves (Sánchez-Guardado et al., 2014), lo que nos aporta información a la par que permite integrar nuestros resultados en un marco global embrionario.

Por ello, en la presente tesis doctoral, hemos abordado los siguientes objetivos:

1. Describir exhaustivamente los patrones de expresión tanto espaciales como temporales de los genes que especifican para las siguientes proteínas implicadas en el metabolismo y acción del ácido retinoico: CYP1B1, CRABP-1, y de la familia CYP26 (CYP26A1, CYP26B1 y CYP26C1). Con ello se pretende conocer el posible papel de dichas

proteínas en la especificación de diferentes estructuras durante el desarrollo del oído interno.

2. Comprobar si las expresiones de estos genes forman compartimentos dentro del epitelio ótico, acorde con la teoría de los compartimentos limitados.

3. Estudiar la posible interacción entre estos genes a través de sus patrones de expresión, especialmente en la especificación y segregación de los diferentes elementos sensoriales y no sensoriales del oído interno de aves.

Estos trabajos descriptivos se realizarán en el desarrollo embrionario del oído interno de *Gallus gallus*, entre los estadios HH18 y HH34 de Hamburguer y Hamilton (1951), tres y ocho días de incubación, respectivamente. Compararemos la expresión de estos genes con: (1) la expresión del gen *Fgf10*, un marcador de los elementos sensoriales del oído interno de aves durante el desarrollo embrionario (Sánchez-Guardado et al., 2013); y, en algunos casos, (2) con la inervación de dichos elementos por axones del ganglio acústico-vestibular (GAV), marcado con inmunohistoquímicas con los anticuerpos 3A10 (Sánchez-Calderón et al., 2004, 2005a, b, 2007a, b; Sánchez-Guardado et al., 2009, 2011, 2013). Otros marcadores específicos han sido también utilizados para confirmar los resultados descriptivos presentados en esta Tesis Doctoral.

Los cambios en la expresión de los genes *Cyp1B1*, *CRABP-1*, *Cyp26A1*, *Cyp26B1* y *CYP26C1* son buenas indicaciones para técnicas de base molecular desarrolladas con el objetivo de predecir los riesgos teratogénicos que presentan los compuestos químicos, tales como el ácido retinoico en el desarrollo de estructuras embrionarias y de su función en la etapa adulta (Kojima et al., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL DE ESTUDIO.

En los diferentes experimentos se utilizaron embriones de pollo (*Gallus gallus*, variedad Leghorn blanco). Los huevos fueron incubados en un intervalo de temperatura que oscila entre 37-38ºC y con humedad relativa constante en una estufa sin volteo. Los embriones usados fueron extraídos en los estadios HH18-20 (65-69 horas, 3 días), HH24-25 (96 horas, 4 días), HH27-28 (120 horas, 5 días) y HH34 (192 horas, 8 días) (clasificado por Hamburger y Hamilton, 1951).

3.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL.

3.2.1. FIJACIÓN.

Para la fijación de los embriones se utilizó paraformaldehido al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M (1x) pH 7,4 (Tabla A).

PBS 1 M (10 x) (1L)		PBS 0,1M (1x) (1L)	
NaCl	80 gr	PBS 1M	100 mL
KCl	2 gr	Agua miliQ	900 mL
Na_2HPO_4	11,5 gr	*Ajustar pH a 7,4*	
KH_2PO_4	2 gr		
En 1 L de agua miliQ			

Tabla A. Composición del PBS.

Para preparar el fijador de ponen 800 mL de agua estéril a calentar a unos 80ºC. En la campana de gases, se añaden 40 gr de paraformaldehido. Esta solución se agita hasta ver que se disuelve completamente, perdiendo su color lechoso y volviéndose completamente transparente. Para su mejor disolución se añaden 3 ó 4 gotas de NaOH (0,1M). Luego se enrasa hasta 900 mL con agua miliQ. Una vez la solución se enfría, se añaden 100 mL de PBS 10x (Tabla A).

Los embriones comprendidos entre los estadios HH18 y HH34 se extraen de los huevos y se depositan en una placa de Petri con PBS 0,1M (Figura 1A). Empleando una lupa binocular, se determinan sus estadios de desarrollo según la tabla de Hamburger y Hamilton (1951). Por último, las cabezas se separan del resto del cuerpo y se fijan por inmersión en paraformaldehido al 4% durante 12 horas a 4ºC.

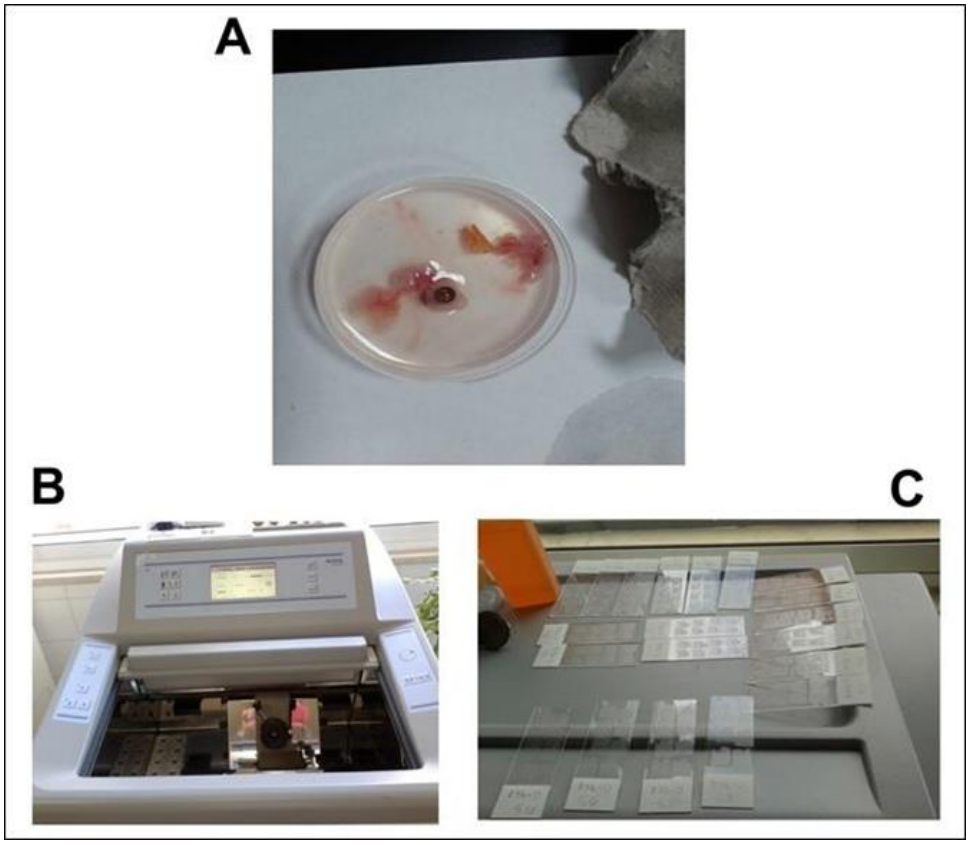


Figura 1. A) Embrión de pollo de estadio HH34 en placa de Petri con PBS 0´1x. **B)** Microtomo criostático. **C)** Secciones seriadas alternas.

3.2.2. CONGELACIÓN.

Tras la fijación, las piezas se lavan varias veces con PBS 0,1M durante 48 horas. A continuación, se pasan a una solución de PBS-Sacarosa (10%, Tabla B), en la que se mantienen 24-48 horas a 4ºC.

PBS-Sacarosa (10%) (1L)	
PBS 0,1M	800 mL
Sacarosa	100 gr
Disolver	
PBS 0,1M	Enrasar a 1L

Tabla B. Composición del medio de crioprotección.

Posteriormente, las piezas se pasan a una solución compuesta por sacarosa (10%), gelatina (15%) y PBS 0,1M (Tabla C) durante 30 minutos a 37ºC. Con este paso se consigue que la sacarosa-gelatina envuelva por completo la pieza.

PBS-Sacarosa (10%)-Gelatina (10%) (1L) -> en un matraz	
PBS 0,1M	800 mL en agitación
Sacarosa	100 gr
Gelatina	100 gr
Disolver	
PBS 0,1M	*Enrasar a 1L*

Tabla C. Composición de la solución de congelación.

Por otra parte, se añaden 2 mL de solución PBS-Sacarosa-Gelatina a unas bandejas de plástico de 5x5 cm, las cuales se colocan a 4ºC hasta que se solidifica la mezcla. A continuación, las piezas se extraen de la solución PBS-Sacarosa-Gelatina y se colocan en las bandejas de plástico sobre las bases solidificadas de PBS-Sacarosa-Gelatina. Se añade más solución sobre las piezas. Después, se dejan a 4ºC durante aproximadamente 15 minutos con el fin de que solidifique la solución que envuelve las piezas. Debido a que las piezas tienden a posicionarse cerca de la superficie de la solución, una vez solidificada, se añaden 2 mL más de PBS-Sacarosa-Gelatina para cubrir completamente las piezas y de nuevo se dejan a 4ºC, 15 minutos, para que solidifique. Entonces se sacan los bloques de gelatina de las bandejas de plástico y, en la lupa, se cortan con cuchillas en bloques cúbicos individuales para cada pieza, debidamente

orientadas.

Por otra parte, se recortan cuadrados de 2x2 cm en una lámina de corcho de 3 mm de espesor. Sobre el adverso se anota el número identificativo de la pieza que se va a congelar. En el reverso se añaden unas gotas de pegamento Tissue-Tek, sobre las cuales se coloca el bloque que contiene la pieza en su interior.

Seguidamente el bloque se congela a -70ºC. Para ello se utilizó alcohol isopropílico (2-propanol) al que se le añade hielo seco (nieve carbónica) para alcanzar una temperatura comprendida entre -60 y -75ºC. Bajo la campana de extracción de gases, los bloques se sumergen durante 2 minutos, se extraen, se secan con papel absorbente y se envuelven en papel de aluminio, debidamente etiquetados. Las piezas se almacenan a -80ºC hasta el momento de ser cortadas en microtomo criostático.

3.2.3. MICROTOMÍA.

Los cortes se realizan en microtomos criostáticos (Leica CM 1900 y Microm Dogmo 550) (Figura 1B) con un grosor de 20 µm a -20ºC. Se obtienen series alternas para realizar posteriormente las distintas hibridaciones *in situ* y técnicas inmunohistoquímicas. Los cortes se recogen en portaobjetos cargados positivamente Superfrost plus (Thermo Scientific; Figura 1C), se dejan secar y se almacenan a -80ºC hasta su uso.

3.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

3.3.1. OBTENCIÓN DE LAS SONDAS.

NOTA: información obtenida de la base de datos de GEISHA ARIZONA (http://geisha.arizona.edu/geisha/index.jsp).

- ***Cyp1B1***
  - Procedencia: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=457760#

- ***CRABP-1B***
  - Primer sentido: 5'- ACATCAAAACTTCCACCACTGTCC – 3'
  - Primer anti-sentido: 5' – ATTAACCCTCACTAAAGGACACACACGGTCACATACAACACC – 3'
  - Procedencia: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=456517#

- ***Cyp26A1***
  - Primer sentido: 5' – AATCTTGCAGGGAGATTGTCC – 3'
  - Técnica de obtención: PCR
  - Procedencia: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=451982#

- ***Cyp26B1***
  - Procedencia: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=456437

- ***Cyp26C1***
  - Procedencia: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=450192

- ***Irx1***
  - Primer sentido: 5' – AACACCGCAAGAACCCCTACCC – 3'
  - Primer anti-sentido: 5' – AATTAACCCTCACTAAAGGAAGCCCCATTTGTCCAGTTGTG – 3'
  - Enzima de restricción: Not 1 (anti-sentido)
  - ARN Polimerasa: T3 (anti-sentido)

- Técnica de obtención: RT-PCR
- Procedencia: Laboratorio de la Dra. Pilar Aroca (Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia)
- http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=455080

➢ ***Irx2***

- Primer sentido: 5' – TTATAAAAGCTTGCGGCCGCAGAATATTCCCCTTACGACGCCCATAC – 3'
- Primer anti-sentido: 5' – GCTCTAGAAATTAACCCTCACTAAAGGTTTGAAGCCACTGCCGCCGAGTTG – 3'
- Enzima de restricción: Eco R1 (anti-sentido)
- ARN Polimerasa: T7 (anti-sentido)
- Técnica de obtención: RT-PCR
- Procedencia: Laboratorio de la Dra. Pilar Aroca (Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia)
- http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=455080

➢ ***Irx3***

- Primer sentido: 5´- GCCGCCTTCCCGCACCACCA -3´
- Primer anti-sentido: 5´- GCCGTAGGAGTTGCCCTCCTC -3´
- Enzima de restricción: Sac I (anti-sentido)
- ARN Polimerasa: T7 (anti-sentido)
- Técnica de obtención: RT-PCR
- Procedencia: Laboratorio de la Dra. Pilar Aroca (Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia)

➢ ***Irx4***

- Enzima de restricción: Not 1 (anti-sentido)
- ARN Polimerasa: T3 (anti-sentido)
- Técnica de obtención: RT-PCR

- Procedencia: Laboratorio de la Dra. Pilar Aroca (Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia)
- http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=451499

➢ ***Irx5***

- Primer sentido: 5´- GCAGTGCCCCTTCCCCAACG -3´
- Primer anti-sentido: 5´- GAACCGAAGCACAGTCCCAGC -3´
- Enzima de restricción: Nco 1 (anti-sentido)
- ARN Polimerasa: SP6 (anti-sentido)
- Técnica de obtención: RT-PCR
- Procedencia: Laboratorio de la Dra. Pilar Aroca (Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia)

➢ **Irx6**

- Primer sentido: 5´- TACGGGCCGGTGGACTTCACC -3´
- Primer anti-sentido: 5´- TCCTGTCCCGCCCTGCCCTAC -3´
- Enzima de restricción: Nco 1 (anti-sentido)
- ARN Polimerasa: SP6 (anti-sentido)
- Técnica de obtención: RT-PCR
- Procedencia: Laboratorio de la Dra. Pilar Aroca (Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia)

➢ ***Fgf10***

- Primer sentido: 5' – TTATAAAAGCTTGCGGCCGCAGAATATACCAGGTTTTACCCATCCAGTATG – 3'
- Primer anti-sentido: 5'- GCTCTAGAAATTAACCCTCACTAAAGGTTGTGGCTCCCCTTCCATTC – 3'
- Técnica de obtención: RT-PCR
- Procedencia: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=449229#

Para la técnica RT-PCR (PCR utilizando transcriptasa reversa) en primer lugar se procede a la extracción de ARN a partir de células de embriones de pollo de estadios HH18-20, HH24-25, HH27-28 y HH34 tratadas con Trizol (Invitrogen). El ARN obtenido se trata con DNAsa I (Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, la enzima se inactiva elevando la temperatura a 65ºC. Luego, con el ARN obtenido, siguiendo las instrucciones del fabricante, se sintetizó una sola hebra de ADN (1c DNA) utilizando la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) y los *primers* elegidos al azar. Las secuencias de los ADN monocatenarios resultantes (0,5 µL de la reacción de la transcriptasa reversa) se usan para la amplificación de dichas secuencias mediante una reacción de PCR (Tabla D), con la polimerasa Taq (Promega) y los *primers* específicos.

PCR				
94ºC	35 ciclos			72ºC
5 minutos	94ºC	59ºC (Tm)	72ºC	10 minutos
	30 segundos	1 minuto	1 minuto	

Tabla D. Condiciones de la PCR.

El producto de la PCR se introduce en un plásmido (pGEM-T Easy Vector System (Promega); Figura 1D) con resistencia a ampicilina y con 3015 pb. Este plásmido es parte de los conocidos como sistemas TA, que contienen extremos libres de timidina. El procedimiento de ligazón por el cual se insertaron los segmentos de este plásmido implica la hibridación de los extremos libres de timidina del plásmido con los extremos libres conteniendo adenina del inserto (secuencia de interés). La ligazón se realiza utilizando las proporciones del inserto y el plásmido recomendadas para el sistema p-GEM®-T Easy Vector (Promega) (Figura 1D) junto con la ligasa T4 incubados toda la noche a 14ºC. Para la sonda de *cFgf10* el plásmido usado es pCRII-TOPO (Invitrogen) (Sánchez-Guardado et al., 2013) (Figura 1D).

Una muestra del producto de ligazón se utilizó para transformar bacterias (Tabla E), sembradas después en placas de agarosa enriquecidas con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido, BCIG). Las placas se cultivan a 37ºC durante toda la noche. Como las bacterias fueron cultivadas en medios de agarosa con ampicilina, sólo crecieron aquellas bacterias transformadas que contenían el plásmido. La selección entre bacteria que tienen plásmido con inserto o sin inserto se realizó según el método conocido como colonias azules y colonias blancas, considerando que la introducción del inserto en el plásmido interrumpe el código de lectura para la expresión de la enzima β-galactosidasa, por lo tanto aquellas bacterias que tienen plásmido sin inserto expresarán la enzima y se tornarán azuladas, mientras que aquellas que tienen el inserto e interrumpido el marco de lectura para la enzima adoptarán un color blanquecino debido a que no pueden procesar el X-gal. Una vez seleccionadas las colonias blancas candidatas, fueron enviadas para su secuenciación comprobando de este modo que se contaba con la secuencia deseada.

Medio de cultivo de bacterias competentes		
	1 L (líquido)	500 mL (sólido)
Peptona (triptona)	10 gr	5 gr
Extracto de levadura	5 gr	2'5 gr
NaCl	10 gr	5 gr
NaOH 10N	500 µL	250 µL
Agar agar	------	7'5 gr
Con imán en mezclador (+ calor). ***AUTOCLAVAR***.		
Ampicilina (stock 100 mgr/mL) 1:1000, ej. 1mL en 1L	*En el momento de echar las bacterias*	*Cuando esté templado*
		Placas de Petri (≈ 13) **CON LÁMPARA DE ALCOHOL**

Tabla E. Medio de cultivo de bacterias competentes

Una vez comprobado que se había clonado el fragmento deseado, se cultiva una

muestra de las bacterias transformadas mediante Nucleobond Xtra Midi (Machery-Nagel, Ref. 740410BQ). De esta manera se obtiene una concentración de plásmido suficiente como para sintetizar posteriormente la sonda. Para ello, se utilizan enzimas de restricción y correspondientes ARN polimerasas según qué secuencia, sentido o anti-sentido.

Posteriormente se realiza digestión enzimática para pasar el plásmido de ADN circular a lineal. Se hace con un kit (QIAquick PCR Purification Kit, Roche), cuyas enzimas y demás elementos vienen determinados por la casa comercial.

3.3.2. SÍNTESIS DE SONDAS A PARTIR DE PLÁSMIDOS LINEALES.

Como recomendación general, es conveniente que los insertos que van a ser usados como sondas nunca sean menores de 100 pares de bases ni excedan de 1400 pares de bases, siendo el mejor los tamaños alrededor de 800-1000 pares de bases.

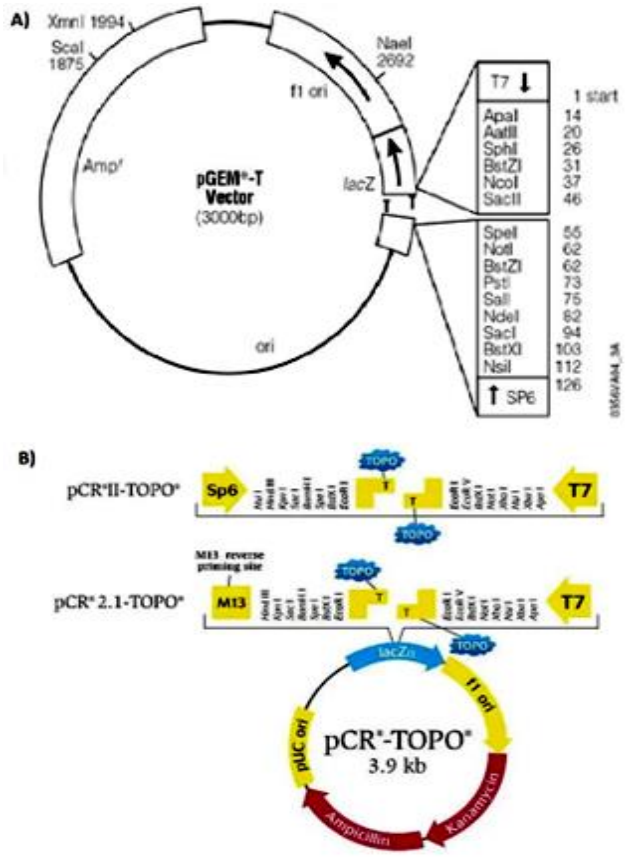


Figura 2. A) Plásmidos pGEM-T Easy Vector (*Irx1-6*). **B)** pCRII-TOPO (*cFgf10*).

Partiendo de un plásmido linealizado, se necesitan 20 µL (Tabla F) de una solución que contiene:

1º	H2O sigma (RNasa free)	*variable, ajustar según µL de DNA, hasta 20 µL*
2º	Tampón de transcripción (10x)	2 µL
3º	RNA labeling Mix	2 µL
4º	DNA lineal (X µgr/µL)	X µL (*variable según la concentración stock, debe haber 1µgr*)
5º	RNAsina (RNAguard) (Inh de RNasa)	1 µL
6º	RNA polimerasa correspondiente	1 µL

Tabla F. Composición de la solución para síntesis de ribosonda.

Tras preparar la solución en un eppendorf, se centrifuga para que quede homogénea y se deja incubar 2 horas a 37 ºC. A continuación, se añade 1 µL de ADNasa I y se deja que reaccione durante 45 minutos a 37 ºC para que destruya el ADN. Con este paso se consigue tener sólo la ribosonda (sonda de ARN) deseada. Luego se precipita el contenido de la solución de síntesis (Tabla G):

Precipitación de la sonda		
Agua sigma	LiCl (4M)	Etanol (100%)
80 µL	10 µL	300 µL

Tabla G. Composición de la solución de precipitado de sondas

Se deja la mezcla 12 horas (toda la noche) a -20ºC. Después se centrifuga a velocidad máxima (13.000-14.000 rpm) durante 30 minutos a 4ºC. Se elimina el

sobrenadante. Se añaden 300 µL de etanol 100% y se centrifuga 10 minutos a 4ºC y 14.500 rpm.

Se elimina el sobrenadante. Se añaden 300 µL de etanol 70% y se centrifuga 10 minutos a 4ºC y 13.000-14.000 rpm. Se deja con tapón abierto en la estufa 5-10 minutos a 37ºC para que se evapore el resto del etanol.

Se suspende en 20 µL de agua Sigma y se deja 10 minutos a 4ºC. Se colocan 1 ó 2 µL de la solución de sonda en el pocillo de un gel de agarosa de electroforesis para comprobar que los fragmentos obtenidos corresponden con el deseado. Y una vez comprobado, se añaden 60 µL de tampón de hibridación, y se almacena a -20ºC.

3.3.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* SOBRE SECCIONES DE CRIOSTATO.

1er Día.

Los cortes almacenados a -80ºC se dejan secar a temperatura ambiente durante 1 hora. Con esto se consigue que los cortes queden bien adheridos a los portaobjetos, impidiendo que se desprendan durante todo el procesamiento.

Una vez secos, los cortes fueron fijados con paraformaldehido al 4% en PBS 0,1M durante 10 minutos, con el fin de eliminar toda la actividad enzimática del tejido. Después, se lavó el material en PBS 0,1M, 3 veces durante 10 minutos, sin contar un primer lavado rápido que se hizo para eliminar de forma masiva el paraformaldehido.

A continuación, se procedió a la acetilación. Mediante este paso se consigue la saturación de los lugares inespecíficos para a sonda. Para ello se preparó la siguiente solución (Tabla H):

1º	agua miliQ	234 mL
2º	trietanolamina	3,2 mL

3º	HCl (36%) (*en campana de extracción de gases*)	420 µL

Tabla H. Solución de acetilación.

Se colocaron los portaobjetos dentro de un recipiente con agitación suave y después se añadieron 600 µL de anhídrido acético. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego, se permeabiliza el material con PBS-T (Triton X-100 al 1% en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones, 3 veces durante 10 minutos, con PBS 0,1M.

Seguidamente, se incubaron con tampón de hibridación (TpH) en horizontal (cámaras húmedas) durante 2 horas a temperatura ambiente, utilizando para ello una campana de extracción de gases. La composición del tampón de hibridación (Tabla I) para 10 mL es la siguiente:

En campana de extracción		
1º	Formamida	5 mL
2º	Salt 10x (Tabla J)	1 mL
3º	Dextran sulfato 50%	2 mL
4º	tRNA (10 mgr/mL)	0,5 mL
5º	Denhart´s (50x)	200 µL
6º	Agua miliQ	1,3 mL

Tabla I. Composición del tampón de hibridación.

Salt 10x	
NaCl	157 gr
Tris HCl, pH 7,5	14,04 gr
Tris Base	1,34 gr
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	7,8 gr
NaH_2PO_4	7,1 gr
EDTA 0,5M	100 mL

Agua	hasta 1000 mL

Tabla J. Composición del tampón de hibridación.

Tras la incubación con el tampón de hibridación, se diluye la sonda a una proporción 1/50, 1/100 ó 1/200 (según la concentración de sonda) en el mismo tampón de hibridación. Los tubos con la sonda diluida se someten a un choque térmico en un baño térmico a 80ºC. Con esto se consigue que la sonda se desnaturalice y pueda hibridar correctamente. Una vez desnaturalizada, se mantienen los tubos en hielo, un mínimo de 5 minutos, para evitar la renaturalización. En la campana de extracción de gases se dispensan 200 µL de sonda diluida por porta. Se coloca un cubreobjetos sobre las secciones para homogeneizar la solución sobre todos los cortes y prevenir también la evaporación. Luego se colocan las cámaras húmedas en la estufa a 72ºC y se deja incubar 12 horas.

2º Día.

Tras la incubación de los portaobjetos con la sonda se prepara una solución de SSC 0,2x a partir de la solución madre (20x) (Tabla K) y se ponen durante 5 minutos en el baño térmico a 72ºC, para evitar un cambio térmico brusco de los portaobjetos.

SSC (20X) 1 L		
1º	agua miliQ	800 mL
2º	NaCl	175,3 gr
3º	citrato sódico	88,2 gr
4º (*ajustar el pH a 7*)	ácido cítrico	unos 240 µL
5º	agua miliQ	*enrasar a 1 L*

Tabla K. Composición del SSC.

A continuación, se retiran los cubreobjetos de las secciones, se introducen en la

solución de SSC 0,2x calentada, y se deja incubar durante 45 minutos a 72ºC en el baño térmico.

Luego, se realiza un lavado en SSC 0,2x a temperatura ambiente durante 5 minutos, y seguidamente 3 lavados de 10 minutos con la solución B1 (Tabla L).

Tampón B1 (0,1M Tris pH 7,5-7,6; 0,15 M NaCl); Volumen final 1L		
1º	H_2O miliQ	870 mL
2º	Tris pH 7,5-7,6 1M	100 mL
3º	NaCl 5M	30 mL
4º	Triton X-100 al 25%	4 mL (*añadir lo último por la espuma*)

Tabla L. Composición de la solución B1.

Después se colocan los portaobjetos en horizontal en las cámaras húmedas y se dispensa sobre cada uno 300 µL de solución de bloqueo (solución B1 + NGS 10% + Lisina 10%). Se deja incubar al menos 1 hora (mejor 3-4 horas).

Por último, se prepara la solución de anticuerpo anti-digoxigenina (anti-Digo, AP) diluido a una proporción 1/3,500 en B2 (B1 + NGS 1%). Se dispensan 300 µL de dicha solución de anticuerpo sobre los portaobjetos en horizontal en las cámaras húmedas y se dejan incubar 12 horas (toda la noche) a temperatura ambiente.

3er Día.

Se realizan 3 lavados de 5-10 minutos con la solución B1, con los portaobjetos en vertical a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 2 lavados de 5 minutos con la solución B3 (Tabla M). Este paso se realiza para cambiar el pH del tejido a 9,5.

Luego se dispensan 300 µL de solución B4 sobre cada portaobjetos y se deja incubar a temperatura ambiente horizontalmente en las cámaras húmedas, controlando el tiempo y observando el revelado al microscopio. La composición para 20 mL de

solución B4 es la siguiente: 20 mL de solución B3 y 400 µL de sustrato NBT/BCIP (Cloruro de nitroblue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; Roche). Para mirar al microscopio el revelado, se colocan los portaobjetos en la solución B3. Si se quiere continuar con el revelado, se vuelven a poner en horizontal con 300 µL de solución B4.

Tampón B3 (para 1 L)	
agua miliQ	829 mL
Tris 1M pH 9,5	100 mL
NaCl 5M	20 mL
$MgCl_2$ 1M	50 mL
Tween 20 al 1%	1 mL (*añadir lo último por la espuma*)

Tabla M. Composición de la solución B3.

Finalmente, y una vez que ha terminado el revelado, las secciones se lavan varias veces con PBS-T para eliminar la solución de revelado y se procede al montaje con Mowiol (Tabla N). El Mowiol se maneja mejor si previamente se calienta a 60ºC. Para realizar el montaje se dispensa una raya de Mowiol sobre el portaobjetos con una jeringuilla de 1 mL, y desde un extremo se deja caer el cubreobjetos despacio procurando que no queden burbujas.

Moviol		
1º	glicerol	6 gr
2º	alcohol polivinílico 40-88	2,4 gr
3º	agua miliQ	6 mL
4º	*Esta mezcla se deja reposar durante toda la noche.* *Al día siguiente*	
5º	Tris 0,1 M pH 8,5	12 mL
6º	*Baño térmico a 70ºC durante 10 minutos, moviendo repetidas veces.*	
7º	*Se clarifica en la centrífuga a 5000 g durante 12 minutos.*	

8º	*Se alicuota y se almacena a -20ºC*	

Tabla N. Composición del Mowiol.

3.4. INMUNOCITOQUÍMICA POST-HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

Cuando se estimó conveniente, se realizó una inmunohistoquímica con el anticuerpo 3A10. Para ello, tras detener la reacción de revelado de la hibridación *in situ* con solución B3, los portaobjetos se meten en PBS 1x.

Se colocan en recipientes verticales y se dan dos lavados de 10 minutos con PBS-T 0,05%. Esta solución contiene: 1 L de PBS 0,1M y 2 mL de Triton X-100 al 25%.

En una inmunohistoquímica normal habría que aplicar en este momento un paso de bloqueo, que en este caso no es necesario, pues ya se realizó durante la hibridación *in situ*. Por ello, se pasa directamente a incubar las secciones en cámaras húmedas toda la noche (16-18 horas) a temperatura ambiente con el anticuerpo 3A10, dilución 1/40, más NGS al 1% en PBS-T.

El anticuerpo 3A10 es monoclonal (Developmental Studies Hybridoma Bank), uniéndose a un antígeno asociado a neurofilamentos y poniendo de manifiesto los axones de las células nerviosas.

Al día siguiente las secciones se lavan 3 veces durante 10 minutos en PBS-T. Después se incuban durante al menos 2 horas con el anticuerpo secundario GAM (*Goat Anti Mouse*) unido a biotina en una dilución 1/100 y NGS 1/100 en PBS-T. Luego se lavan 3 veces durante 10 minutos en PBS-T. Entonces las secciones se incuban durante al menos 2 horas con la enzima extravidín-peroxidasa (Sigma) en dilución 1/100 y NGS al 1% en PBS-T. Posteriormente las secciones se lavan de nuevo 3 veces durante 10 minutos en PBS-T, y después 2 lavados de 10 minutos con Tris 0,1 M, pH 7,5. Tras esto, se reveló la actividad peroxidasa con una solución sustrato que contiene 1 mL del

cromógeno diaminobencidina (DAB, al 0,03%) y 20 µL de agua oxigenada (al 0,005%) en 9 mL de Tris 0,1 M, pH 7,5, durante 20-30 minutos en horizontal, cámara húmeda, a temperatura ambiente. Por último, las secciones se lavaron varias veces en PBS-T para eliminar la solución de revelado y se procedió al montaje con Mowiol (explicado anteriormente).

El anticuerpo 3A10, desarrollado por T. M. Jessell y J. Dodd, fue obtenido del Banco de Estudios de Desarrollo de Hibridomas desarrollado bajo los auspicios del NICHD y mantenido por el Departamento de Biología de la Universidad de Iowa, Iowa City, IA, USA.

CAPÍTULO 1:

CYP1B1 en el desarrollo del oído interno

4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1*

4.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA (HH18)

A través de secciones transversales a la vesícula ótica (HH18-20), se detectaron transcriptos de *Cyp1B1* en su pared ventral-medial (flecha blanca en la Figura 1a), coincidiendo con el dominio pro-sensorial de *Fgf10* (Figura 1b; Sánchez-Guardado et al. 2013). Para analizar mejor la relación entre las áreas positivas de *Cyp1B1* y de *Fgf10*, también se estudiaron las secciones horizontales (Figura 1c, d). Se observó una expresión débil de *Cyp1B1* a lo largo de toda la pared media de la vesícula ótica (flecha blanca en la Figura 1c), excepto en su parte más caudal (flecha negra en la Figura 1c). En la porción más rostral de la vesícula ótica, el dominio positivo del *Cyp1B1* incluía el territorio presuntivo de la cresta anterior marcada con *Fgf10* (ca en la Figura 1c, d; ver también Sánchez-Guardado et al. 2013), mientras en su porción más caudal, el dominio negativo del *Cyp1B1* contenía la cresta posterior marcada con Fgf10 (cp en la Figura 1c, d). En esta etapa de desarrollo, el ganglio acústico-vestibular mostró una expresión de *Cyp1B1* muy débil, casi no detectada (GAV; asterisco negro en la Figura 1c).

Es destacable que el mesénquima situado entre el epitelio ótico y el cerebro posterior apareció fuertemente marcado con *Cyp1B1* (asterisco blanco; Figura 1a, c), siendo *Cyp1B1* negativo en el mesénquima situado entre la vesícula ótica y el ectodermo cefálico (asterisco púrpura en la Figura 1c). Las figura 1c y d resumen el patrón de expresión *Cyp1B1* en la pared de la vesícula ótica.

Figura. 1. Patrón de expresión del gen *Cyp1B1* en el estadio de vesícula ótica, HH18-20. Las secciones transversales (**a**, **b**) y horizontales (**c**, **d**) fueron tratadas con las sondas *Cyp1B1* y *Fgf10*. Las expresiones de *Cyp1B1* y *Fgf10* se observaron en la pared media de la vesícula ótica (flechas blancas en **a**-**d**), excluyendo el dominio presuntivo de la cresta posterior marcada con *Fgf10* (cp; flechas negras en **c**, **d**). El asterisco negro en **c** designa una expresión débil de *Cyp1B1* en el ganglio acústico-vestibular. Los asteriscos blanco y púrpura en **a** y **c** señalan el mesénquima periótico que expresa o no el gen *Cyp1B1*. (**e**, **d**) Diagramas 3D del patrón de expresión de *Cyp1B1* en el estadio de vesícula ótica, HH18-20, en las vistas anterior (**e**) y posterior (**d**). Las áreas punteadas muestran el dominio sensorial positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

---------- >

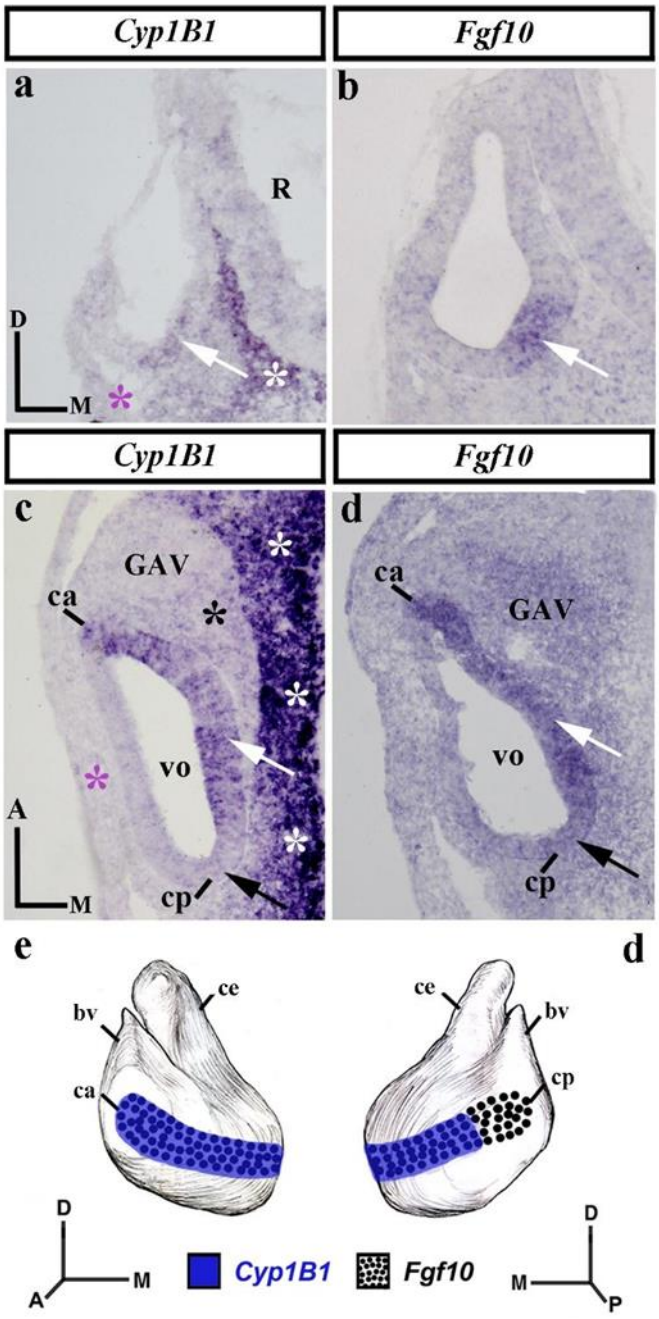


Figura 1

4.2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN LOS ESTADIOS HH24/25

En el estadio HH24/25, el oído interno muestra cambios morfogenéticos significativos. Los territorios presuntivos de casi todos los elementos sensoriales están claramente identificados en secciones transversales y horizontales tratadas con la sonda *Fgf10* (Figura 2; Sánchez-Guardado et al. 2013). En las secciones horizontales a nivel de

las regiones más dorsales (Figura 2a, b), la expresión de *Cyp1B1* apareció en la porción anterior del primordio ótico (Figura 2a), coincidiendo con la cresta anterior *Fgf10* positiva (ca; entre puntas de flecha en la Figura 2a, b) y exhibiendo varios dominios de expresión *Cyp1B1*; más fuerte en el tercio más medial, débil en el tercio más lateral, y muy débil o no detectada entre ambas áreas (ca en la Figura 2a). También se observó otra pequeña área de expresión de *Cyp1B1* en la pared más caudal del oído interno de los estadios HH24/25, coincidiendo con la cresta posterior (Figura 2a), *Fgf10* positiva (cp; entre puntas de flecha en la Figura 2b) y exhibiendo también varios dominios pequeños de expresión de *Cyp1B1*, pero en este caso con un patrón de expresión invertido con respecto a la cresta anterior: expresión más fuerte en la porción más lateral, débil en la porción más medial y muy débil o no detectada entre ambas áreas (cp en la Figura 2a). Por lo tanto, la cresta posterior fue *Cyp1B1* positiva en el estadio HH24/25 pero no en el estadio HH20 (comparar la Figura 2a, b con la Figura 1c, d).

En secciones horizontales más ventrales (Figura 2c, d), la mácula del utrículo, marcada con la sonda *Fgf10*, mostró una expresión débil de *Cyp1B1* (mu en la Figura 2c, c'). Sorprendentemente, se detectó una fuerte expresión de *Cyp1B1* en una banda estrecha en el borde lateral de la mácula del utrículo (punta de flecha en la Figura 2c), claramente separada de la cresta lateral adyacente (cl en la Figura 2c). La cresta lateral en desarrollo, que se genera justo al lado de la mácula del utrículo y muestra una expresión incipiente de *Fgf10* en esta etapa de desarrollo (cl en la Figura 2d; Sánchez-Guardado et al., 2013), estaba desprovista de expresión de *Cyp1B1* (cl en la Figura 2c). A este nivel, la mácula del sáculo estaba débilmente marcada con *Cyp1B1* (Figura 2c, c') pero no la mácula neglecta (mn en la Figura 2d). La sección horizontal a través del conducto coclear en desarrollo (cc; Figura 2e, f) mostró que la papila basilar exhibía una expresión clara de *Cyp1B1* (pb; entre puntas de flecha en la Figura 2e, f). El resto de la pared coclear estaba desprovista de expresión *Cyp1B1* (Figura 2e). Fuera del epitelio ótico, se observaron transcriptos de *Cyp1B1* en el mesénquima entre el epitelio ótico y el cerebro posterior (R; asteriscos blancos en la Figura 2a, c) a nivel del aparato vestibular. En cuanto al sistema auditivo, el mesénquima rostral al conducto coclear en desarrollo mostró una fuerte expresión de *Cyp1B1* (cc; asterisco blanco rostral en Figura 2e). Sin embargo, otras áreas del mesénquima cerca de la pared del conducto coclear

mostraron una expresión débil de *Cyp1B1* (asterisco blanco caudal en la Figura 2e). Es interesante notar que otras áreas del mesénquima periótico estaban completamente desprovistas de RNAm de *Cyp1B1*, en particular en la porción lateral del primordio ótico (asteriscos púrpuras en la Figura 2a, c, e), tal como ocurría en la etapa anteriormente estudiada.

Las secciones transversales a través de un oído interno algo más desarrollado (estadio HH25) muestran una diferenciación más clara de los elementos sensoriales (Figura 2g-l). Estas secciones confirmaron los resultados descritos anteriormente en secciones horizontales concernientes a la presencia de la expresión de *Cyp1B1* en las crestas anterior y posterior *Fgf10* positivas (ca y cp; entre puntas de flecha en la Figura 2g, h y Figura 2k, l, respectivamente). A nivel vestibular, se pudo apreciar que el marcaje de *Cyp1B1* era fuerte en la cresta lateral (cl; Figura 2i) y más débil en la mácula del utrículo (mu; Figura 2i) y en la mácula del sáculo (ms en la Figura 2i). Además, se observaron transcriptos de *Cyp1B1* en el conducto coclear (cc; Figura 2i, j), incluyendo la papila basilar (pb; Figura 2i, j). En las secciones más caudales (Figura 2k, l), la mácula neglecta, *Fgf10* negativa, fue también *Cyp1B1* negativa (mn en la Figura 2k, l).

Fuera del epitelio ótico, el mesénquima que rodea la mitad ventral del oído interno del estadio HH24/25 fue claramente marcado por diferentes intensidades de expresión del gen *Cyp1B1*, principalmente en los aspectos medial y ventrolateral del oído interno del estadio HH25 (asteriscos blancos en la Figura 2g, i, k). Otras áreas del mesénquima periótico no expresaron este gen (asteriscos púrpuras en la Figura 2g, I, k). El ganglio acústico-vestibular estaba casi completamente desprovisto de expresión *Cyp1B1*, excepto en una pequeña parte de su porción ventral (flecha corta en la Figura 2g), que no coincidía con el área de expresión ganglionar del gen *Fgf10* (flecha corta en la Figura 2h). Las figuras 3m y n resumen el patrón de expresión *Cyp1B1* en el epitelio ótico en los estadios HH24/25.

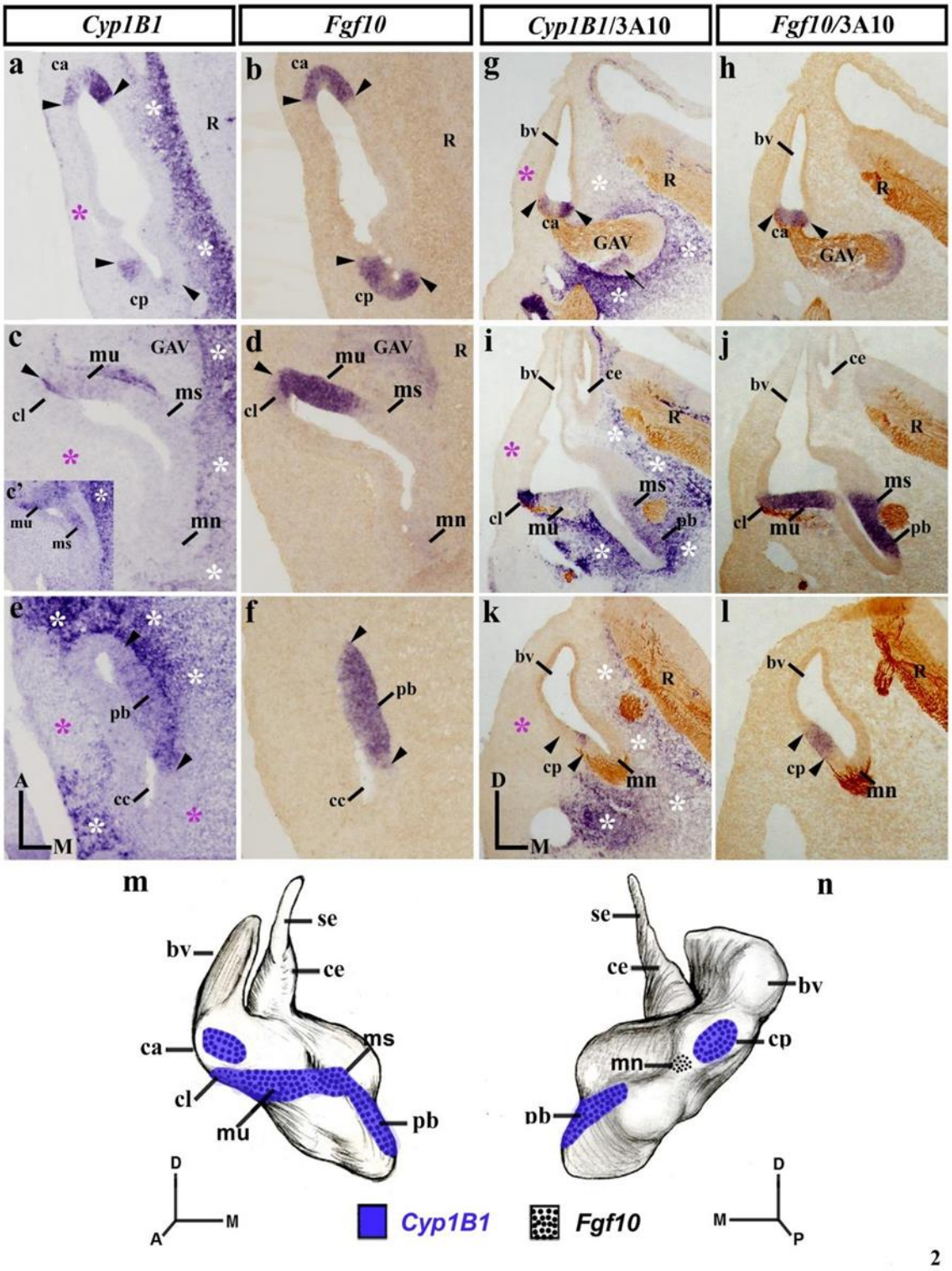


Figura. 2. Patrón de expresión *Cyp1B1* en el estadio HH24/25. (**a**-**f**) Secciones horizontales tratadas con las sondas marcadas en cada columna. Se detectó expresión de *Cyp1B1* en las crestas anterior y posterior (entre puntas de flecha en **a**, **b**, **g**, **h**, **k**, **l**). Las máculas del utrículo y del sáculo, así como la papila basilar, fueron *Cyp1B1* positivas (mu y ms en **c**, **c'**; pb en **e**), siendo la mácula neglecta *Cyp1B1* negativa (mn en **c**, **k**). En el estadio HH24/25, la cresta lateral era *Cyp1B1* negativa (cl en **c**, **d). Patrón de expresión Cyp1B1**

en el estadio HH25. (**g**-**l**) Secciones horizontales. La inervación fue identificada por la inmunorreacción con 3A10. En el estadio HH25, la cresta lateral era *Cyp1B1* positiva (cl en **i**, **j**). Los asteriscos blanco y púrpura en **a**, **c**, **e**, **g**, **i** y **k** indican las áreas del mesénquima que expresan o no, respectivamente, el gen *Cyp1B1*. En el GAV, las expresiones de *Cyp1B1* y *Fgf10* no fueron coincidentes (flechas cortas en **g**, **h**). (**m**, **n**) Diagramas 3D de los patrones de expresión *Cyp1B1* y *Fgf10*, tanto en la vista anterior (**m**) como en la posterior (**n**) del oído interno HH24/25. Las áreas punteadas muestran el dominio sensorial positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

4.3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO HH27

En el estadio HH27, los cambios morfogenéticos son más evidentes y todos los epitelios sensoriales son fácilmente reconocibles por el patrón de expresión del gen *Fgf10* (Figura 3; Sánchez-Guardado et al., 2013). En secciones horizontales a través de la parte más dorsal del oído interno del estadio HH27 (Figura 3a, b), la expresión de *Cyp1B1* apareció en las crestas anterior y posterior, *Fgf10* positivas (ca y cp; entre puntas de flecha en la Figura 3a, b), exhibiendo el área central de ambos elementos sensoriales un marcaje débil de *Cyp1B1* (Figura 3a, b). En secciones horizontales más ventrales a través de la porción central del vestíbulo (Figura 3c, d), todos los elementos sensoriales, *Fgf10* positivos, mostraron diferentes grados de expresión de *Cyp1B1*: un fuerte marcaje de *Cyp1B1* en la cresta lateral (cl; entre puntas de flecha en la Figura 3c, c', d) y débil en la parte central tanto de la mácula del utrículo como de la mácula del sáculo (mu y ms en la Figura 3c, d). La mácula neglecta apareció desprovista de expresión del gen *Cyp1B1* (no mostrada). Los transcriptos de *Cyp1B1* estaban ausentes en el epitelio de todos los elementos no sensoriales, por ejemplo, en las bolsas horizontal y vertical (bh en la Figura 3a; bv no mostrada) y el conducto endolinfático (ce en la Figura 3a, b). Además, el ganglio acústico-vestibular estaba aparentemente desprovisto de expresión del gen *Cyp1B1* (GAV en la Figura 3c). En el nivel más ventral del oído interno del estadio HH27 (Figura 3e, f), donde se desarrolla el sistema auditivo, la papila basilar *Fgf10* positiva estaba marcada con *Cyp1B1* (pb; entre puntas de flecha en Figura 3e, f). La expresión de *Cyp1B1* observada en la papila basilar se extendió más rostralmente, siempre dentro del dominio expresivo de *Fgf10* (flecha en la Figura 3e, f; Sánchez-Guardado et al., 2013). Al final del conducto coclear (cc; Figura 3g, h), la incipiente mácula lagena, *Fgf10* positiva,

mostró también una expresión evidente, aunque más débil, de *Cyp1B1* (ml en la Figura 3g, h).

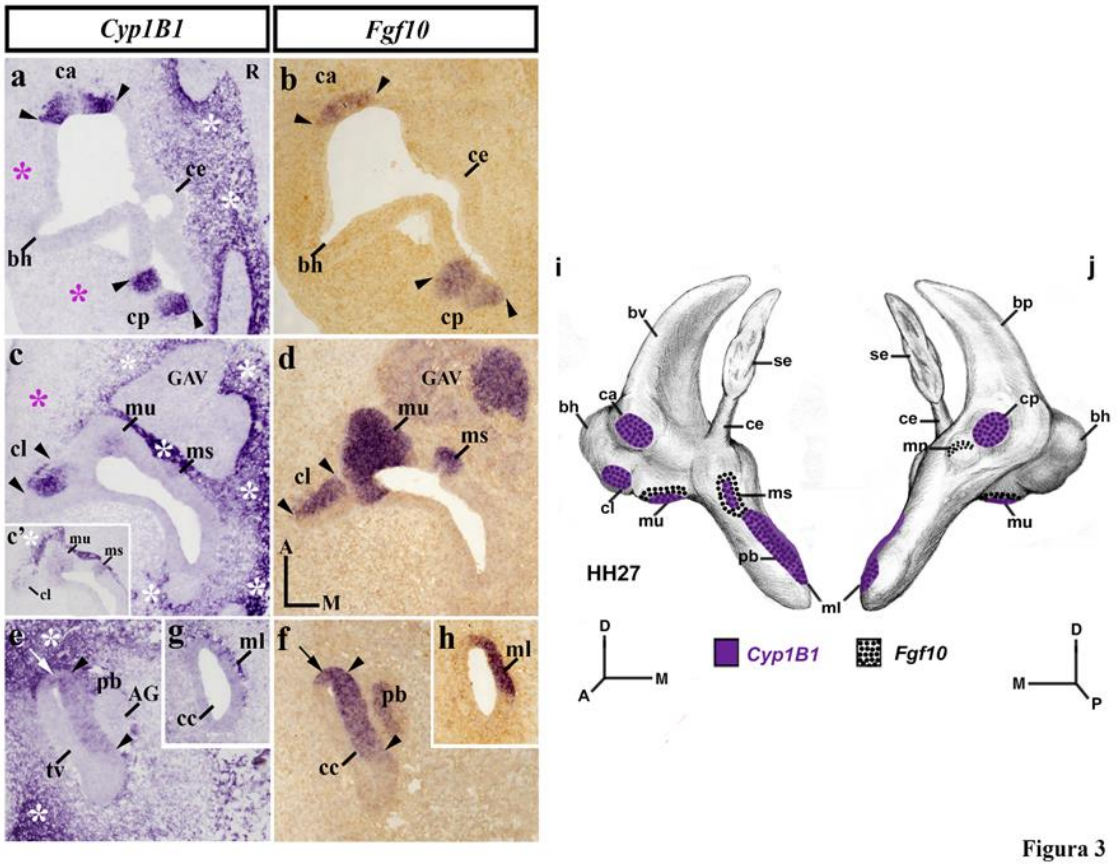


Figura 3. Patrón de expresión *Cyp1B1* en el estadio HH27. Secciones horizontales (**a**-**h**) a través del oído interno, tratadas con *Cyp1B1* (**a**, **c**, **c'**, **e**, **g**). Se utilizó la expresión *Fgf10* para identificar elementos sensoriales en el epitelio ótico en desarrollo (**b**, **d**, **f**, **h**). Se detectó la expresión *Cyp1B1* en todas las crestas (ca, cp y cl; entre puntas de flecha en **a**-**d**). Las máculas del utrículo, del sáculo y lagena mostraron una expresión más débil de *Cyp1B1* (mu y ms en **c**, **c'**; ml en **g**). La papila basilar también fue positiva para *Cyp1B1* (pb; entre puntas de flecha en **e**). En la pared del conducto coclear, su porción más rostral, contigua a la papila basilar (pb), estaba teñida con *Cyp1B1* (flechas en **e**, **f**). El ganglio acústico-vestibular fue *Cyp1B1* negativo (GAV en **c**; ver también GA en **e**). Los asteriscos blancos en **a**, **c**, **c'** y **e** indican la expresión de *Cyp1B1* en el mesénquima cercano, mientras que los asteriscos púrpuras en **a** y **c** etiquetan el mesénquima sin expresión de *Cyp1B1*. (**i**, **j**) Diagramas 3D de los patrones de expresión de *Cyp1B1* y *Fgf10* tanto en la vista anterior (**i**) como en la posterior (**j**) del oído interno en la etapa HH27. Las áreas punteadas muestran el dominio sensorial positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

El ganglio acústico en diferenciación no tenía transcriptos de *Cyp1B1* (AG en la Figura 3e). Fuera del laberinto membranoso en desarrollo, el mesénquima situado entre

el oído interno en desarrollo y el cerebro posterior (R; Figura 3a) estaba fuertemente marcado por la expresión de *Cyp1B1* en la porción dorsal del oído interno (asteriscos blancos en la Figura 3a, c, c'). También es interesante destacar que el ganglio acústico-vestibular estaba completamente rodeado por mesénquima que expresaba fuertemente el gen *Cyp1B1*, así como las máculas del utrículo y del sáculo (asteriscos blancos más rostrales en la Figura 3c, c'). En este nivel, el mesénquima localizado junto a la pared ótica caudal mostró también una expresión muy evidente de *Cyp1B1* (asteriscos más caudales en la Figura 3c). A nivel del aparato vestibular, el mesénquima entre el primordio ótico y el ectodermo cefálico estaba completamente desprovisto de expresión de *Cyp1B1* (asteriscos púrpuras en la Figura 3a, c), incluyendo las áreas que rodean a las crestas en desarrollo (ca y cp en la Figura 3a; cl en la Figura 3c). En la mitad ventral del oído interno, donde se desarrolla el sistema auditivo (Figura 3e, f), el marcaje de *Cyp1B1* apareció también alrededor del epitelio ótico, principalmente en las porciones laterales (asteriscos blancos en la Figura 3e). Las secciones transversales confirman los resultados descritos anteriormente (datos no mostrados). Las figuras 3i y j resume el patrón de expresión *Cyp1B1* en el epitelio ótico en el estadio HH27.

4.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO HH34

A los 8 días de incubación (estadio HH34), todos los elementos sensoriales y no sensoriales del oído interno están claramente definidos (Sánchez-Guardado et al. 2013). En esta etapa de desarrollo (Figura 4), las secciones horizontales no muestran cambios en el patrón de expresión del *Cyp1B1* comparado con los resultados descritos en la etapa HH27 (Figura 3). En una sección horizontal dorsal, la tinción de *Cyp1B1* apareció en las crestas anterior y posterior (ca y cp; entre puntas de flecha en la Figura 4a). La mácula neglecta, localizada al lado de la cresta posterior, fue *Cyp1B1* negativa (mn en la Figura 4a). El resto del epitelio ótico carece completamente de expresión de *Cyp1B1*, incluyendo la pared del conducto endolinfático (ce en la Figura 4a) y la cruz común (ccm en la Figura 4a). Como en etapas anteriores del desarrollo, el mesénquima localizado subyacente al laberinto membranoso mostró una expresión muy evidente de *Cyp1B1* (asteriscos blancos en la Figura 4a). A nivel del utrículo y del sáculo (u y s; Figura 4b),

todos los elementos sensoriales mostraban marcaje de *Cyp1B1* en diferentes grados: la cresta lateral, principalmente en sus bordes (cl; entre puntas de flecha en la Figura 4b); la mácula del utrículo, con una fuerte expresión de *Cyp1B1* (mu en la Figura 4b); y la mácula del sáculo, con una expresión de *Cyp1B1* más débil (ms; Figura 4b). En esta sección, la pared lateral del conducto coclear proximal, cerca de la mácula del sáculo, también se mostró *Cyp1B1* positiva (flecha en la Figura 4b). En cuanto al ganglio vestibular, fue *Cyp1B1* negativo (GV en la Figura 4b;). Un resultado notable fue la fuerte expresión del gen *Cyp1B1* en el mesénquima en contacto e incluso desde una distancia del epitelio ótico (asteriscos en la Figura 4b, b'). En secciones horizontales a través del conducto coclear, la papila basilar exhibió un gradiente rostral-caudal decreciente de expresión de *Cyp1B1* (pb; entre puntas de flecha en la Figura 4c). La mácula lagena mostró niveles bajos de transcriptos de *Cyp1B1* (ml en la Figura 4d). Las áreas no sensoriales del conducto coclear, incluyendo el *tegmentum vasculosum* (tv en la Figura 4c), fueron *Cyp1B1* negativas (Figura 4c, d). En cuanto al ganglio acústico, esta estructura neuronal también estaba desprovista de expresión de *Cyp1B1* (GA en la Figura 4c). El mesénquima marcado con *Cyp1B1* apareció rodeando prácticamente toda la pared del conducto coclear (Figura 4c, d), siendo este mesénquima expresivo del *Cyp1B1* menos relevante en su porción del conducto coclear. Las figuras 4e y f resumen el patrón de expresión del *Cyp1B1* en el laberinto membranoso en el estadio HH34.

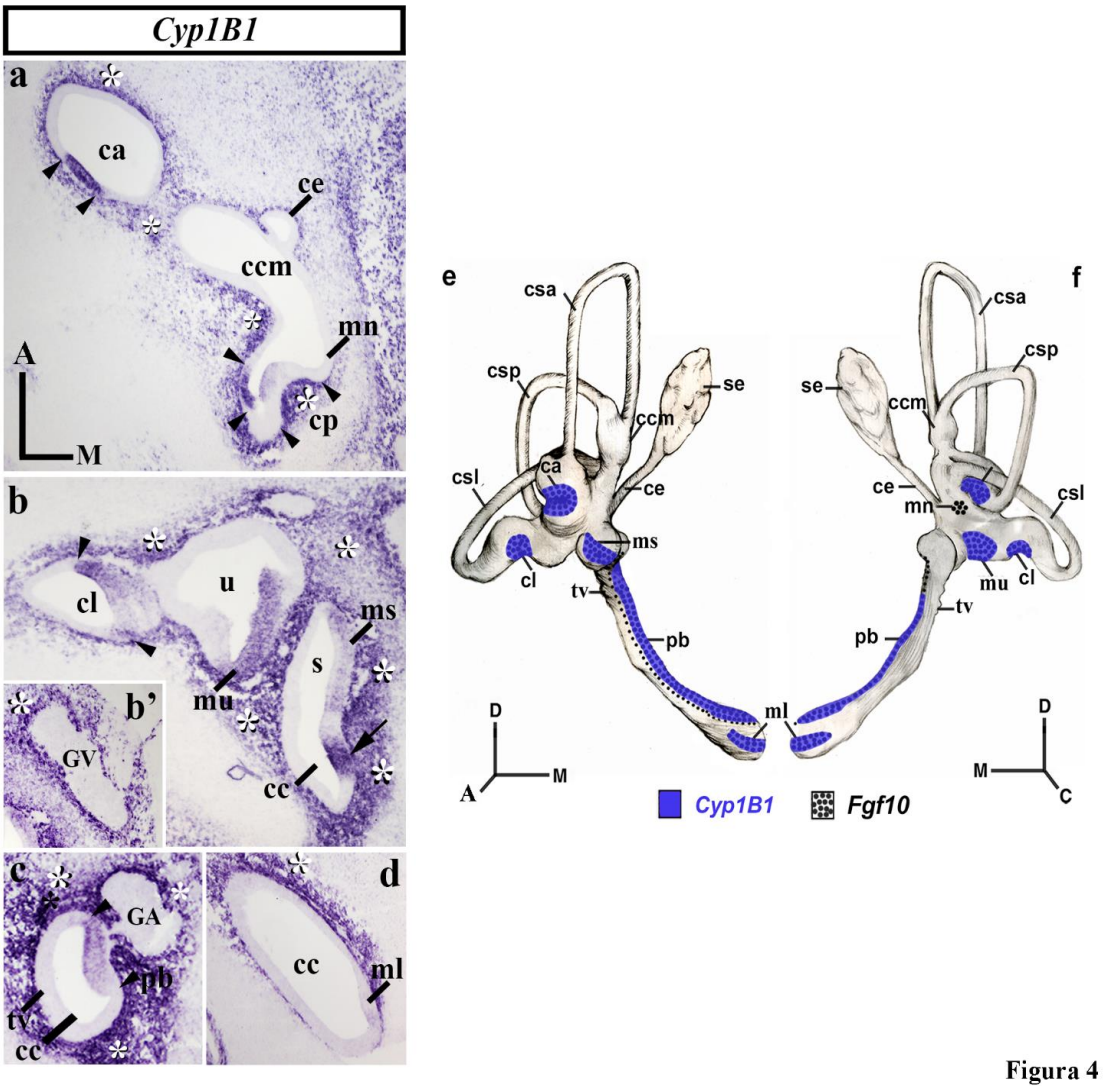


Figura 4

Figura 4. Patrón de expresión Cyp1B1 en el estadio HH34. Secciones horizontales tratadas con las sondas *Cyp1B1*. Se detectó la expresión *Cyp1B1* en todas las crestas (ca, cp, y cl; entre puntas de flecha en **a**, **b**). Las máculas del utrículo y del sáculo mostraron expresión de *Cyp1B1* (mu y ms en **b**), así como la mácula de la lagena (ml en **d**), esta última mostrando menor expresión de *Cyp1B1*. La mácula neglecta fue *Cyp1B1* negativa (mn en **a**). La papila basilar mostró un gradiente rostrocaudal decreciente de expresión *Cyp1B1* (pb; entre puntas de flecha en **c**). Todos los elementos no sensoriales estaban desprovistos de transcriptos de *Cyp1B1* (como ejemplos, ver ce y ccm en **a**; tv en **c**), excepto una pequeña área del conducto coclear proximal (cc; flecha en **b**). Los ganglios vestibular y acústico fueron *Cyp1B1* negativos (GV en **b'**; GA en **c**). Los asteriscos blancos en **a**-**d** indican el mesénquima que expresa el gen *Cyp1B1*. (**e**, **f**) Diagramas en 3D de los patrones de expresión de *Cyp1B1* y *Fgf10* tanto en la vista anterior (**e**) como en la posterior (**f**) del oído interno HH34. Las áreas punteadas muestran el dominio sensorial positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior; R rostral.

CAPÍTULO 2:

CRABP-1 EN EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE AVES

5. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CRABP-1

5.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CRABP-1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA (HH18-20)

En el estadio vesícula ótica (HH18-20), el dominio expresivo de *Fgf10*, que se encuentra en la porción ventromedial del epitelio ótico, corresponde a un dominio pro-sensorial del que surgirán casi todos los elementos sensoriales (Figura 1b; Sánchez-Guardado et al. 2013). Por esta razón, el patrón de expresión del gen *CRABP-1* se estudia en sección transversal (Figura 1a) y secciones horizontales (Figura 1c, d) a través de la vesícula ótica (vo).

En secciones transversales a través de la vesícula óptica (HH18-20), se observaron altos niveles de expresión de *CRABP-1* en su pared dorsomedial (flecha negra grande en la Figura 1a), frente al rombencéfalo (R; Figura 1a) e incluyendo el área presuntiva del incipiente aparato endolinfático (ce; Figura 1a). En el epitelio ótico dorsolateral, una pequeña área estaba completamente desprovista de transcriptos del gen *CRABP-1* (asterisco en la Figura 1a), asociadas en parte al dominio presuntivo de la bolsa vertical (bv en la Figura 1a) a partir de la cual se desarrollarán los canales semicirculares anteriores y posteriores. En la parte ventral del primordio ótico, también se detectó expresión evidente de *CRABP-1*en su pared lateral (pequeña flecha negra en la Figura 1a). En algunas secciones rostrales transversales, una porción del área pro-sensorial ventromedial, *Fgf10*-positiva, (entre las puntas de flecha en la Figura 1a, b) estaba desprovista de expresión del gen *CRABP-1* (flecha púrpura en la Figura 1a; ver también sección horizontal, flecha púrpura en la Figura 1c).

En las secciones horizontales más dorsales (Figura 1c), se observó una fuerte expresión de *CRABP-1* principalmente en la pared medial de la vesícula (flecha grande en la Figura 1c), cerca del rombencéfalo en desarrollo (R; Figura 1c). Expresiones más débiles de *CRABP-1*, aunque todavía muy evidentes, se observaron en los polos anterior y posterior del primordio ótico, incluyendo los dominios presuntivos de las crestas

anterior y posterior (ac y pc; entre puntas de flecha en la Figura 1c). Una pequeña porción de la pared lateral de la vesícula ótica estaba completamente desprovista de expresión de *CRABP-1* (asterisco en la Figura 1c; ver también asterisco en la Figura 1a).

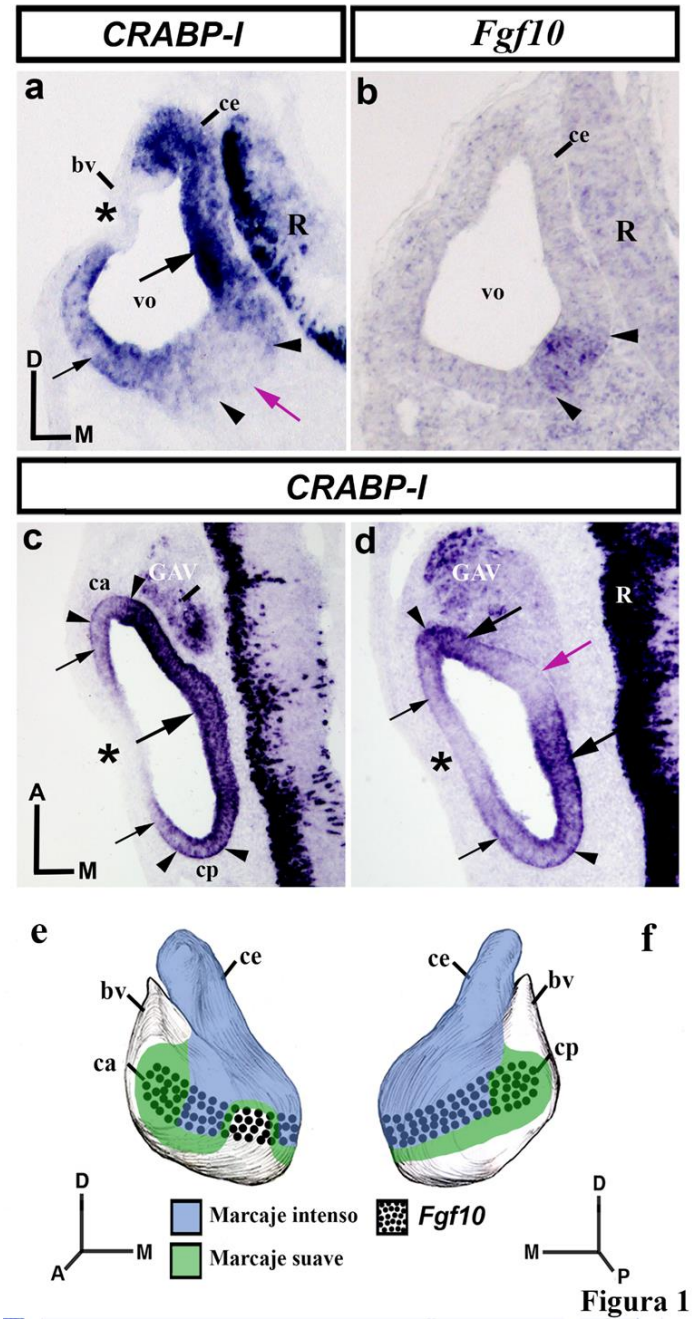


Figura 1. Patrón de expresión *Crabp-1* en el estadio vesícula ótica, HH18-20. Secciones transversales (**a**, **b**) y horizontales (**c**, **d**) tratadas con las sondas *CRABP-1* y *FgF10*. Los patrones son heterogéneos, con niveles más altos en toda la porción dorsomedial (flecha negra grande en **a**,**c**) frente al rombencéfalo (R; **a**), e incluyendo el aparato endolinfático en desarrolloo (ce; **a**). Se observaron niveles más débiles de expresión de *CRABP-1* en parte de la pared lateral de la vesícula ótica (pequeñas flechas negras en **a**, **c**,

d), incluyendo las crestas anterior y posterior (ac y pc; entre puntas de flecha en **c**). Se observó una zona desprovista de expresión en la pared dorsolateral y lateral (asteriscos en **a**, **c**, **d**). En la zona ventromedial del otocisto, hay un área sin expresión de *CRABP-1* (flechas púrpuras en **a**, **c**). El dominio pro-sensorial positivo para *Fgf10* (entre las puntas de flecha en **a**-**d**) mostró diferentes niveles de expresión de *CRABP-1* (ac y pc en **c**; grandes flechas negras en **d**) o no-expresión (flechas púrpuras en **a**, **d**). El GAV muestra células positivas para *CRABP-1* (**c**, **d**). (**e, f**) Diagramas en 3D de los patrones de expresión *CRABP-1* y *Fgf10*, mostrando la vista anterior (**e**) y posterior (**f)** de la vesícula ótica. Las áreas punteadas representan el dominio positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

En secciones horizontales más ventrales del mismo embrión de pollo (Figura 1d), el epitelio ótico mostró expresión heterogénea de *CRABP-1*. Se detectaron claramente los dominios con mayor expresión de *CRABP-1* (flechas negras grandes en la Figura 1d). También se observaron dos áreas con niveles más débiles, aunque claramente manifiestos, de expresión de *CRABP-1* en la porción lateral del epitelio óptico (pequeñas flechas negras en la Figura 1d). Además, no se detectó expresión de *CRABP-1* en áreas ubicadas en las paredes lateral y medial de la vesícula ótica (asterisco y flecha púrpura, respectivamente, en la Figura 1d). Esa área presente en la pared medial (flecha púrpura en la Figura 1d; ver también flecha púrpura en la Figura 1a) estaba dentro del dominio pro-sensorial (entre puntas de flecha en la Figura 1d), y correspondería al dominio presuntivo de la mácula del sáculo. Las áreas contiguas rostral y caudal teñidas con *CRABP-1* de manera más fuerte (grandes flechas negras en la Figura 1d) corresponderían a la futura mácula del utrículo y a la papila basilar, respectivamente. Además, se observó una fuerte expresión de *CRABP-1* en el ganglio acústico-vestibular en desarrollo (GAV en las figuras 1c, d). Las Figuras 1e y f resumen el patrón de expresión de *CRABP-1* en el epitelio ótico en los estadios HH18-20.

5.2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CRABP-1* EN LOS ESTADIOS HH24/25

En las secciones transversales más rostrales, la expresión *CRABP-1* marcó la pared anterior de la bolsa vertical (bv, pequeñas flechas en la Figura 2a), delimitando la cresta anterior inervada (ac; entre puntas de flecha en la Figura 2a, f) que aparentemente era *CRABP-1* negativa (Figura 2a). El área del epitelio ótico marcada por *CRABP-1* correspondía a una pequeña porción de la bolsa vertical (bv en la Figura 2a).

En las secciones caudales cercanas (Figura 2b, g), se observó expresión de *CRABP-1* en la pared medial (flecha grande en la Figura 2b), incluyendo la mácula del utrículo (mu en la Figura 2b, g). En este nivel, las bolsas vertical y horizontal (bv y bh), así como el dominio presuntivo de la cresta lateral (cl), estaban desprovistas de expresión de *CRABP-1* (Figura 2b, g). En secciones caudales adyacentes, el dominio dorsomedial *CRABP-1*-positivo incluía claramente el conducto endolinfático en desarrollo (ce en la Figura 2c, h). A este nivel, se observó un gradiente dorsoventral decreciente de expresión de *CRABP-1*, limitando dorsalmente el dominio presuntivo de la mácula del sáculo (ms; entre puntas de flecha en la Figura 2c, h) que estaba desprovista de dicha expresión. En la porción caudal del primordio ótico en el estadio HH24/25 (Figuras 2d, e, i, j), el dominio que expresan *CRABP-1* observado en el epitelio ótico medial (flechas pequeñas en la Figura 2d) se extendió más ventralmente en la pared medial del conducto coclear (cc en la Figura 2d). El territorio presuntivo de la papila basilar mostró evidente, aunque más débil, expresión de *CRABP-1* (bp; entre puntas de flecha en la Figura 2d, i). La pared lateral del conducto coclear, donde se desarrollará el *tegmentum vasculosum*, fue claramente *CRABP-1*-negativa (tv en la Figura 2d). En las secciones transversales más caudales a nivel de la cresta posterior (pc; entre puntas de flecha en la Figura 2e, j), un área fuertemente *CRABP-1*-positiva bordeaba este parche sensorial *CRABP-1*-negativo (pequeñas flechas en la Figura 2e).

En secciones horizontales dorsales (Figura 2k, n), se observó claramente expresión heterogénea de *CRABP-1* en la pared medial del primordio ótico del estadio HH24/25 (flechas en la Figura 2k). A este nivel, la pared medial mostró una expresión *CRABP-1* más débil en la inserción del aparato endolinfático (flecha pequeña en la Figura 2k), delimitada por áreas de fuerte expresión de *CRABP-1* (flechas grandes en la Figura 2k). Tanto la cresta anterior como la posterior (ca y cp; entre puntas de flecha en la Figura 2k, n) mostraron expresiones de *CRABP-1* indetectables o muy débiles (ca y cp en las Figuras 2k, k'). Aunque es necesario aclarar que algunos embriones mostraron una expresión muy débil de *CRABP-1* en ambas crestas, lo que indica que, en el estadio HH24/25, se está produciendo una pérdida gradual de su expresión con respecto al estadio HH18/20 (Figura 1c). En la parte central del vestíbulo (Figura 2l, o), el dominio presuntivo de la mácula utrículo en desarrollo se incluyó claramente en el dominio

CRABP-1-positivo (mu; Figura 2l, o), con niveles de expresión fuertes (laterales; flecha grande en Figura 2l) y débiles (mediales) (Figura 2l). La cresta lateral estaba claramente desprovista de tinción de *CRABP-1* (cl; Figura 2l). Se observa un borde agudo de la expresión de *CRABP-1* entre la cresta lateral y la mácula del utrículo. En la zona caudal de esta sección, el área de expresión de *CRABP-1* detectada en la pared medial (flecha pequeña en la Figura 2l) se extendió caudalmente hacia la incipiente mácula neglecta (mn en la Figura 2g). Hay que considerar una expresión de *CRABP-1* muy débil en este elemento sensorial caudal (mn; Figura 2l). La mácula del sáculo no fue marcada con sondas de *CRABP-1* (ms; Figura 2l, o). En secciones horizontales más ventrales a través del conducto coclear en desarrollo (cc en la Figura 2m, p), su pared mostró un patrón de expresión de *CRABP-1* heterogéneo (Figura 2m). La papila basilar, localizada en la pared medial del conducto coclear (pb; entre puntas de flecha en la Figura 2m, p), mostró diferentes niveles de expresión de *CRABP-1*. La pared lateral del conducto coclear, incluyendo el área presuntiva del *tegmentum vasculosum* en desarrollo (tv en la Figura 2m), fue claramente *CRABP-1*-negativa (Figura 2m). Al igual que en la etapa anterior (HH18/20; Figura 1), también se observó expresión de *CRABP-1* en el ganglio acústico-vestibular en esta etapa HH24/25 (GAV en las figuras 2k, l; ver también Figura 2b). Además, algunas regiones del mesénquima circundante mostraron una evidente expresión *CRABP-1* (asteriscos blancos en las figuras 2k, l; véase también la Figura 2a). Las Figuras 2q y r resumen el patrón de expresión de *CRABP-1* en el epitelio óptico en los estadios HH24/25.

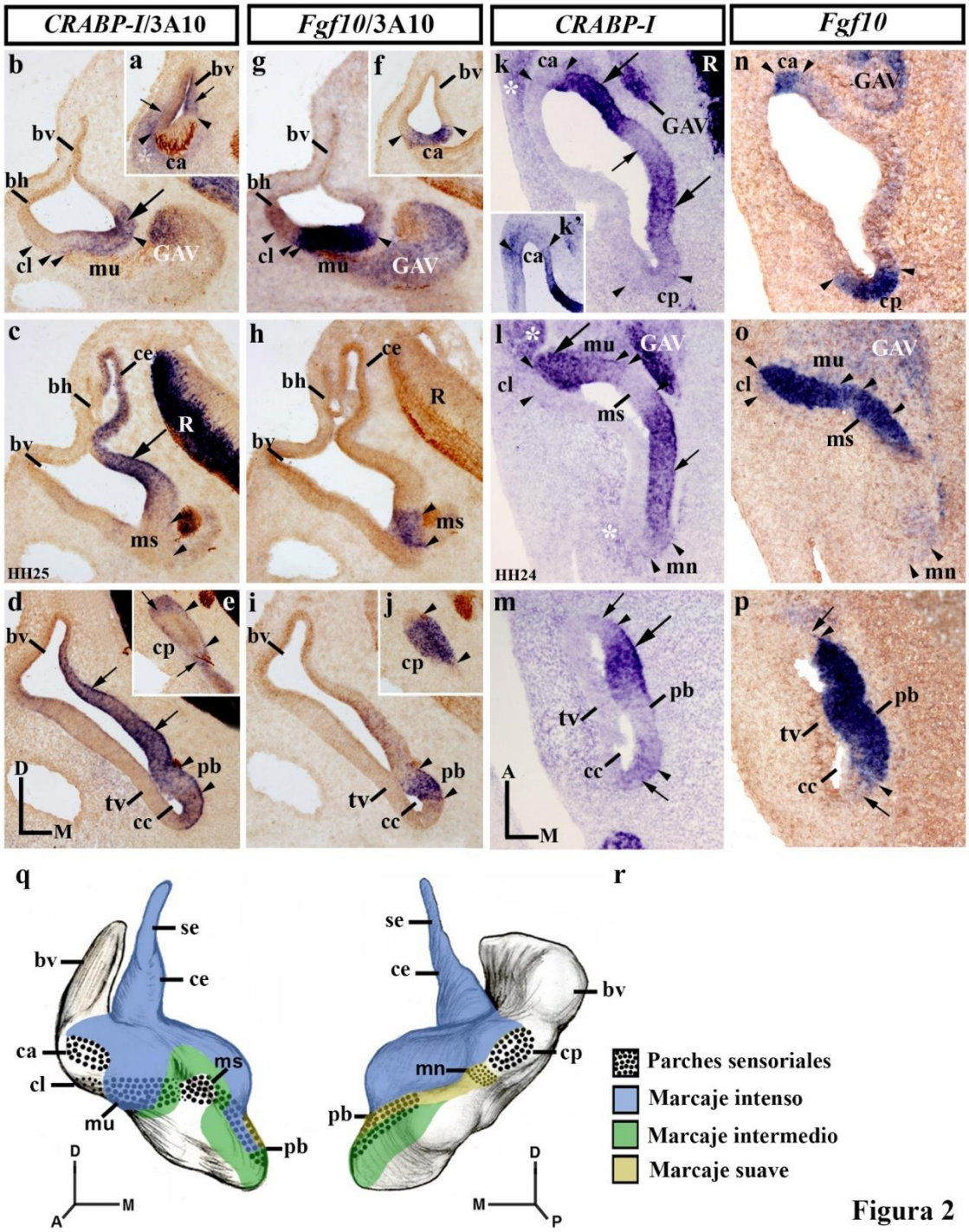


Figura 2. Patrón de expresión *CRABP-1* en el estadio HH24/25. Secciones transversales (**a-j**) y horizontales (**k-p**) a través del primordio del oído interno y tratadas con la sonda marcada en cada columna. Los elementos sensoriales fueron detectados por las sondas *Fgf10* (**g-j**, **n-p**). La inervación ótica se identifica por la inmunorreacción con 3A10 en algunas secciones (**a-j**, **n-p**). Las áreas presuntivas de los elementos sensoriales en desarrollo se indican entre las puntas de flecha en todas las imágenes. En general, la expresión *CRABP-1* se detectó en la pared medial del primordio ótico en el estadio HH24/25 (flechas grandes y pequeñas en **b-d**, **k-m**). El conducto endolinfático en desarrollo se incluyó claramente en el dominio de marcaje por *CRABP-1* (ce en **c**). La expresión de *CRABP-1* marcaba una porción muy

pequeña de la bolsa vertical (bv) en las porciones anterior y posterior del primordio ótico (pequeñas flechas en **a**, **e**), delimitando las crestas anterior y posterior, que eran *CRABP-1*-negativas (ca y cp en **a**, **e**, **k**, **k'**). La cresta lateral y la mácula del sáculo también estaban desprovistas de expresión de *CRABP-1* (cl y ms; **b**, **c**, **l**). El dominio que expresaba *CRABP-1* incluía la mácula del utrículo (mu; **b**, **l**). La mácula neglecta mostró muy baja expresión de *CRABP-1* (mn; **l**). En el conducto coclear (cc), la expresión de *CRABP-1* fue heterogénea (flechas en **d**, **m**), también en la papila basilar (pb; entre puntas de flecha en **d**, **m**). El dominio presuntivo del *tegmentum vasculosum* estaba desprovisto de expresión de *CRABP-1* (tv en **d**, **m**). El ganglio acústico-vestibular también mostró expresión de *CRABP-1* (GAV en **b**, **k**, **l**). Algunas zonas del mesénquima subyacente mostraron una expresión de *CRABP-1* evidente (asteriscos en **a**, **k**, **l**). (**q**, **r**) Diagramas en 3D de los patrones de expresión de *CRABP-1* y *Fgf10*, mostrando la vista anterior (**q**) y posterior (**r**) del estadio HH24/25 del oído interno. Las áreas punteadas representan el dominio positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

5.3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CRABP-1 EN EL ESTADIO HH27

Las secciones transversales a través de la porción más rostral del oído interno en el estadio HH27 (Figura 3a-j) muestran que la cresta anterior exhibe un marcaje con *CRABP-1* muy leve (ca; entre puntas de flecha en la Figura 3a, f), mientras que la pared ótica contigua está ahora desprovista de expresión de *CRABP-1* (bv en la Figura 3a). En el estadio HH27, el aparato endolinfático mostró nuevamente un marcaje fuerte con *CRABP-1* (se y ce en la Figura 3b, c), excepto por una pequeña área en la porción dorsomedial del saco endolinfático (Figura 3b). La pared del vestíbulo donde se inserta el aparato endolinfático mostró una clara expresión *CRABP-1* (flechas grandes en las figuras 3b, c). Al mismo nivel (Figura 3b, g), la mácula del utrículo mostró una expresión manifiesta de *CRABP-1* (mu en la Figura 3b, g), mientras que la cresta lateral y la mácula del sáculo estaban completamente desprovistos de tal expresión (cl y ms en la Figura 3b, g). En el conducto coclear (Figura 3c, h, d, i), el epitelio teñido con expresión de *CRABP-1* se asoció con la papila basilar (pb, entre puntas de flecha en la Figura 3c, h), con un área pequeña de expresión de *CRABP-1* más fuerte (flecha pequeña en la Figura 3c). En las secciones transversales más caudales (Figura 3d, e, i, j), el epitelio marcado con *CRABP-1* sólo pudo detectarse débilmente en un área pequeña de la pared medial del oído interno en desarrollo (flecha grande en la Figura 3d). En estas secciones caudales (Figura 3d, i), la mácula de la lagena, que se desarrolla al final del conducto coclear, estaba desprovista de expresión de *CRABP-1* (ml en la Figura 3d, i). La expresión de *CRABP-1* fue muy débil en la cresta posterior (cp, entre puntas de flecha en la Figura

3e, j), siendo la mácula neglecta *CRABP-1*-negativa (no mostrada). Además, el mesénquima subyacente en la parte del laberinto membranoso presentó diferentes niveles de tinción por expresión de *CRABP-1* (asteriscos en las figuras 3a-e).

Las secciones horizontales a través del oído interno HH27 (Figuras 3k-r) confirmaron los resultados anteriores. En la parte dorsal, también se detectó el débil marcaje con *CRABP-1* observado en la cresta anterior (ca; entre puntas de flecha en la Figura 3k, o) y su ausencia en el epitelio adyacente (Figura 3k; ver también Figura 3a para una sección transversal). Se podría considerar que la expresión de *CRABP-1* es mucho más débil en la cresta posterior (cp; entre puntas de flecha en la Figura 3k, o). En estas secciones (Figura 3k, o), se observó la expresión de *CRABP-1* en el conducto endolinfático (ce; Figura 3k; ver también ce en Figura 3c) así como en el área de la pared ótica donde el aparato endolinfático se inserta en la pared del vestíbulo (flecha grande en Figura 3k; ver también flechas grandes en Figura 3b-d). En secciones a través de la parte central del vestíbulo (Figura 3l, p), la mácula del utrículo mostró tinción con *CRABP-1* (mu en la Figura 3l; ver también Figura 3b). En las mismas secciones, la macula del sáculo *CRABP-I* negativa estaba bordeada caudalmente por un territorio *CRABP-1* positivo (flecha grande en la Figura 3l). La mácula neglecta, localizada en la porción más caudal del epitelio óptico, estaba desprovista de expresión *CRABP-1* (no mostrada). El dominio mediocaudal marcado con *CRABP-1* en la pared ótica se extendió ventralmente por el conducto coclear (cc en la Figura 3m, q), marcando una banda dorsoventralmente alineada en su pared medial (flechas en la Figura 3m), con dos niveles diferentes de expresión de *CRABP-1* (comparar las flechas grandes y pequeñas en la Figura 3m). Nótese que la papila basilar (pb en la Figura 3m, q) mostró una fuerte expresión de *CRABP-1* en su parte rostral (flecha grande en la Figura 3m) pero una expresión más débil en su parte caudal (flecha pequeña en la Figura 3m). La mácula de la lagena en desarrollo fue indudablemente *CRABP-1*-negativa (ml; entre puntas de flecha en la Figura 3n, r; ver también ml en la Figura 3d, i para secciones transversales). En esta etapa de desarrollo, y a diferencia de la etapa previamente descrita (HH24/25), el ganglio acústico-vestibular estaba casi completamente desprovisto de expresión de *CRABP-1* (GAV en las figuras 3b-d, l, m), excepto por una dispersión de células *CRABP-1* positivas en algunas secciones (flecha pequeña en la figura 3l). Algunas partes del mesénquima

subyacente al laberinto membranoso también fueron etiquetadas con la expresión *CRABP-1* (asterisco en la Figura 3k,m). Las figuras 3s y t resumen el patrón de expresión de *CRABP-I* en el epitelio ótico en el estadio HH27.

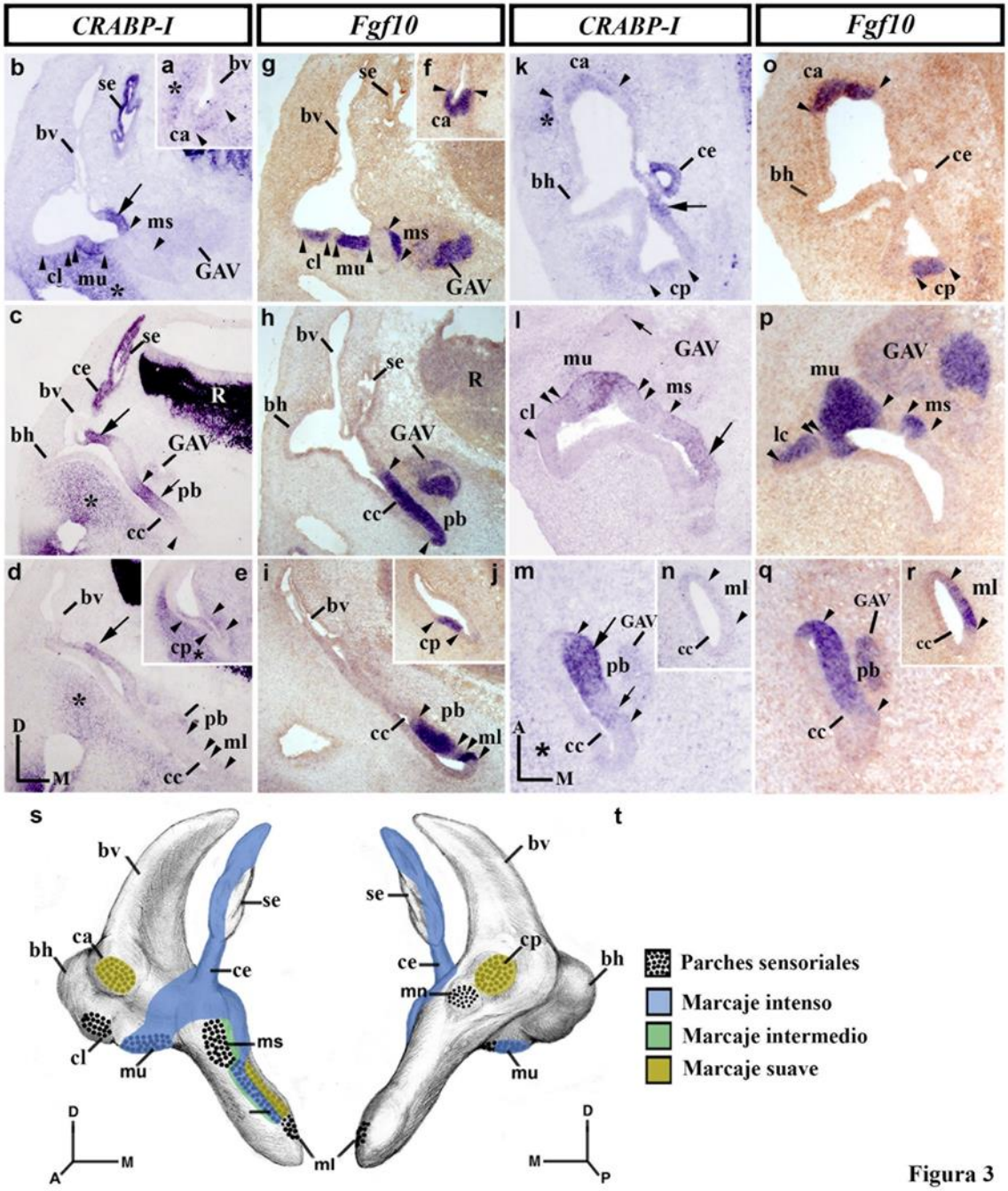


Figura 3. Patrón de expresión *CRABP-1* en el estadio HH27. Secciones transversales (**a-j**) y horizontales (**k-r**) a través del primordio del oído interno tratado con las sondas indicadas. Las áreas presuntivas de los parches sensoriales en desarrollo se indican entre las puntas de flecha en todas las imágenes. En esta etapa, las crestas anterior y posterior presentaron un marcaje *CRABP-1* muy débil (ca y cp en **a**, **e**, **k**), mientras que la cresta lateral fue *CRABP-1* negativa (cl en **b**, **l**). La mácula del utrículo muestra expresión

de *CRABP-1* (mu en **b**, **l**). Las maculas del sáculo y macula neglecta estaban desprovistas de expresión de *CRABP-1* (ms in **b**, **l**; mn, no mostrado). La pared del aparato endolinfático (se y ce en **b**, **c**, **k**) y una parte de la pared vestibular en la que se inserta (flecha grande en **b-d**, **k**) fueron *CRABP-1*-positivas. En el conducto coclear en desarrollo (cc en **c**, **d**, **h**, **i**, **m**, **n**, **q**, **r**), se detectó la expresión de *CRABP-1* en su pared medial (flechas pequeñas en **c**, **m**; flecha grande en **m**), incluyendo la papila basilar en desarrollo (pb en **c**, **m**). La mácula de la lagena fue *CRABP-1* negativa (ml en **d**, **n**). En esta etapa, algunas células del ganglio acústico-vestibular fueron *CRABP-1* positivas (GAV; flecha pequeña en **l**). Algunas regiones del mesénquima subyacente al epitelio ótico estaban marcadas por *CRABP-1* (asteriscos en **a-e**, **k**, **m**). (**s**, **t**) Diagramas en 3D de los patrones de expresión *CRABP-1* y *Fgf10*, mostrando la vista anterior (**s**) y posterior (**t**) del estadio HH27 del oído interno. Las áreas punteadas representan el dominio positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

5.4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CRABP-1 EN EL ESTADIO HH34

En esta etapa de desarrollo, las secciones horizontales a través de la porción dorsal del oído interno mostraron que las crestas anterior y posterior exhibían una fuerte expresión del gen *CRABP-1* en células ubicadas en sus porciones apicales (ca y cp; entre puntas de flecha en las figuras 4a, a'). En esta etapa, la mácula neglecta, localizada en la proximidad de la cresta posterior, no mostró células *CRABP-1* positivas (mn en la Figura 4a). El aparato endolinfático (ce en la Figura 4a) y una parte de la cruz común (ccm en la Figura 4a) también mostraron células que expresaban *CRABP-1*. En una sección horizontal a través de la parte central del vestíbulo (Figura 4b), la cresta lateral presenta ahora células marcadas con *CRABP-1* (cl; entre puntas de flecha en la Figura 4b), similares a las crestas anterior y posterior (Figura 4a). La mácula del utrículo mostró más células manchadas con *CRABP-1*, en particular en su porción lateral (mu en la Figura 4b). La macula del sáculo mostró sólo unas pocas células marcadas por *CRABP-1* (no mostrada). En las secciones horizontales a través del conducto coclear (cc en las figuras 4c, d), se detectaron células que expresaban el gen *CRABP-1* en la papila basilar (pb en la figura 4c). La mácula de la lagena, localizada al final del conducto coclear, mostró algunas células que expresaban *CRABP-1* en su borde apical (ml; flecha pequeña en la Figura 4d). Esta positividad para *CRABP-1* se observó en la porción apical de los parches sensoriales, lo que correspondería a las células ciliadas. Como en los estadios previamente analizados, el *tegmentum vasculosum* del conducto coclear fue *CRABP-1*-negativo (tv en la Figura 4c). Los ganglios acústicos y vestibulares mostraron células

teñidas por *CRABP-1* (GA, flecha pequeña en la Figura 4c; GV, no mostrado). Es interesante observar que, en esta etapa de desarrollo, el mesénquima que subyace al laberinto membranoso estaba completamente desprovisto de expresión de *CRABP-1*. Sin embargo, hubo algunas células marcadas por *CRABP-1* en áreas del mesénquima lejos del epitelio ótico, bordeando la cápsula ótica (asterisco en la Figura 4a). Las figuras 4e y f resumen el patrón de expresión *CRABP-1* en el epitelio ótico en el estadio HH32.

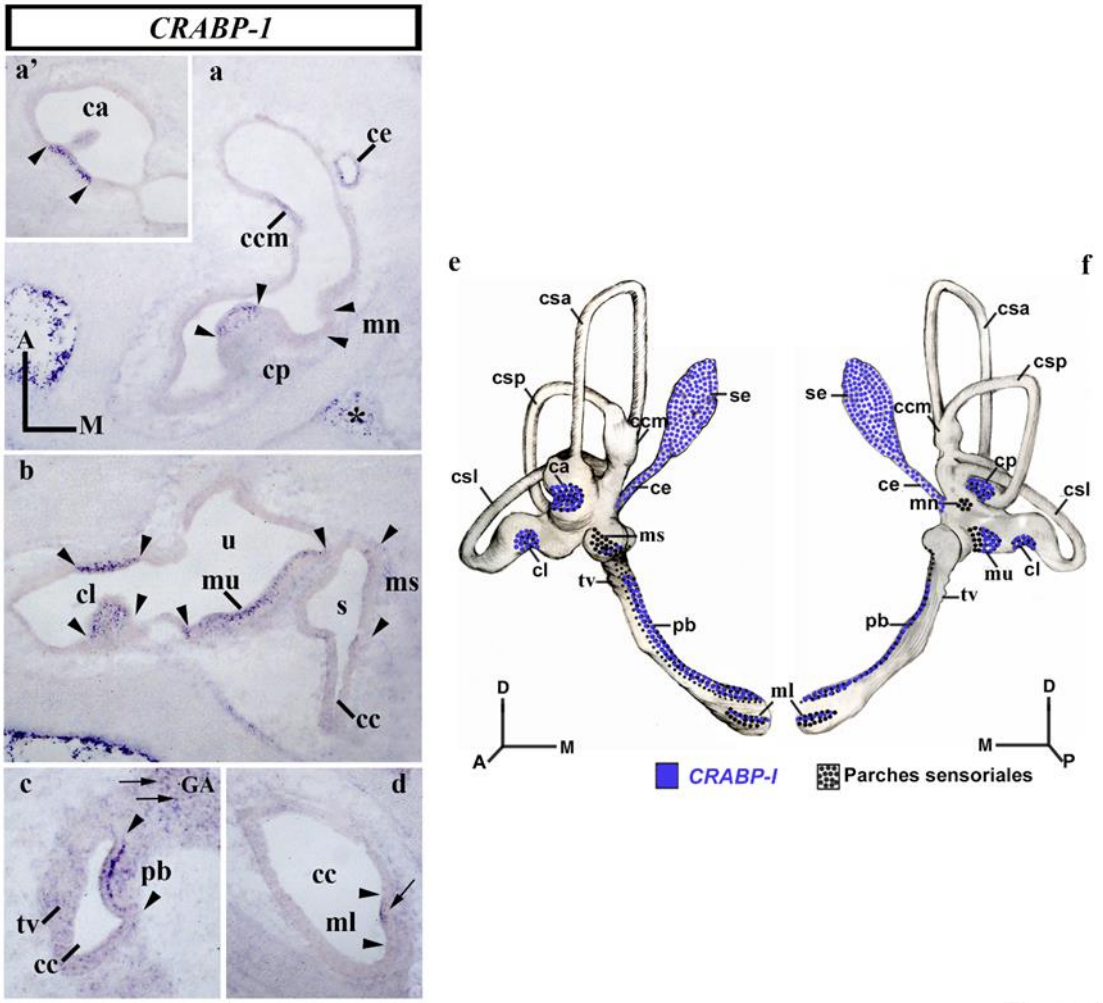


Figura 4

Figura 4. Patrón de expresión *CRABP-1* en el estadio HH34. Secciones horizontales a través del oído interno tratadas con la sonda marcada. Los parches sensoriales están indicados entre las puntas de flecha en todas las imágenes. Todas las crestas mostraban células que expresaban *CRABP-1* (cp, **a**; ca, **a'**; cl, **b**). La mácula del utrículo y la papila basilar también mostraron células marcadas por *Crabp-I* (mu en **b**; pb en **c**). La mácula del sáculo y la mácula de la lagena mostraron unas pocas células que expresaban *CRABP-1* (ms in **b**; ml en **d**), aunque mucho menos evidentes en la primera. La mácula neglecta estaba desprovista de expresión de *CRABP-1* (mn en **a**). El conducto endolinfático y una parte de la cruz común mostraron expresión de *CRABP-1* (ce y ccm en **a**). Los ganglios acústico y vestibular mostraron células *CRABP-1* positivas dispersas (GA, flechas pequeñas en **c**; VG, no mostrado). El mesénquima alejado del epitelio ótico mostró expresión de *CRABP-1* (asteriscos en **a**). (**e**, **f**) Diagramas en 3D de los patrones de expresión *CRABP-1* y *Fgf10*, mostrando la vista anterior (**e**) y posterior (**f**) del estadío HH34 del oído interno. Las áreas punteadas representan el dominio positivo de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS DE LA FAMILIA CYP26 EN EL OÍDO INTERNO DE AVES

6. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *CYP26A1, CYP26B1* Y *CYP26C1*

6.1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1, CYP26B1* Y *CYP26C1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA (HH18-20)

Como se ha explicado en los capítulos anteriores en el estadio de vesícula ótica (HH18), se puede apreciar es un gran dominio pro-sensorial, *Fgf10* positivo, del que surgirán casi todos los elementos sensoriales (Figura 2d, h; Sánchez-Guardado et al., 2013). Por esta razón, los patrones de expresión de los genes *Cyp26A1*, *Cyp26B1*, *Cyp26C1* y *Fgf10* se compararán entre sí en secciones transversales (Figura 1a-d) y horizontales (Figura 1e-h) a través de la vesícula ótica (vo). En la sección transversal, los genes *Cyp26A1* y *Cyp26B1* se expresaron débilmente en la porción ventral de la vesícula ótica (vo; flechas en Figura 1a, b). En contraste, se observó una expresión muy fuerte de *Cyp26C1* en su porción ventral (vo; flecha blanca en Figura 1c), que comprende los dominios de expresión de los otros genes *Cyp26*. La fuerte expresión de *Cyp26C1* también se observó en el mesénquima ventral-medial (asterisco blanco en la Figura 1c) y en la porción ventral del cerebro posterior (R; Figura 1c).

En secciones horizontales (Figura 1e-h), se observaron células dispersas teñidas con *Cyp26A1* en toda la mitad caudal de la vesícula ótica (vo; flechas cortas en la Figura 1e). El marcaje de *Cyp26B1* se observó de manera intensa en la pared media de la vesícula ótica (vo; flecha corta en la Figura 1f), mostrando un gradiente centrífugo decreciente. En cuanto al gen *Cyp26C1*, apareció una expresión clara en la pared caudal-medial del epitelio ótico (flechas blancas en Figura 1g). Se observaron dos niveles diferentes de intensidad de expresión: muy fuerte en la zona más caudal (flecha blanca grande en la Figura 1g) y algo más débil, aunque muy evidente, en la pared medial contigua (flecha blanca corta en la Figura 1g). Fuera del epitelio ótico, la expresión *Cyp26C1* se observó en el mesénquima rostral, alrededor del ganglio acústico-vestibular (GAV; asterisco blanco rostral en la Figura 1g). Se detectó una expresión más fuerte en el mesénquima caudal (asterisco blanco caudal en la Figura 1g). La parte posterior del cerebro cercana al primordio ótico muestra también una expresión evidente de *Cyp26C1* (R; Figura 1g). En esta etapa de desarrollo, la expresión de todos estos genes *Cyp26s*

estaba completamente ausente en el ganglio acústico-vestibular (GAV en la Figura 1e-g).

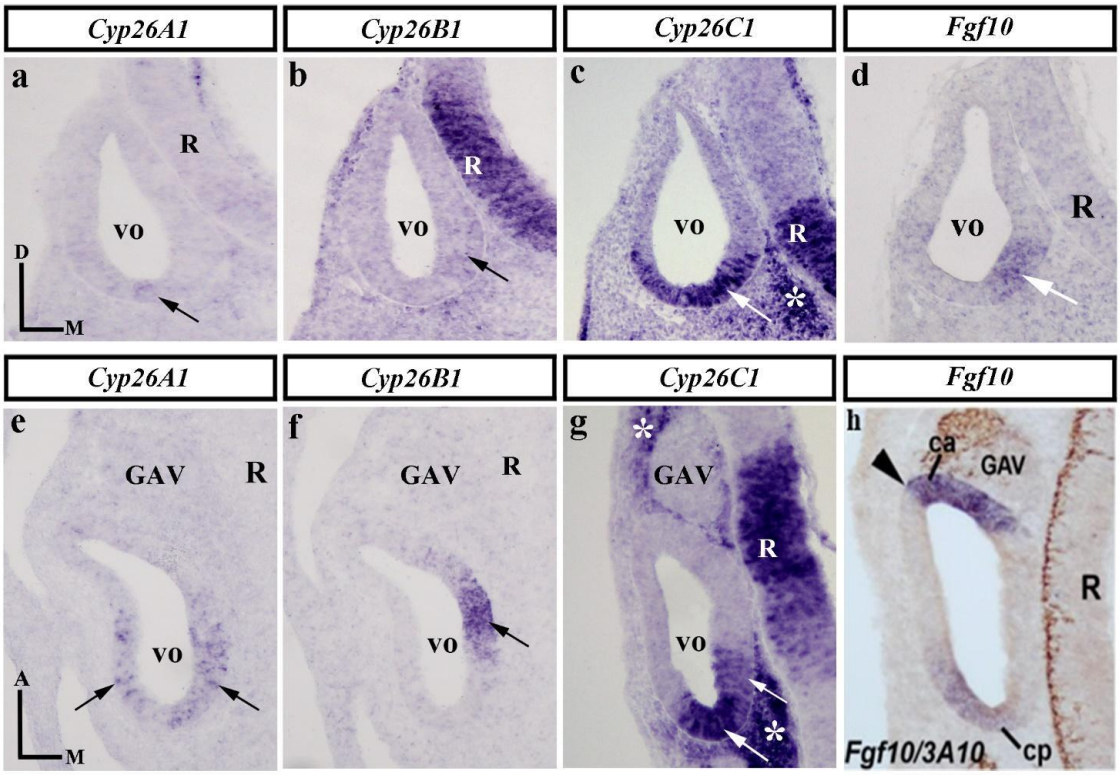


Figura 1

Figura 1. Patrones de expresión *Cyp26A1*, *Cyp26B1* y *Cyp26C1* en el estadio de vesícula ótica, HH18-20. Las secciones transversales (**a**-**d**) y horizontales (**e**-**h**) fueron tratadas con las sondas indicadas en cada columna. La sección horizontal tratada con *Fgf10*, aparece también con inmunohistoquímica con 3A10. La expresión de *Cyp26A1* se observó en células dispersas en la mitad caudal-ventral del otocisto (flechas cortas en **a**, **e**). Se detectó una expresión manifiesta de *Cyp26B1* en la pared media (flechas cortas en **b**, **f**). En cuanto al gen *Cyp26C1*, su expresión marcó con diferente grado de intensidad la parte caudal-ventral de la vesícula ótica (flechas blancas en **c**, **g**). Varias áreas del cerebro posterior en desarrollo frente a la pared ótica también fueron positivas para *Cyp26B1* y *Cyp26C1* (R; **b**, **c**, **f**, **g**). El ganglio acústico-vestibular nunca mostró transcriptos de estos genes (GAV en **e**-**g**). Nótese la expresión de *Cyp26C1* en algunas regiones del mesénquima rodeando el primordio ótico (asteriscos blancos en **c**, **g**). Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial.

6.2. PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1*, *CYP26B1* Y *CYP26C1* EN LOS ESTADIOS HH24/25

Al igual que en los capítulos anteriores, se elige el estadio HH24/25 de desarrollo del oído interno a causa de los cambios morfogenéticos, en particular, por ser un momento del desarrollo embrionario en el que se produce la especificación *de novo* de la cresta lateral en un dominio contiguo a la mácula del utrículo (Sánchez-Guardado et al., 2013). En las secciones horizontales dorsales (Figura 3a-i), el marcaje de *Cyp26A1* se vio suavemente en el aparato endolinfático en desarrollo (ce en la Figura 3a') y en una pequeña área de la pared caudal-medial (flecha corta en la Figura 3a), delimitando la cresta posterior (cp; entre puntas de flecha en Figura 3a). En esta sección, la cresta anterior era *Cyp26A1* negativa (ca; entre puntas de flecha en la Figura 3a). Ventralmente, se observó una expresión débil de *Cyp26A1* en la mitad caudal del epitelio ótico (flechas cortas en la Figura 3d, g), delimitando caudalmente a la mácula del sáculo (ms; punta de flecha en la Figura 3d). Una sección horizontal a través del incipiente conducto coclear mostró que la mencionada expresión débil de *Cyp26A1* localizada en el vestíbulo se extendía ventralmente en la pared del aparato auditivo (flechas cortas en la Figura 3g), incluyendo la papila basilar (pb; entre puntas de flecha en la Figura 3g). Las secciones transversales a través de la parte caudal del oído interno del estadio HH24/25 confirman la presencia de transcriptos de *Cyp26A1* en el sistema endolinfático (ce; entre puntas de flecha en la Figura 3j') y en su inserción en la pared del vestíbulo (punta de flecha en la Figura 3j). La bolsa vertical (bv en la Figura 3j, j'), así como la bolsa horizontal (no mostrada), además de la pared medial de los vestíbulos (asteriscos en la Figura 3j; ver también asterisco en la Figura 3a), eran *Cyp26A1* negativos.

Con respecto al gen *Cyp26B1*, las secciones horizontales mostraron que su expresión se observaba en algunas células dispersas de la cresta anterior (ca; entre puntas de flecha en la Figura 3b, b'). Además, la cresta posterior exhibía células dispersas marcadas con la sonda *Cyp26B1* (cp; entre puntas de flecha en la Figura 3b). Ventralmente, se observó un dominio intensamente teñido con *Cyp26B1* en la pared medial del oído interno de la etapa HH24 (flechas grandes en las Fig3e, h), delimitando caudalmente, en el vestíbulo, a la mácula del sáculo (ms; punta de flecha grande en la Figura 3e). Esta fuerte expresión *Cyp26B1* en la región vestibular se extende en forma rostral-caudal en algunas células dispersas del epitelio ótico. Así, algunas células teñidas

con *Cyp26B1* pudieron ser observadas dentro de la porción caudal de la mácula del sáculo (ms en la Figura 3e) e incluso en la parte caudal del oído interno (flecha corta en la Figura 3e).

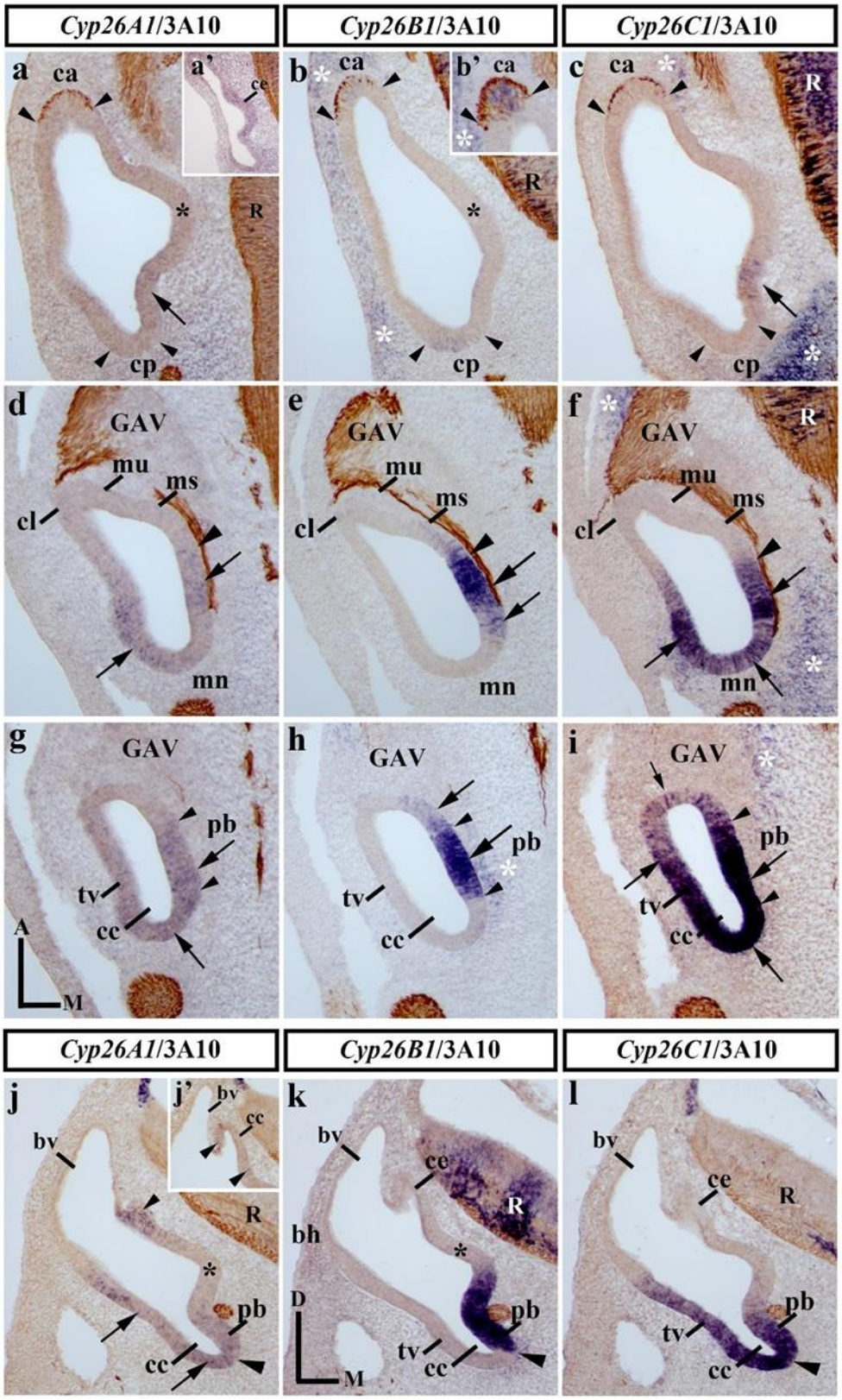


Figura 3

Figura 3. Patrones de expresión *Cyp26A1*, *Cyp26B1* y *Cyp26C1* en el estadio HH24/25. Secciones horizontales (**a**-**i**) y transversales (**j**-**l**) a través del oído interno de estadio HH24/25, tratadas con las sondas indicadas en cada columna. La inervación fue identificada por la inmunorreacción con 3*A*10. *Cyp26A1* fue el único gen *Cyp26* expresado en el sistema endolinfático (ce en **a'**, **j**, **j'**; ver ce en **k** y **l** para los genes *Cyp26A1* y *Cyp26C1*, respectivamente). Aunque *Cyp26A1* mostró una expresión más débil que *Cyp26C1*, ambos genes mostraron un patrón de expresión similar, tiñendo áreas de la parte posterior del primordio ótico (flechas en **a**, **c**, **d**, **f**, **g**, **i**, **j**, **l**). En el vestíbulo, el dominio positivo para *Cyp26A1* y *Cyp26C1* incluía una pequeña área medial adyacente a la cresta posterior (cp, entre puntas de flecha en **a**, **c**) y en la pared caudal del oído interno (flechas en **d**, **f**), caudal a la mácula del sáculo (puntas de flecha en **d**, **f**). Ambas sondas están presentes el conducto coclear (cc en **g**, **i**, **j**, **l**), en toda su pared incluyendo a la papila basilar (pb, entre puntas de flecha en **g**, **i**) y el *tegmentum vasculosum* en desarrollo (tv en **g**, **i**, **j**, **l**). La expresión más alta de *Cyp26C1* se da en la pared más rostral del conducto coclear (flecha corta en **i**). Se detectó una expresión débil de *Cyp26B1* en la cresta anterior y posterior (ac y pc; entre puntas de flecha en **b**). Se detectó una banda dorsal a ventral de expresión heterogénea de *Cyp26B1* en la pared medial del oído interno del estadio HH24/25 (flechas en **e**, **h**), localizadas caudalmente a la mácula del utrículo en la pared del vestíbulo e incluyendo a la papila basilar en la pared del conducto coclear (pb; entre puntas de flechas en **h**; ver también pb en **k**). Las puntas de flecha en **j**, **k** y **l** señalan el borde agudo de la expresión *Cyp6B1* al final del conducto coclear con respecto a las expresiones *Cyp26A1*/*C1*. El ganglio acústico-vestibular estaba completamente desprovisto de expresión para los tres genes *Cyp26s* (GAV en **d**-**i**). Los asteriscos blancos en **b**, **b'**, **c**, **f**, **h**, y **i** señalan la expresión de *Cyp26B1* y *Cyp26C1* en el mesénquima cerca del epitelio ótico y el ganglio acústico-vestibular. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial.

< ----------

En el conducto coclear, el dominio de tinción *Cyp26B1* (flecha grande en la Figura 3h) incluyó a la papila basilar (pb, entre puntas de flecha en la Figura 3h). Se observaron algunas células con transcriptos de *Cyp26B1* en un área rostral a la papila basilar (flecha corta en la Figura 3h). La pared lateral del conducto coclear, en donde se desarrolla el *tegmentum vasculosum*, estaba desprovista de expresión de *Cyp26B1* (tv en la Figura 3h). Estos resultados fueron confirmados en la sección transversal caudal (Figura 3k). Obsérvese el borde definido de la expresión de *Cyp26B1* en el extremo distal del conducto coclear (punta de flecha en la Figura 3k), así como la ausencia de expresión de *Cyp26B1* en el sistema endolinfático (ce en la Figura 3k) y en una parte de la pared vestibular media del oído interno del estadio HH24/25 (asterisco en la Figura 3k; véase también asterisco negro en la Figura 3b).

El estudio de la expresión del gen *Cyp26C1* en secciones horizontales mostró que el gen *Cyp26C1* se transcribe en una gran región en la porción caudal del primordio ótico

(flechas grandes en la Figura 3c, f, i), siendo esta expresión muy heterogénea con diferencias importantes de intensidad dentro del dominio de marcaje de *Cyp26C1*. En la parte más dorsal del oído interno del estadio HH24/25, los transcriptos de *Cyp26C1* estaban completamente ausentes en el sistema endolinfático (datos no mostrados). A este nivel, se detectó una expresión débil de *Cyp26C1*, incluso en células dispersas, en la parte más caudal de la pared medial (flecha grande en la Figura 3c), en un área rostral a la cresta posterior (cp; entre puntas de flecha en la Figura 3c). Como consecuencia, la cresta anterior era *Cyp26C1* negativa (ca; entre puntas de flecha en la Figura 3c). En una sección más ventral, la expresión *Cyp26C1* tiñó con diferente intensidad la mitad caudal del oído interno (flechas en la Figura 3f). Curiosamente, esta zona marcada por el *Cyp26C1* quedó situada caudalmente a la mácula del sáculo (ms; punta de flecha en la Figura 3f), mientras que los otros elementos sensoriales observados en esta sección, la cresta lateral y la mácula del utrículo, están desprovistos totalmente de transcriptos del gen *Cyp26C1* (cl y mu; Figura 3f). A nivel del conducto coclear, se observa una expresión muy fuerte de *Cyp26C1* en la casi totalidad del epitelio ótico, con células dispersas en su parte más rostral (flecha corta en la Figura 3i). La papila basilar, localizada en el medio, fue completamente incluida en el dominio de fuerte tinción de *Cyp26C1* (pb; entre puntas de flecha en la Figura 3i), además del esbozo de *tegmentum vasculosum* localizado lateralmente (tv en la Figura 3i). La sección transversal confirma la expresión del *Cyp26C1* principalmente en la mitad ventral del oído interno del estadio HH24/25, incluyendo las áreas en donde se desarrollan la papila basilar y el *tegmentum vasculosum* (pb y tv en la Figura 3l). En estas secciones, la pared del aparato endolinfático (ce en la Figura 3l) y las bolsas vertical y horizontal (bv en la Figura 3l; bh, no mostrado) estaban desprovistas de ARNm de *Cyp26C1*. Sobre la expresión del gen *Cyp26C1*, es interesante observar su impresión en alguna zona del mesénquima subyacente al epitelio ótico o al ganglio acústico-vestibular (asteriscos blancos en la Figura 3c, f, i). Este ganglio nunca mostró ningún transcripto de *Cyp26C1* (GAV en la Figura 3f, i).

La figura 4 resume los patrones de expresión *Cyp26*, *Cyp26B1* y *Cyp26C1* en el epitelio ótico en los estadios HH24/25. Las diferencias más importantes entre *Cyp26A1* y *Cyp26C1* fueron el aparato endolinfático, que fue *Cyp26A1* positivo y *Cyp26C1*

negativo, y las crestas anterior y posterior, que fueron *Cyp26A1* negativas y *Cyp26B1* positivas (*Cyp26A1*, Figura 4a, b; *Cyp26C1*, Figura 4e, f). Los transcriptos de *Cyp26C1* aparecieron por toda la zona caudal del epitelio ótico.

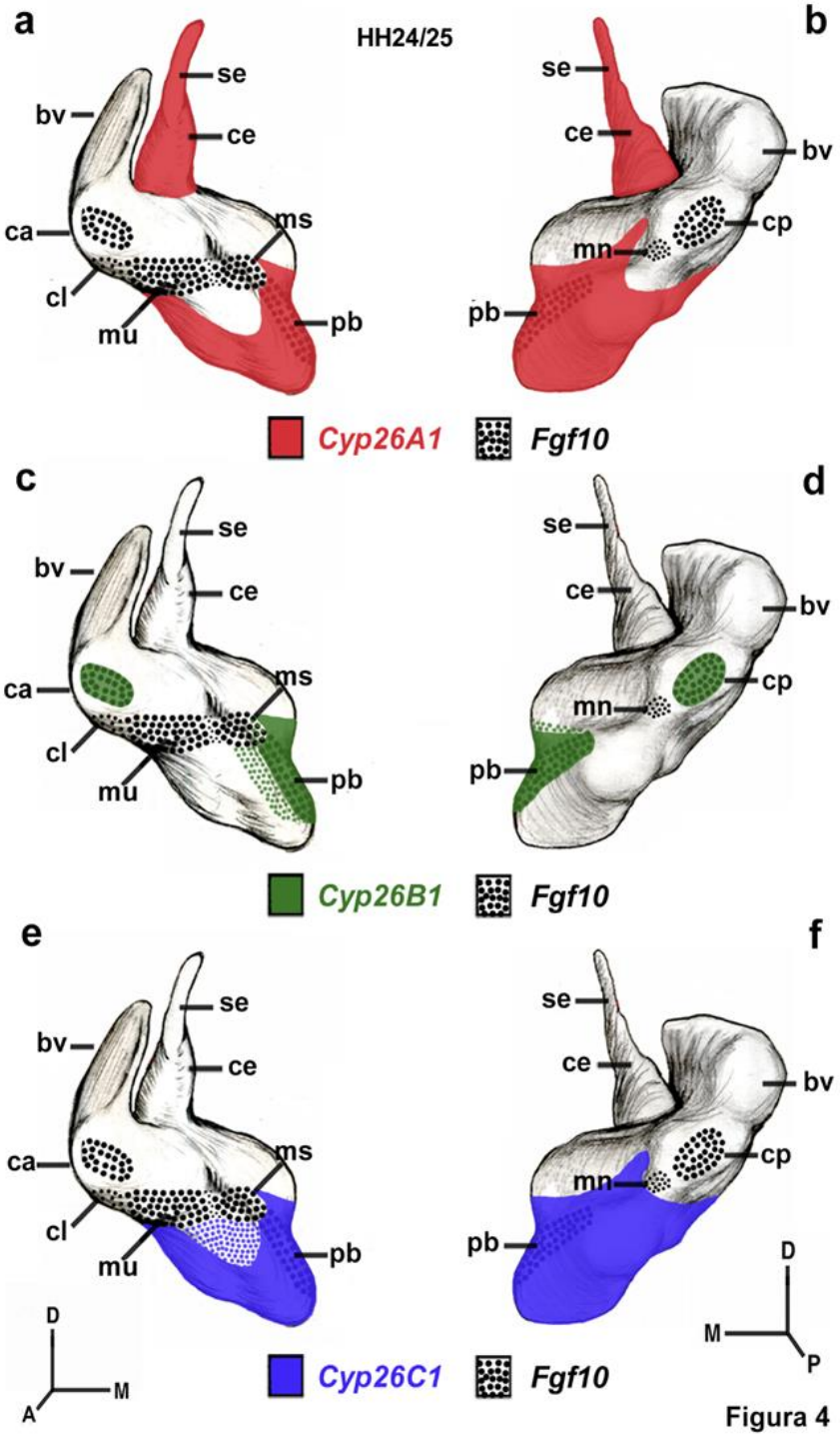


Figura 4. Diagramas en 3D de los patrones de expresión *Cyp26A1*, *Cyp26B1*, *Cyp26C1* y *Fgf10* en el estadio HH24/25 del oído interno tanto en la vista anterior (**a**, **c**, **e**) como posterior (**b**, **d**, **f**). Las áreas

punteadas muestran el dominio sensorial positivo para la expresión del gen *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

6.3. PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1*, *CYP26B1* Y *CYP26C1* EN EL ESTADIO HH27

En el estadio HH27, el gen *Cyp26C1* mostró la misma expresión que la del gen *Cyp26A1*, similar a los que se observó en el anterior estadio del desarrollo estudiado, con la excepción del aparato endolinfático (H24/25; Figura 3 y 4). En este estadio, la expresión de *Cyp26C1* fue más fuerte que la expresión de *Cyp26A1* sólo en la mitad ventral del oído interno en desarrollo, en la pared del conducto coclear en desarrollo, siendo la intensidad de expresión de ambos genes similar en la pared del vestíbulo. Por esta razón, los patrones de expresión de ambos genes se describirán juntos, indicando las diferencias más relevantes.

En secciones horizontales dorsales (Figura 5a'), se detectó una expresión heterogénea de *Cyp26A1* en el conducto y el saco endolinfáticos (ce en Figura 5a'), siendo todo el aparato endolinfático negativo para la expresión de *Cyp26C1* (no mostrado). En una sección horizontal a nivel de la cresta anterior y posterior (Figura 5a), ambos elementos sensoriales fueron negativos para la expresión de los genes *Cyp26A1* y *Cyp26C1* (ca y cp; entre puntas de flecha en la Figura 5a). Sólo se observó una expresión muy débil de *Cyp26A1*/*C1* en una pequeña área en la pared lateral-caudal del oído interno del estadio HH27 (flecha corta en la Figura 5a), muy cerca de la cresta posterior (cp en la Figura 5a). Esta expresión débil de *Cyp26A1*/*C1* se extendió ventralmente en la pared de la porción central del vestíbulo (Figura 5c). A este nivel, el área teñida de *Cyp26A1*/*C1* se localiza en las cercanías de la mácula neglecta (mn; flecha corta en la Figura 5c). El resto de los elementos sensoriales presentes en el vestíbulo estaban desprovistos de la expresión de los genes *Cyp26A1*/*C1* (cl, mu y ms; Figura 5c). En el conducto coclear (Figura 5e), la expresión *Cyp26A1*/*C1* mostró dos áreas positivas diferentes. Una de ellas estaba ubicada en la pared rostro-medial (flecha grande en la Figura 5e), delimitando rostralmente la papila basilar (pb; entre puntas de flecha en la

Figura 5e), y la otra estaba ubicada en la pared caudal-lateral (flecha corta en la Figura 5e), junto al área en la que se desarrolla el *tegmentum vasculosum* (tv en la Figura 5e). Al final del conducto coclear, se observó una tinción muy evidente de *Cyp26A1*/*C1* en la pared ótica (cc; flecha grande en la Figura 5g), estando totalmente ausente en la mácula de la lagena (ml en la Figura 5g). Tanto en mesénquima que rodea al epitelio ótico como el ganglio acústico vestibular (GAV en la Figura 5c) aparecen desprovistos de trascriptos de ambos genes, no pudiendo observar zonas claras de expresión. Estos resultados fueron confirmados en secciones transversales (datos no mostrados). Sin embargo, cabe destacar que dichas secciones transversales permitieron apreciar un aumento del gradiente dorsoventral en el dominio de expresión de *Cyp26C1* en el conducto coclear, así como un pequeño dominio teñido con *Cyp26C1* que delimita dorsalmente con la mácula de la lagena (datos no mostrados).

En el estadio HH27 del oído interno, la expresión de *Cyp26B1* continuó siendo fuerte, pero mostró cambios con respecto al estadio anterior (HH24/25). En secciones horizontales dorsales (Figura 5b, b'), se observaron transcriptos de *Cyp26B1* en un área pequeña dentro de la cresta anterior, rodeada por axones positivos 3A10 (ca; entre puntas de flecha en Figura 5b, b'). También se observaron transcriptos de *Cyp26B1* en el polo posterior del oído interno (flecha grande en la Figura 5b), en un área que limita caudalmente con la cresta posterior (cp; entre puntas de flecha en la Figura 5b). Más ventralmente, tanto la cresta lateral como la mácula del utrículo mostraron un marcaje de *Cyp26B1* (cl y mu; Figura 5d): la cresta lateral en su parte media (flecha corta en la Figura 5d) y la mácula del utrículo en su parte lateral (flecha grande en la Figura 5d). Además, otro dominio marcado con *Cyp26B1* fue visto en la pared medial del vestíbulo, caudal a la mácula del sáculo (ms; flecha grande en la Figura 5d). Esta última área *Cyp26B1* positiva se extendió ventralmente a lo largo de la porción rostral del conducto coclear (cc; flecha grande en la Figura 5f), delimitando rostralmente a la papila basilar inervada (pb; entre puntas de flecha en la Figura 5f). En la porción más ventral del conducto coclear (cc; Figura 5h), la mácula de la lagena sólo exhibió algunas células dispersas teñidas con *Cyp26B1* (ml en la Figura 5g). El ganglio acústico-vestibular fue completamente negativo para la expresión del gen *Cyp26B1* (GAV en la Figura 5d). Además, la expresión *Cyp26B1* presente en el mesénquima junto al oído interno en el

estadio HH24/25 (Figura 3) se detectó en áreas más pequeñas (asterisco blanco en la Figura 5b). Las secciones transversales corroboraron la expresión de *Cyp26B1* en la mácula de la lagena, y también mostraron un pequeño dominio débilmente teñido con *Cyp26B1* en la pared lateral de la bolsa vertical (datos no mostrados). La Figura 6 resume los patrones de expresión *Cyp26A1*, *Cyp26B1* y *Cyp26C1* en el epitelio ótico en el estadio HH27.

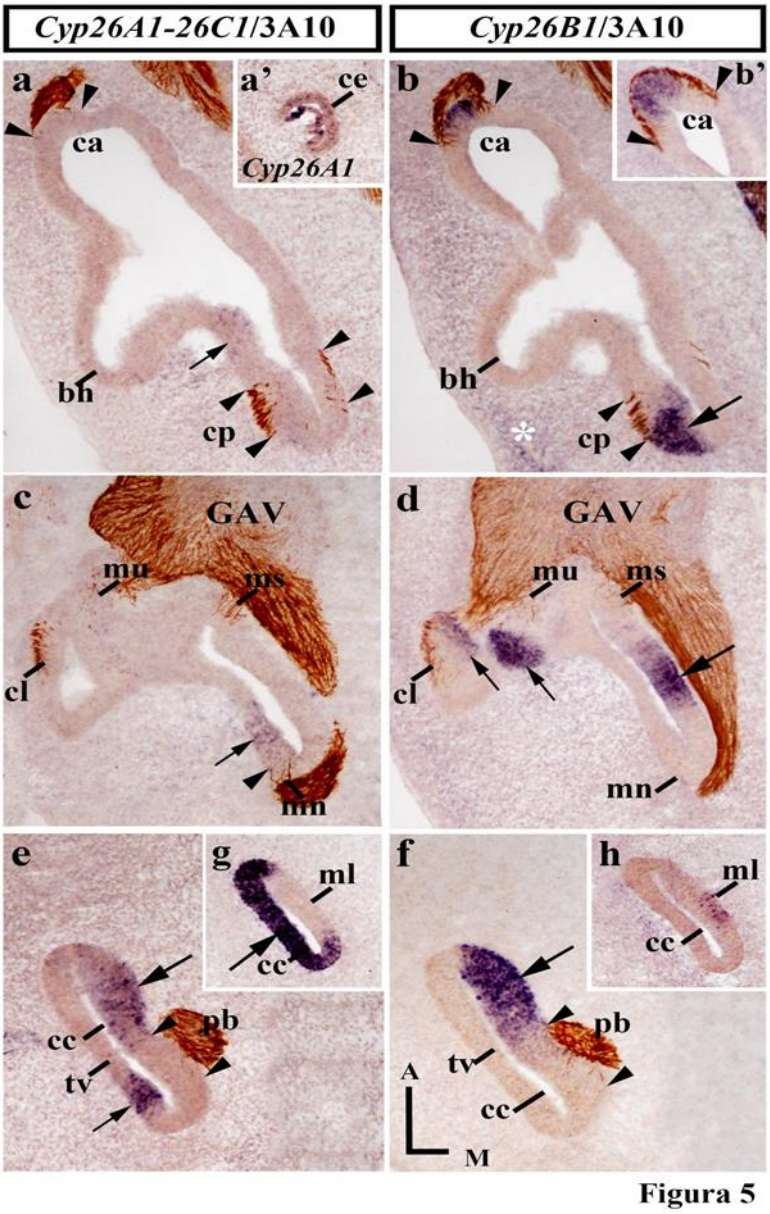


Figura 5

Figura 5. Patrones de expresión *Cyp26A1*, *Cyp26B1* y *Cyp26C1* en el estadio HH24/25. Secciones horizontales (**a**-**h**) a través del oído interno, tratadas con las sondas indicadas en cada columna. La inervación fue identificada por la inmunorreacción con 3*A*10. El sistema endolinfático mostró exclusivamente la expresión *Cyp26A1* (ce en **a'**). Se observó una expresión débil de *Cyp26A1*/*C1* en la pared ótica caudal-medial (flechas cortas en **a**, **c**), cerca de la cresta posterior (cp; entre las puntas de las flechas en **a**) y al borde de la mácula neglecta (mn en **c**). En el conducto coclear, la expresión *Cyp26A1*/*C1*

era muy heterogénea (flechas en **e**, **g**), bordeando rostralmente la papila basilar (pb; entre puntas de flecha en **e**) y toda la mácula de la lagena (ml en **g**). La expresión de *Cyp26B1* se detectó en la cresta anterior (ca; entre puntas de flecha en **b**, **b'**), en la cresta lateral y en la mácula del utrículo (cl y mu; flechas cortas en **d**) y en la mácula de la lagena (ml en **h**). El *Cyp26B1* bordea la cresta posterior (cp, entre puntas de flecha en **b**; flecha grande en **b**), la mácula del sáculo (ms; flecha grande en **d**) y la papila basilar (pb; flecha grande en **f**). Otras áreas del conducto coclear fueron *Cyp26B1* positivas (flecha corta en **e** y flecha grande en **g**). El asterisco blanco en **b** indica la expresión *Cyp26B1* en el mesénquima. El ganglio acústico-vestibular fue negativo para la expresión de los tres genes *Cyp26* (GAV en **c**, **d**). Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; M, medial.

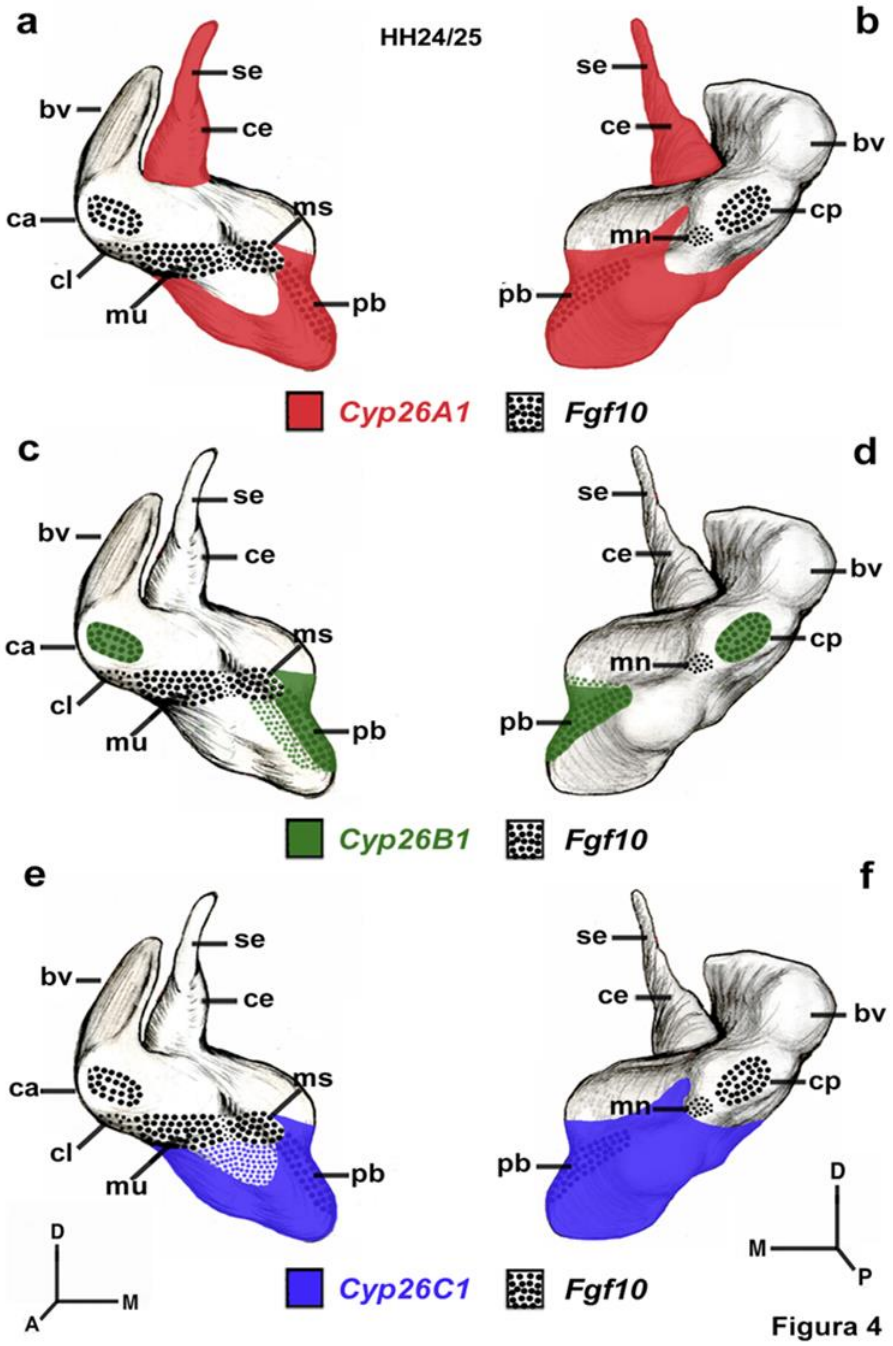


Figura 4

Figura 6. Diagramas en 3D de los patrones de expresión *Cyp26A1*, *Cyp26B1*, *Cyp26C1* y *Fgf10* tanto en la vista anterior (**a**, **c**, **e**) como posterior (**b**, **d**, **f**) del oído interno en el estadio HH27. Las áreas punteadas muestran el dominio sensorial, *Fgf10* positivos. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

6.4. PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CYP26A1*, *CYP26B1* Y *CYP26C1* EN EL ESTADIO HH34

En el estadio HH34, el patrón de expresión de *Cyp26A1* parecía muy heterogéneo en el aparato endolinfático (ce en la Figura 7a, b), incluso algunas áreas con expresión de *Cyp26A1* muy débil o no detectada también se observaron en su pared medial (flecha corta en la Figura 7a). Esta heterogeneidad en la expresión de *Cyp26A1* también puede observarse en la pie común de los canales semicirculares anterior y posterior (ccm; puntas de flecha en la Figura 7a, a', b). Con respecto a los elementos sensoriales, todas las crestas fueron claramente *Cyp26A1* negativas (ca y cp en la Figura 7b; cl en la Figura 7A). Además, se observaron células dispersas teñidas con *Cyp26A1* en la pared media del utrículo (u; flechas grandes en la Figura 7a, a’, c). Excepto la mácula del utrículo, el resto de las máculas del oído interno de pollo también fueron negativas para la expresión de *Cyp26A1* en esta etapa del desarrollo embrionario (ms en la Figura 7a, c; mn en la Figura 7b; ml, no mostrada). Todo el conducto coclear fue *Cyp26A1* negativo, incluyendo la papila basilar y el *tegmentum vasculosum* (no mostrados). Como en las etapas anteriormente descritas, los ganglios acústico y vestibular fueron completamente *Cyp26A1* negativos (GV en la Figura 7a; GA, no mostrado). Curiosamente, alguna parte del mesénquima junto al epitelio ótico mostraba células marcadas con *Cyp26A1* (asteriscos; Figura 7a-c). Las figuras 7d y e resumen el patrón de expresión de *Cyp26A1* en el epitelio ótico en el estadio HH34.

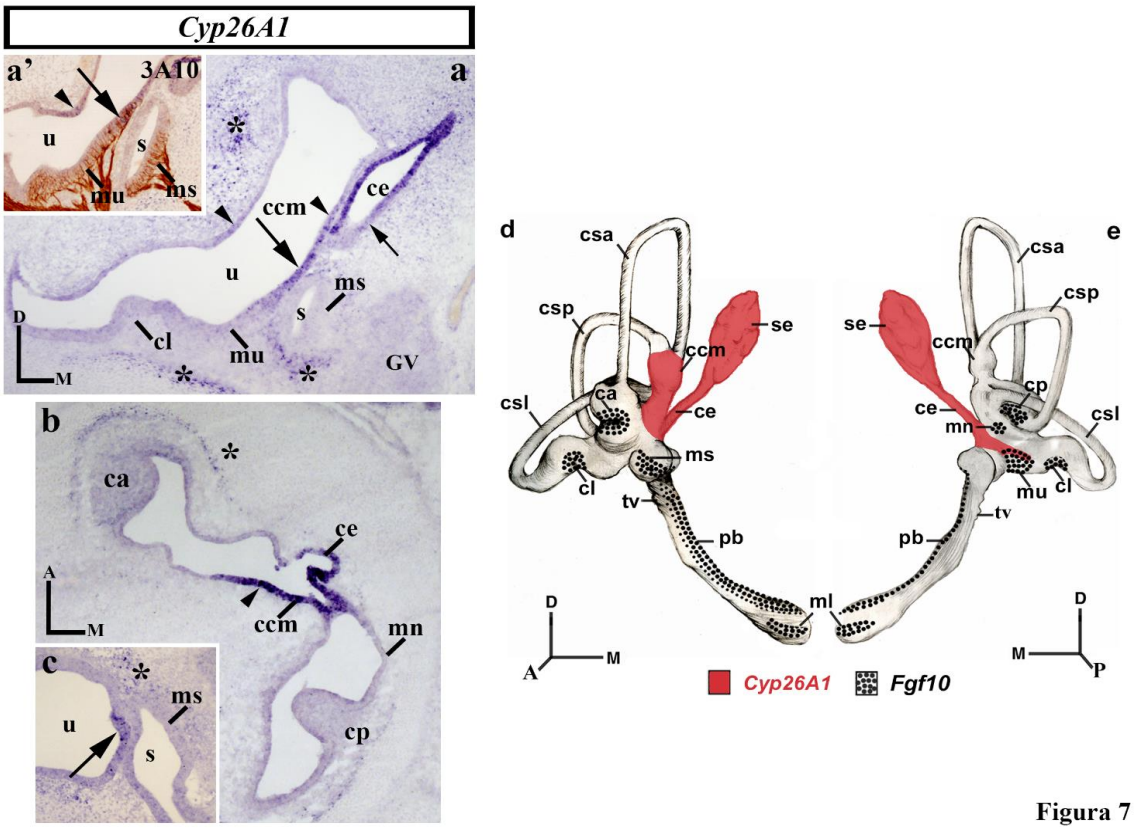
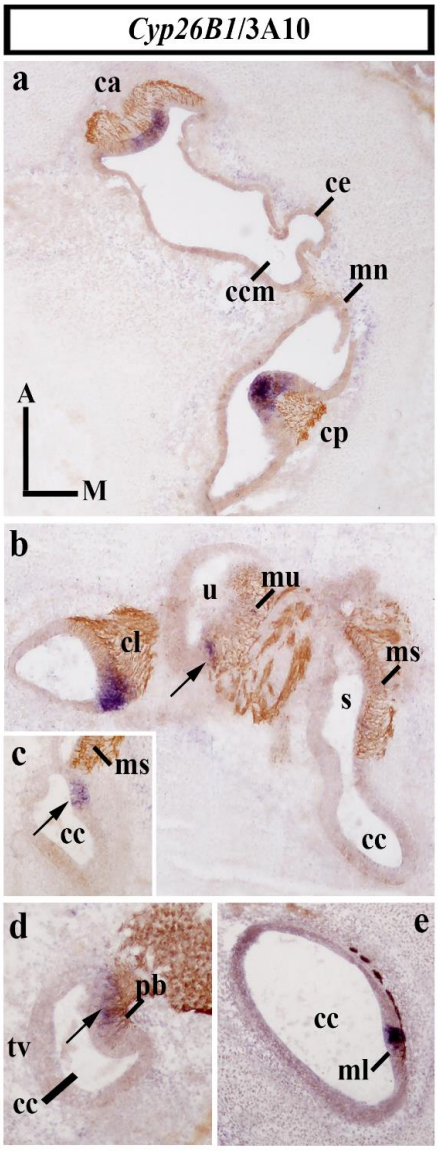


Figura 7. Patrones de expresión *Cyp26A1* en el estadio HH34. Secciones transversales (**a**, **a'**) y horizontales (**b**, **c**) a través del oído interno tratado con la sonda *Cyp26A1*. **a'** también fue tratado con inmunorreacción con 3*A*10 para mostrar la inervación de los elementos sensoriales. Se detectaron transcriptos de *Cyp26A1* en el aparato endolinfático (ce en **a**, **b**) y en la cruz común (ccm; puntas de flecha en **a**, **a'**, **b**). Se observaron células *Cyp26A1* positivas en la porción dorsal-medial de la mácula del utrículo (flecha grande en **a**, **a'**, **c**), siendo los únicos elementos sensoriales que expresan este gen. Los asteriscos en **a**-**c** indican una porción de la expresión de este gen en el mesénquima. Los ganglios acústico y vestibular fueron *Cyp26A1* negativos (GV en **a**; GA, no mostrado). (**d**, **e**) Diagramas 3D de los patrones de expresión de *Cyp26A1* y *Fgf10*, tanto en la vista anterior (**d**) como en la posterior (**e**) del oído interno de estadio HH34. Las áreas punteadas muestran el dominio sensorial positivo para la expresión de *Fgf10*. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

En esta etapa de desarrollo, los transcriptos de *Cyp26B1* fueron vistos en dominios discretos en la mayoría de los elementos sensoriales. En secciones horizontales (Figura 8a-e), todas las crestas mostraron expresión del gen *Cyp26B1* en su área central, pero no en toda el área inervada (ca y cp en la Figura 8a; y cl en la Figura 8b). Dentro de la mácula del utrículo, se observó una franja muy estrecha en su zona más lateral (mu; flecha en la Figura 8b). En el vestíbulo, las máculas del sáculo y neglecta estaban desprovistas de transcriptos de *Cyp26B1* (mn in Figura 8a; ms en Figura 8b). En

el conducto coclear, un área pequeña de su porción más proximal fue teñida por una expresión débil del gen *Cyp26B1* (cc; flecha en la Figura 8c), siendo el resto de su epitelio no sensorial negativo *Cyp26B1* (tv en la Figura 8d). Con respecto a los elementos sensoriales del conducto coclear, la papila basilar mostró bajos niveles de expresión del gen *Cyp26B1* en su mitad anterior (pb; flecha en la Figura 8d). La mácula de la lagena mostró una fuerte expresión de *Cyp26B1* también en su porción más anterior (ml en la Figura 8e). Las Figuras 8f y g resumen el patrón de expresión de *Cyp26B1* en el epitelio ótico en el estadio HH34.



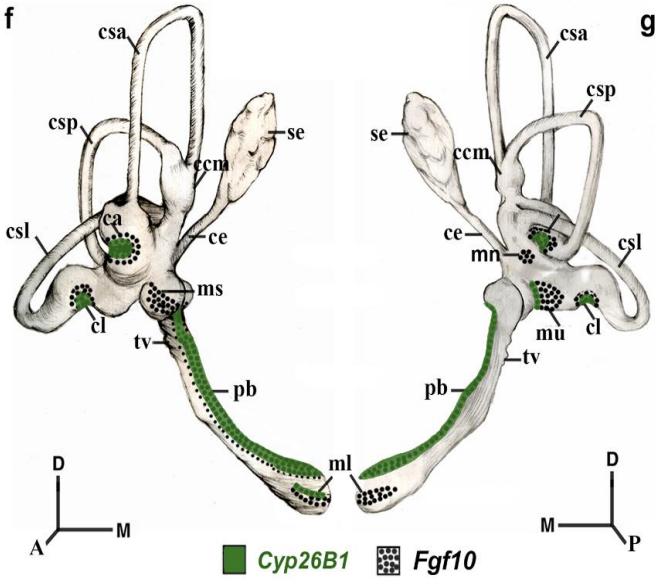


Figure 8

Figura 8. Patrones de expresión *Cyp26B1* en el estadio HH34. Secciones horizontales (**a**-**e**) a través del oído interno, tratadas con la sonda *Cyp26B1* e inmunorreacción con 3*A*10. Se detectó la expresión de *Cyp26B1* en todas las crestas (ca y cp en **a**; cl en **b**), en una pequeña porción de la pared lateral de la mácula del utrículo (mu; flecha en **b**) y en la porción más anterior de la papila basilar (pb; flecha en **d**) y de la mácula de la lagena (ml en **e**). La mácula del sáculo y la mácula neglecta fueron ambas *Cyp26B1* negativas (mn en **a**; ms en **b**). La flecha en **c** apunta a una pequeña área *Cyp26B1* positiva en el conducto coclear proximal (cc en **b**, **c**). (**f**, **g**) Diagramas en 3D de los patrones de expresión *Cyp26B1* y *Fgf10* tanto en la vista anterior (**f**) como posterior (**g**) del oído interno de la etapa HH34. Las áreas punteadas muestran los dominios sensoriales *Fgf10* positivo. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

En este momento de desarrollo, ya no existía paralelismo entre el patrón de expresión de los genes *Cyp26A1* y *Cyp26C1* (HH24/25 y HH27; Figuras 3-6). En secciones transversales (Figura 9a-d), se observó el marcaje de *Cyp26C1* en áreas muy pequeñas de la región central de todas las crestas (ca, flecha en la Figura 9a; cp, flecha en la Figura 9b; cl, no mostrada; ver Figura 9e, f). El resto de los elementos sensoriales del vestíbulo (maculas) fueron *Cyp26C1* negativos (no mostrados). Un área estrecha a lo largo de la pared anterior del conducto coclear, desde la porción dorsal a la porción ventral, mostró una expresión evidente del gen *Cyp26C1* (cc; flechas en la Figura 9 c, d). La papila basilar estaba desprovista de células que expresaran el gen *Cyp26C1*, excepto en su porción distal, donde se observaron claramente algunas células dispersas marcadas con *Cyp26C1* (pb; punta de flecha en la Figura 9d). En el conducto coclear, la mácula de la lagena, al igual que las otras maculas del oído interno de estadio HH34, fue también *Cyp26C1* negativa (ml en la Figura 9d). El *tegmentum vasclosum* también fue carente de expresión *Cyp26C1* (tv en la Figura 9c, d). Las Figuras 9e y f resumen el patrón de expresión *Cyp26C1* en el epitelio ótico en el estadio HH34.

Figura 9. Patrones de expresión *Cyp26C1* en el estadio HH34. Secciones horizontales (**a**, **b**, **c**, **d**) a través del primordio del oído interno, tratadas con la sonda *Cyp26C1* e inmunorreacción con 3*A*10. Se observaron niveles bajos de expresión del gen *Cyp26C1* en el área central de las crestas (ca, cp; flechas en **a**, **b**; cl, no mostrada). El conducto coclear presentaba una pequeña área marcada por la expresión *Cyp26C1* en su parte más rostral (cc, flechas en **c**, **d**). La papila basilar mostró células *Cyp26C1* positivas exclusivamente en su porción distal (pb, punta de flecha en **d**). (**e**, **f**) Diagramas 3D de los patrones de expresión *Cyp26C1* y *Fgf10* tanto en la vista anterior (**e**) como posterior (**f**) del oído interno en estadio HH34. Las áreas punteadas muestran los dominios sensoriales, *Fgf10* positivos. Para otras abreviaturas, véase la lista. Orientación: A, anterior; D, dorsal; M, medial; P, posterior.

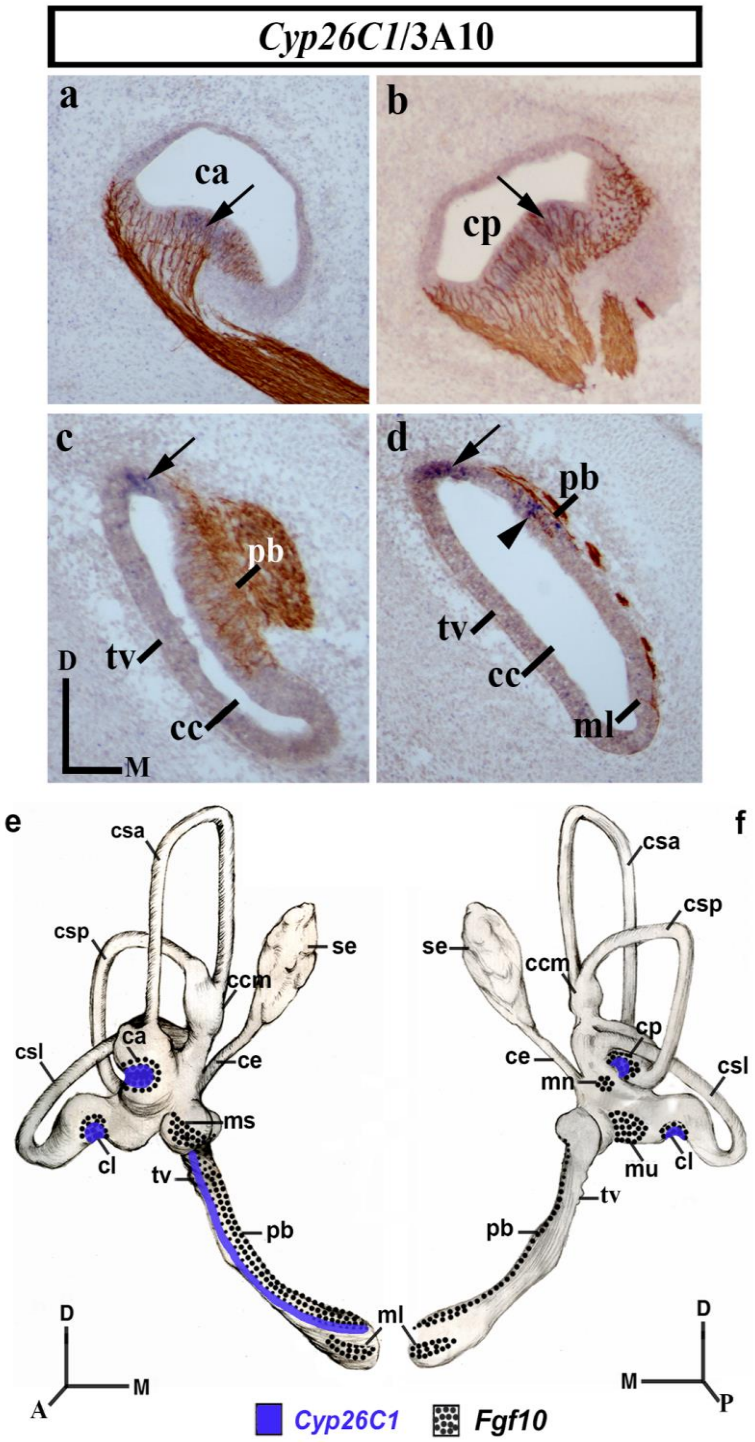

Cyp26C1/3A10
a
ca
b
cp
c
pb
tv
cc
D
M
d
pb
tv
cc
ml
e
csa
csp
se
ccm
ca
csl
ce
ms
cl
tv
pb
ml
D
M
A
f
csa
csp
se
ccm
cp
ce
mn
csl
mu
cl
tv
pb
D
M
P
Cyp26C1
Fgf10

Figura 9

DISCUSIÓN GENERAL

7. DISCUSIÓN

7.1. EL GEN *CYP1B1* PODRÍA DETERMINAR EL DESARROLLO DE LOS ELEMENTOS SENSORIALES.

El ácido retinoico (AR) controla directamente la morfogénesis y los mecanismos de especificación durante el desarrollo del oído interno de vertebrados, principalmente por medio de las enzimas RALDH, que sintetizan el AR (revisado por Romand et al., 2006a; Frenz et al., 2010; Wu y Kelly, 2012; Romand et al., 2013; Nakajima, 2015; Raft et al., 2015). En el oído interno del ratón en desarrollo, los genes *Raldh1-3* tienen patrones de expresión restringidos y dinámicos con dominios superpuestos (Niederreither et al., 2002; Romand et al., 2001, 2004, 2006a, b). En otros vertebrados, los patrones de expresión de *Raldh3* muestran similitudes manifiestas en los estadios de desarrollo analizados (*Xenopus*: Lupo et al., 2005; pez cebra: Pittlik et al., 2008; *Gallus gallus*: Mic et al., 2000; Sánchez-Guardado et al., 2009). El patrón de expresión detallado en los embriones de pollo mostró que el AR se produce en la porción dorsal-medial de la vesícula ótica (Sánchez-Guardado et al., 2009). En los primeros estadios de desarrollo, este morfógeno podría difundir hacia las áreas ventrales, controlando todo el patrón del esbozo ótico como una señal de largo alcance que actúa a través de efectos dependientes de la dosis (Sánchez-Guardado et al., 2009). Por lo tanto, estas enzimas RALDH, sintetizadoras de AR, podrían estar directamente involucradas en la determinación de eventos morfogenéticos y en la especificación de elementos sensoriales durante el desarrollo de este complejo órgano sensorial.

Chambers y colaboradores han demostrado que, *in vitro*, el propio CYP1B1 produce tanto ácido all-trans-retinal (t-RAL) como ácido all-trans-retinoico (t-RA), contribuyendo así a la síntesis del AR implicado en el patrón de varios tejidos embrionarios (Chambers et al., 2007; véase también Zhang et al., 2000; Choudhary et al., 2004). A diferencia de las enzimas CYP26, CYP1B1 no puede participar en la degradación de t-RA. Curiosamente, los patrones de expresión del ortólogo *Cyp1B1* durante el desarrollo temprano están asociados con sitios conocidos de actividad de AR (Chambers et al., 2007). Así, la enzima *CYP1B1* de pollo participa en la especificación del

eje dorsal-ventral del tubo neural y en la adquisición del destino de neuronas motoras, así como en el patrón de las placodas epibranquiales y los eventos neurogenéticos que ocurren en ellas. Además, la actividad de CYP1B1 es exclusivamente responsable de la síntesis de AR en el mesodermo paraxial del cerebro posterior, los arcos branquiales y en la yema de la extremidad posterior, donde las expresiones de las *Raldhs* están ausentes (Chambers et al., 2007). En el pez cebra, se ha demostrado que *Cyp1B1* también muestra un patrón claro de expresión espacial y temporal en el ojo, el diencéfalo y el dominio cerebro medio-cerebro posterior, los arcos branquiales, las extremidades y los riñones (Yin et al., 2008). Por lo tanto, CYP1B1 de pollo constituye una vía evidente de regulación de la señalización del AR independiente de las RALDHs, contribuyendo al patrón y especificación de varios sistemas en desarrollo (Chambers et al., 2007; Yin et al., 2008), incluyendo el oído interno (este trabajo).

7.1.1. EXPRESIÓN DE *CYP1B1* EN EL ESTADIO DE VESÍCULA ÓTICA: PATRONES Y MORFOGÉNESIS.

En cuanto al desarrollo del oído interno, la especificación de los órganos sensoriales puede estar gobernada por señales de corto alcance procedentes del propio epitelio ótico o de los tejidos circundantes. En los embriones de pollo en estadio HH12+, la expresión de *Cyp1B1* es evidente en el ectodermo inmediatamente anterior a la vesícula ótica (Chambers et al., 2007). Una descripción detallada del patrón de expresión del *Cyp1B1* sería esencial para entender el papel de la vía de señalización retinoica en la morfogénesis de este órgano sensorial, así como en la especificación de las áreas sensoriales y no sensoriales, como fuente adicional de AR (este trabajo). En el epitelio de la vesícula ótica (estadio HH20), se observó la expresión de *Cyp1B1* en una banda anteroposterior ubicada en la porción ventromedial de la pared del otocisto. Este dominio de expresión de *Cyp1B1* coincide en parte con el dominio de expresión pro-sensorial de *Fgf10* (Sánchez-Guardado et al., 2013). El territorio presuntivo de la futura cresta posterior, situado en el aspecto más caudal del primordio ótico, era la única área sensorial que era *Fgf10*-positiva y *Cyp1B1*-negativa. Parece posible que, en este período de desarrollo, la actividad CYP1B1 generadora de AR pueda estar involucrada en la

especificación del dominio pro-sensorial a lo largo del eje anteroposterior del primordio ótico.

Por otro lado, la actividad de RALDH3 es, hasta ahora, la principal fuente conocida de AR en el oído interno de pollo en desarrollo (Sánchez-Guardado et al., 2009). Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de *Raldh3* se observa en la porción dorsomedial de la vesícula ótica, en un área correspondiente al dominio presuntivo del aparato endolinfático, y a una distancia del dominio pro-sensorial *Fgf10*-positivo en la etapa HH20 y bordeándolo en la etapa HH24 (Sánchez-Guardado et al., 2013). Por lo tanto, el AR generado por las enzimas *RALDH3* y *CYP1B1* dentro del epitelio ótico podría participar hasta cierto punto en la especificación de los ejes dorsal-ventral y anterior-posterior de la vesícula ótica, respectivamente.

La generación de AR a partir de tejidos cercanos debe considerarse también como una acción instructiva hacia el desarrollo del epitelio ótico. Está bien aceptado que el AR generado a partir del mesénquima subyacente por las actividades de las RALDHs debe participar directamente en la especificación del tubo neural a lo largo de sus ejes anterior-posterior y dorsal-ventral (Niederreither et al., 2002; Wilson y Maden, 2005; Glover et al., 2006; Maden, 2006; Mark et al., 2006; White y Schilling, 2008; Schilling et al., 2012; Allodi y Hedlund, 2014; Piersma et al., 2017). De manera similar, el AR del mesénquima periótico controlaría la regionalización del epitelio ótico en desarrollo, dependiendo del estadio de desarrollo (Romand et al., 2006a; Pittlik et al., 2008; Braunstein et al., 2009; Bok et al., 2011; Monks y Morrow, 2012; Wu y Kelly, 2012; Maier y Whitfield, 2014; Nakajima et al., 2015; Raft et al., 2015). En pollo, *Raldh2* se expresa en el mesodermo caudal a la placoda ótica. Es necesaria una concentración espacial y temporal apropiada del AR difusible para la correcta especificación del eje anteroposterior del primordio ótico en desarrollo (Bok et al., 2011). En este sentido, se ha sugerido que la síntesis de AR mediada por *CYP1B1* en el mesodermo paraxial también podría participar directamente en la especificación dorsal-ventral del tubo neural en desarrollo de manera paracrina (Chambers et al., 2007). Curiosamente, el mesénquima subyacente al epitelio ótico también expresó el gen *Cyp1B1* en pollo (este trabajo). Para más detalles sobre el sistema vestibular en desarrollo, la expresión del *Cyp1B1* de pollo se observó sin duda en el mesénquima entre el epitelio ótico y la pared

del tubo neural en desarrollo desde los estadios HH20 a HH27, estando completamente ausente en el mesénquima entre el epitelio ótico y el ectodermo cefálico. Por lo tanto, esta actividad CYP1B1 podría determinar la especificación del aspecto medial *versus* lateral del aparato vestibular. En cuanto al sistema auditivo, que se desarrolla a partir de la parte ventral del primordio ótico, se observó expresión de *Cyp1B1* en todo el mesénquima subyacente, con mayor expresión en sus partes anteromediales y posterolaterales en los estadios HH24-27 y en su parte proximal en el estadio HH34. Por lo tanto, la producción de AR mediada por *CYP1B1* desde el mesénquima periótico también contribuiría a la especificación dorsoventral y anteroposterior durante el desarrollo del oído interno, especialmente debido a la ausencia de actividades de RALDH en este mesénquima en aves (Chambers et al., 2007; Sánchez-Guardado et al., 2009). En otros vertebrados, se ha detectado una cooperación mutua entre las actividades de CYP1B1 y RALDH1-3 en el mesénquima periótico (Romand et al., 2006a; Pittlik et al., 2008), confirmando esta hipótesis.

7.1.2. ESPECIFICACIÓN DE LAS CRESTAS Y DE LOS CANALES SEMICIRCULARES.

El AR contribuye a la diferenciación de los elementos sensoriales vestibulares. Como se mencionó anteriormente, la expresión de *Cyp1B1* estaba presente en una banda orientada de anterior a posterior, justo en la parte ventromedial de la vesícula ótica, siendo incluida en el dominio pro-sensorial *Fgf10*-positivo. En esta etapa de desarrollo, el territorio presuntivo de la cresta posterior era la única área desprovista de expresión de *Cyp1B1*. A medida que avanzaba el desarrollo, el *Cyp1B1* que expresaba el dominio se extiende caudalmente y, en el estadio HH24/25, la cresta posterior estaba por lo tanto claramente etiquetada como *Cyp1B1* positiva.

Un punto particular tiene que ser mencionado acerca de la cresta lateral. En el estadio HH24, la cresta lateral fue *Cyp1B1* positiva exclusivamente en una banda estrecha adyacente a la mácula del utrículo. Poco después, en el estadio HH25, la cresta lateral fue claramente marcada con la expresión *Cyp1B1*, sugiriendo que la mencionada banda *Cyp1B1*-positiva observada en el estadio HH24 había aumentado de espesor y se

había extendido hacia la parte lateral de la cresta lateral. Así, se detectaron fuertes expresiones de *Cyp1B1* en todas las crestas de los estadios HH27 a HH34, lo que sugiere que la síntesis de AR mediada por CYP1B1 podría participar en la especificación de las crestas. En este sentido, hay actividad de RALDH3 en áreas adyacentes a todas las crestas en la etapa HH24, no superponiéndose con los dominios que expresan *Cyp1B1*. En el estadio HH27, se detectaron algunas células *Raldh3*-positivas dentro de la periferia de todas las crestas (Sánchez-Guardado et al., 2009), por lo que también expresaron el gen *Cyp1B1*. La existencia de dos fuentes diferentes de AR, probablemente con diferentes mecanismos de regulación, activación o inhibición, apunta a la necesidad de nuevas investigaciones en la especificación de las crestas.

Anteriormente se ha mostrado una clara relación entre los patrones de expresión del gen *Raldh3* y la síntesis de AR y los de otras vías de señalización, como el BMP4 y el FGF (Sánchez-Calderón et al., 2004, 2007; Sánchez-Guardado et al., 2009). El gen *Bmp4* muestra un motivo RARE. Por lo tanto, las proteínas BMPs y FGFs se consideran un elemento potencial de la vía reguladora del AR (Thompson et al., 2003). El gen *Bmp4* está regulado negativamente por el AR, ya que las microesferas empapadas de AR implantadas en la vesícula ótica llevaron a una reducción evidente de la expresión de *Bmp4* en la cresta anterior en desarrollo (Choo et al., 1998). Además, el AR regula las actividades del FGF3 y de FGF10 en el epitelio ótico en desarrollo porque los cambios en los niveles de AR conducen a una disminución de estas moléculas (Frenz et al., 2010; Cadot et al., 2012; Liu et al., 2008; ver Olaya-Sánchez et al., 2016 para los genes *Fgf3* y *Fgf10* de pollo).

Varios factores de transcripción también podrían estar involucrados en la especificación de las crestas. Los genes *Meis*, pertenecientes a la familia TALE, son importantes dianas del AR, cooperando de manera dependiente de dosis en la formación de varias estructuras durante el desarrollo embrionario (Roselló-Díez et al., 2014; Merabet y Galliot, 2015; Roux y Zaffran, 2016; Frank y Sela Donenfeld, 2019). En el oído interno del pollo en desarrollo, los genes *Meis1* y *Meis2* se expresan claramente en todo el dominio presuntivo de los canales semicirculares y más débilmente en todas las crestas asociadas (Sánchez-Guardado et al., 2011).

Además, la señalización del AR controlaría las expresiones de los genes *Irx* (Gómez-Skarmeta et al., 1998; ver Anexo). En el tubo neural en desarrollo, el *Irx3* es inducido por el AR y reprimido por los FGFs (Novitch et al., 2003; Wilson y Maden, 2005; ver Anexo). En embriones deficientes en la señalización del AR, la expresión del *Irx3* se reduce severamente (Diez-del-Corral et al., 2003; ver Anexo). En la vesícula ótica de pollo, los genes *Irx* están ausentes o débilmente expresados en el territorio presuntivo del aparato endolinfático *Raldh3*-positivo (Sánchez-Guardado et al., 2009), lo que sugiere una represión de los genes *Irx* durante el desarrollo de este elemento no sensorial. Sin embargo, el AR inhibe las expresiones *Irx1* e *Irx2* a través de un mecanismo independiente del BMP en la extremidad de pollo en desarrollo (Díaz-Hernández et al., 2013; ver Anexo). La posible implicación del AR en la inducción o la represión de las expresiones de los genes *Irx* requiere una mayor consideración en el oído interno de los vertebrados durante la embriogénesis (ver Anexo).

7.1.3. ESPECIFICACIÓN DE LAS MÁCULAS.

En el oído interno de pollo en desarrollo, la mácula del utrículo y la mácula del sáculo mostraron expresiones débiles del gen *Cyp1B1* en el estadio HH24. En los estadios HH27 y HH34, la expresión *Cyp1B1* se mantuvo en las máculas del utrículo y del sáculo. Se detectó una expresión adicional de *Cyp1B1* en la mácula de la lagena, mientras que la mácula neglecta fue negativa para el gen *Cyp1B1*. Con respecto a la actividad de RALDH3 como fuente de AR, se observó un dominio que expresa *Raldh3* en la pared dorsomedial del primordio ótico de pollo en el estadio HH24, bordeando dorsalmente las maculas del utrículo y del sáculo indiferenciadas (Sánchez-Guardado et al., 2013). Se propuso que el mecanismo de señalización del AR puede limitar el laberinto membranoso en desarrollo, como la ubicación precisa del límite de *Raldh3-Gbx2*/*Bmp4-Fgf8* (Sánchez-Guardado et al., 2013). Los resultados del trabajo en el desarrollo del tubo neural, que muestran que el AR de los somitas bloquea la vía de señalización del FGF (Diez-del-Corral et al., 2003; Wilson y Maden, 2005), apoyarían los hallazgos descriptivos mostrados por Sánchez-Guardado y colaboradores (Sánchez-Guardado et al., 2013). En

el estadio HH27, la expresión del *Raldh3* de pollo está presente principalmente en las máculas del utrículo y del sáculo, e incluso hay células *Raldh3*-positivas en algunas áreas de estos elementos sensoriales, resultados similares a los observados en la mácula de la lagena en el estadio HH34. La mácula neglecta de pollo está siempre bordeado por la expresión *Raldh3* (Sánchez-Guardado et al., 2013). La expresión del *Cyp1B1* de pollo en las máculas se observó en las máculas del utrículo y del sáculo, así como con menor intensidad en la mácula de la lagena, pero no fuera de estos elementos sensoriales. Algunas partes de ellos mostraron una expresión superpuesta de los dos genes. En vista de todos estos resultados juntos, una pregunta clave sería conocer los posibles mecanismos de regulación de las actividades RALHD3 y CYPB1, y su interacción con otras vías de señalización y factores de transcripción, durante la especificación de las máculas del oído interno en vertebrados.

7.1.4. ESPECIFICACIÓN DEL SISTEMA AUDITIVO.

El AR está directamente implicado en el desarrollo del sistema auditivo, por lo que los cambios en los niveles de AR conducen a una alteración grave de la cóclea (Romand et al., 2006a; Thiede et al., 2014). En el ratón, *Raldh1* se observó en el órgano de Kölliker, mientras que *Raldh2* y *Raldh3* estaban presentes en la estría vascular y la membrana de Reissber. Las enzimas metabólicas CYP26s y las proteínas de unión del AR celular también están presentes en el canal coclear en desarrollo y en el mesénquima subyacente. Además, varios componentes del conducto coclear en desarrollo exhiben expresiones RAR y RXR, y los ratones mutantes RARα/RARγ muestran perturbaciones importantes durante su desarrollo (Romand et al., 2006a). En el oído interno del pollo, la expresión de *Raldh3* también está presente en el conducto coclear en desarrollo (Sánchez-Guardado et al., 2009) y la perturbación de las dosis de AR por la implantación de microesferas empapadas de AR confirma su implicación directa en la especificación del sistema auditivo (Choo et al., 1998). Con nuestro trabajo mostramos que el área positiva de *Cyp1B1* incluía la papila basilar y la porción más rostral contigua al sistema auditivo (este trabajo). A medida que avanzaba el desarrollo, la papila basilar presentaba un gradiente rostrocaudal decreciente de expresión de *Cyp1B1* (estadio HH34). Todos

los elementos no sensoriales del aparato auditivo eran *Cyp1B1* negativos excepto una pequeña área del conducto coclear proximal. Por lo tanto, la actividad del *Cyp1B1*, no considerada hasta ahora en el desarrollo del sistema auditivo, podría jugar un papel clave en la especificación celular de ese sistema, por lo que se debería considerar la realización de nuevas investigaciones al respecto.

En resumen, la actividad CYP1B1 puede participar en eventos de especificación que confieren identidad posicional en el laberinto membranoso en desarrollo, definiendo la ubicación y extensión de los elementos sensoriales. Se requieren estudios más experimentales para determinar el papel del AR producido por CYP1B1 en el desarrollo del oído interno mediante la cooperación de las enzimas metabólicas CYP26s, las proteínas de unión al AR celular (CRABP-I) y los RAR/RXRs, que regulan el creciente número de genes que se sabe están directa o indirectamente regulados por el AR (Balmer y Blomhoff, 2002; Romand et al., 2013; Savory et al., 2014). En este sentido, parece posible que el *Cyp1B1* pueda desempeñar un papel importante en la morfogénesis y especificación del oído interno a través de la síntesis de factores reguladores alternativos, no identificados, diferentes del AR, tal y como sugirió en su trabajo Chambers y colaboradores (2007). Además, también podrían considerarse otras enzimas de síntesis de AR aún no identificadas (Chambers et al., 2007).

7.2. DIFERENTE GRADO DE SENSIBILIDAD DEL EPITELIO ÓTICO AL AR: LA PROTEÍNA CRABP-1.

Este estudio proporciona una descripción detallada de los patrones de expresión del gen que codifica a la proteína CRABP-I en el desarrollo del oído interno de aves. El efecto dependiente de la dosis del AR también está modulado por las actividades de la proteína CARBP-I y de las enzimas CYP26s. La distribución desigual final del AR puede regular la expresión de factores de transcripción espacialmente restringidos que tienen diferentes umbrales para la activación del AR. Para las proteínas CRABPs, podrían proporcionar retroalimentación negativa adicional al prevenir el acceso del ligando a los receptores y facilitando la degradación de la AR. De ahí la elevada conservación de su

secuencia primaria, sus distribuciones espaciotemporales durante el desarrollo y los cambios patológicos resultantes de las expresiones ectópicas de los genes *CRABP* sugieren claramente que las proteínas CRABPs desempeñarían un papel clave en la diferenciación tisular y celular. Aunque hay algunas diferencias claras entre CRABP-I y CRABP-II (Wei, 2016; Collins and Watt, 2008; Dong et al., 1999; Michalik and Wahli, 2007), ni los embriones con mutación única CRABP-I $^{-/-}$ ó CRABP-II $^{-/-}$ o con mutación doble CRABP-I $^{-/-}$/CRABP-II $^{-/-}$ muestran anormalidades durante el examen histológico, lo que sugiere que ninguna de estas proteínas CRABPs es esencial para el desarrollo normal, e incluso en la vida adulta (Wei, 2016; de Bruijn et al., 1994; Gorry et al., 1994; Lampron et al., 1995). Por lo tanto, CRABP-I y CRABP-II pueden compartir una redundancia funcional y algunos otros mecanismos alternativos también pueden actuar para regular la vía de señalización del AR. Aunque el papel de las CRABPs en el desarrollo embrionario aún no está claro, es interesante considerar que los tejidos con mayor sensibilidad a la teratogenicidad del AR muestran niveles más fuertes de expresión de CRABP, sugiriendo que las CRABP pueden protegerlos contra excesos de AR (Napoli, 2017).

7.2.1. VESÍCULA ÓTICA: PATRONES Y MORFOGÉNESIS.

Se detectó un patrón heterogéneo de expresión génica de *CRABP-I* en la pared de la vesícula ótica (este trabajo; ver también Deng y Wu, 2016). Se observaron niveles más altos en su porción dorsomedial, un área que se enfrenta a la parte del cerebro posterior e incluye el aparato endolinfático en crecimiento. El conducto y el saco endolinfáticos continuaron expresando el gen *CRABP-I* en los estadios HH24/27, con un patrón sal y pimienta en el estadio HH32. En la etapa vesicular ótica, este dominio que expresaba fuertemente *CRABP-I* contiene el territorio que expresa el gen *Raldh3*, siendo RALDH3 la única retinaldehído deshidrogenasa implicada en la síntesis del ácido retinoico en el oído interno de las aves en desarrollo (Sánchez-Guardado et al., 2009). Así, la proteína CRABP-I podría modular la actividad del AR en la pared dorsomedial del esbozo ótico, regulando el desarrollo del sistema endolinfático. En este contexto molecular podrían considerarse otros factores reguladores. El gen homeobox *Gbx2* se

expresa en el oído interno temprano de los vertebrados (Wassarman et al., 1997; Hidalgo-Sánchez et al., 2000; Su y Meng, 2002), sólo en la pared dorsomedial del otocisto (Sánchez-Calderón et al., 2002, 2004). La expresión de *Msx1* es un excelente marcador del aparato endolinfático, aunque también podría estar implicada en la diferenciación de estructuras vestibulares cercanas, como los canales semicirculares y sus crestas asociadas (Wu y Oh, 1996). DAN, un antagonista de BMP4, se detecta en el epitelio ótico medial durante el desarrollo del oído interno de las aves y su expresión alterada genera anormalidades en el conducto y el saco endolinfáticos (Gerlach-Bank et al., 2004). Además, un estudio detallado de los patrones de expresión de genes relacionados con *Wnt* sugiere claramente que una combinación específica de estos genes podría estar directamente implicada en la regionalización del epitelio ótico. En cuanto a la especificación del dominio dorsomedial, la expresión génica *Wnt2b* se detecta exclusivamente en esta área, mientras que la expresión de *Fzd8* marca todo el epitelio ótico excepto el dominio dorsomedial (Sienknecht y Fekete, 2009).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la expresión *Raldh3* comienza en el aspecto más dorsomedial del epitelio ótico en el estadio HH18. Pocas horas después (etapa HH20), la expresión de este gen, *Raldh3*, se extiende ventralmente, formando un gradiente de expresión dorsoventral (Sánchez-Guardado et al., 2009), deteniéndose en el dominio pro-sensorial, positivo para el gen *Fgf10* (Sánchez-Guardado et al., 2013). Es bien sabido que CRABP-I actúa eliminando el AR libre en el citoplasma para proteger las células sensibles al AR, regulando así la concentración y actividad dosis-dependiente del AR (Wei, 2016). Por lo tanto, CRABP-I modularía la actividad del AR implicada en la especificación de:

- El aparato endolinfático en desarrollo, que está sujeto al efecto de niveles más altos de expresión *Raldh3* y *CRABP-I* (ver arriba).
- El vestíbulo adyacente, área del primordio ótico donde el dominio pro-sensorial, *Fgf10*-positivo, se desarrolla y es probable que este territorio epitelial esté expuesto a concentraciones más bajas de AR, y diferentes niveles de expresión *CRABP-I* (ver más abajo).

- La porción más ventral del otocisto, donde el conducto coclear se agrandará y el epitelio ótico mostró expresión de *CRABP-I* más débil o no expresión.

Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que, en el estadio de la vesícula ótica, los diferentes niveles de expresión de *CRABP-I* podrían estar involucrados en la especificación de los elementos óticos a lo largo del eje dorsoventral del aparato ótico. En este sentido, los experimentos en los que se aplicó AR en la fase copa/vesícula ótica mostraron que las estructuras vestibulares eran más susceptibles a los efectos del AR que el conducto coclear.

De los tres canales semicirculares, el anterior fue el más susceptible al tratamiento de AR, mientras que la cruz común era particularmente resistente. El defecto en la formación del canal semicircular se relaciona con la regulación descendente de la proliferación celular temprana en el epitelio del otocisto epitelio (Choo et al., 1998). Las interacciones moleculares con otras vías de señalización, tales como FGFs, WNTs, BMPs y SHH, cooperarían con el mecanismo molecular del AR en la especificación de los ejes óticos (Wu y Kelly, 2012; Riccomagno et al., 2005; Groves y Fekete, 2012; Ohta y Schoenwolf, 2018).

7.2.2. ESPECIFICACIÓN DEL SISTEMA VESTIBULAR POR LA PROTEINA CRABP-I.

Un aspecto importante en el desarrollo del oído interno de vertebrados es la especificación de los elementos sensoriales dentro del epitelio ótico. En las aves, se produce en un territorio pro-sensorial presente en la pared ventromedial de la vesícula óptica, que expresa los genes *Serrate1*, *Sox2* y *Fgf10* (Sánchez-Guardado et al., 2013; Alsina et al., 2004). En etapas posteriores del desarrollo embrionario, esta banda pro-sensorial se divide sucesivamente, dando como resultado seis de los ocho elementos sensoriales: la cresta lateral y la mácula neglecta podrían ser generada *de novo* por mecanismos inductivos (Sánchez-Guardado et al., 2013). Nuestros resultados mostraron que, en la etapa de vesícula ótica, había una expresión de *CRABP-I* con un patrón heterogéneo respecto a la banda pro-sensorial, con una distribución de anterior a

posterior. La expresión de *CRABP-I* más fuerte se detectó en dos áreas separadas dentro del territorio pro-sensorial, que probablemente correspondan a la mácula del utrículo y a la papilla basilar primordial. Entre estas dos áreas, fue detectada un área menor o carente de expresión *CRABP-I*, probablemente correspondiente a la mácula del sáculo en desarrollo. Además, las dos piezas más fuertemente marcadas con las sondas *CRABP-I* siendo contiguas a las áreas con niveles más débiles (intermedios) de expresión de *CRABP-I*, que coinciden bien con las crestas anterior y posterior en desarrollo. Este hallazgo sugiere que las proteínas CRABP-I podrían proteger diferentes áreas pequeñas alineadas a lo largo de la banda de expresión de *Fgf10* contra los efectos del AR, regulando así su especificación en diferentes elementos sensoriales.

En la siguiente etapa analizada, HH24/25, las crestas anterior y posterior disminuyeron sus niveles iniciales de expresión de *CRABP-I*, con ninguna expresión o niveles indetectables por el método de la hibridación *in situ*. La ya identificable mácula neglecta muestra un nivel muy bajo de expresión de *CRABP-I*, mientras que la mácula del sáculo continuó con una ausencia completa de transcriptos de *CRABP-I*. Sin embargo, la mácula del utrículo en desarrollo mantenía niveles muy altos de expresión de *CRABP-I*. Así, los cambios en la expresión de *CRABP-I* podría deberse a variaciones en la expresión de *Raldh3*, cuyo ARNm se ha observado en áreas contiguas a todas las crestas y a las máculas utricular y sacular, incluso en células dispersas dentro de las cristas en desarrollo (Sánchez-Guardado et al., 2013).

En la etapa HH27, el patrón de expresión dinámica del gen *CRABP-I* mostró que la mácula neglecta perdió su baja expresión, como se observó en las etapas siguientes, mientras que las crestas anterior y posterior mostraron baja expresión en comparación con la ausencia observada en la etapa anterior (HH24/25). La expresión en ambas crestas probablemente refleja un nuevo papel de la proteína CRABP-I en la especificación celular en cada elemento sensorial a medida que avanza el desarrollo. Así, después de la etapa HH27, el papel que CRABP-I desempeña en la especificación de los elementos sensoriales se vuelve progresivamente menos relevante, con su expresión manteniéndose sólo en una dispersión de células dentro de esos elementos sensoriales, como se observó en el estadio HH32. Esto sugiere que el gen *CRABP-I* podría

desempeñar un papel importante en la adquisición de la diferenciación celular final (Dekker et al., 1994; Wei et al., 1989). Todas estas consideraciones se trasladarían a los patrones de expresión de *Cyp1B1* previamente descritos en el desarrollo del oído interno del pollo (Cardeña-Núñez el al., 2020).

En este contexto molecular, otras vías de señalización podrían considerarse. Con respeto a la superfamilia TGF, existe una regulación mutua entre estos factores morfogenéticos y la expresión de otras vías de señalización (Di Renzo et al., 2009; Nugent et al., 1994, 1995). En el oído interno en desarrollo, el AR puede suprimir la transcripción de *Bmp4*, un miembro de la subfamilia BMP de los TGF, bloqueando el desarrollo de los canales semicirculares en dosis bajas, mientras que los epitelios sensoriales son aparentemente perturbados a dosis más altas (Thompson et al., 2003). Para estudiar mejor el posible papel de CRABP-I en el oído interno en desarrollo, debería considerarse el mecanismo de señalización de ERK (Wei, 2016).

7.2.3. ESPECIFICACIÓN DE LA PAPILLA BASILAR POR LA PROTEINA CRABP-I.

El sistema auditivo del oído interno se desarrolla a partir de la porción ventral del primordio ótico. El primordio de la papila basilar, el elemento sensorial auditivo, se encuentra en la pared medial del conducto coclear. En el ratón, el análisis mediante *western blot* en la cóclea muestra que la proteína CRABP está presente desde E14,5 dpc (después de la concepción) hasta el día 1 postnatal (Kelley et al., 1993). El estudio de la distribución de las transcritos de *CRABP-I* durante la embriogénesis confirma que su expresión está restringida al órgano de Kölliker en dos bandas de expresión, mientras que ninguna expresión se detecta en el órgano de Corti vecino (Romand et al., 2000; véase también Dollé et al., 1990). Varios estudios confirman la ausencia de expresión de *CRABP-I* en el epitelio sensorial adulto de los mamíferos (Romand et al., 2000; Kelley et al., 1993; Ylikoski et al., 1994).

En nuestros resultados de la etapa de vesícula ótica, el territorio presuntivo de la papila basilar fue teñido por altos niveles de expresión de *CRABP-I*. Esta área se

encuentra caudal a la mácula del saculo, que estaba desprovista de expresión de *CRABP-I*, y rostral a la cresta posterior que presentaba menor expresión. Las diferentes cantidades de transcriptos de *CRABP-I* en estas áreas sensoriales incipientes podrían ser relevantes para sus primeras especificaciones individuales mediadas por actividad del AR, es decir, equilibrar las dosis elevadas de AR (actividad de enzimas RALDH3 y CYP1B1), secuestro (actividad de la proteína CRABP-I) y degradación (actividad de las enzimas CYP26s). La actividad de CRABP-I también sería significativa a medida que progresa el desarrollo, ya que los niveles relativos de expresión de *CRABP-I* también han sido observados en los estadios HH24 y HH27 en estos tres elementos sensoriales (mácula del sáculo, papila basilar y cresta posterior). En la última etapa de desarrollo, HH27, es notable que la ya identificable mácula lagena, desarrollada al final del conducto coclear, es negativa para *CRABP-I*. La mácula de la lagena, que puede originarse de una subdivisión de la primordial área de la papila basilar (Sánchez-Guardado et al., 2013, 2014), también podría estar mediada por la acción del AR (Sánchez-Guardado et al., 2009; Cardeña-Núñez et al., 2020; véase Romand et al., 2006b para el oído interno de ratón).

El análisis detallado de la papila basilar en desarrollo muestra que este elemento sensorial auditivo presenta expresiones heterogéneas del gen *CRABP-I*. En la etapa HH24, se observaron tres niveles de expresión de *CRABP-I*: niveles más altos en su porción rostral, niveles intermedios en su porción más caudal y una pequeña área entre los dos con niveles menores o casi indetectables. En el estadio HH27, la papila basilar mostró un gradiente de expresión de *CRABP-I* rostro-caudal. Estos diferentes niveles de ARNm de *CRABP-I* sugieren que su parte rostral es más sensible al efecto del AR. En este sentido, es interesante observar que, en el estadio HH27, *Raldh3* se expresa en una banda estrecha en la parte más caudal de la pared del conducto coclear distal, no cerca de la papila basilar. La banda de expresión de *Raldh3* dorsoventralmente alineada aparece contigua y caudal al elemento sensorial auditivo en HH32 (Sánchez-Guardado et al., 2009). En cuanto a la actividad de la enzima CYP1B1, que también genera AR, la papila muestra un gradiente decreciente de rostral a caudal de la expresión *Cyp1B1* en el estadio HH32 (Cardeña-Núñez et al., 2020). Este hallazgo sugiere que CRABP-I puede proteger la porción más rostral de la papila basilar del AR producida por la actividad del

CYP1B1 en lugar de la enzima RALDH3. Estos gradientes bien podrían ser coherentes con un gradiente de diferenciación celular en el desarrollo de elementos sensorial auditivo.

7.2.4. CRABP-I Y LA NEUROGÉNESIS ÓTICA.

El AR tiene gran relevancia para la diferenciación y migración neuronal (Holder y Hill, 1991; Jacobs et al., 2006; Bonnet et al., 2008; Radosevic et al., 2011; Nakano et al., 2020; Crandall et al., 2011). La especificación de los neuroblastos óticos es un evento de diferenciación celular significativo el oído interno en desarrollo de vertebrados para formar los ganglios acústicos y vestibulares (Sánchez-Calderón et al., 2007b; Alsina et al., 2004), cuyas neuronas proyectan sus axones hacia el epitelio ótico en desarrollo para inervar todos los elementos sensoriales con unos patrones de conexión ordenados (Fritzsch 2003; Sánchez-Guardado et al., 2019). En la etapa de vesícula ótica, el área neurogenética se ha atribuido a la pared anteroventral (Álvarez et al., 1989), un dominio definido por las expresiones de marcadores tales como *Neurog1* y *NeuroD/M* (Wu y Kelley, 2012; Groves et al., 2013). En el oído interno en desarrollo, la alteración de la señal del AR reduce la expresión de *NeuroD* en la pared anteromedial del otocisto (Bok et al., 2011), un efecto similar al observado en cultivos de células madre neuronales derivadas del hipocampo (Takahasi et al., 1999). Nuestros resultados mostraron una fuerte expresión de *CRABP-I* en el área presuntiva de la mácula del utrículo, donde la mayoría de los neuroblastos óticos se generan (Satoh y Fekete DM, 2005). En la generación de neuroblastos también participa la mácula del sáculo adyacente (Raft y Groves, 2015). En el oído interno del pollo, la mácula del sáculo en desarrollo estaba desprovista de expresión de *CRABP-I*. Por ello, diferentes cantidades intracelulares de CRABP-I y, por lo tanto, con diferentes acciones del AR, podrían regular el origen de subpoblaciones de neuroblastos óticos. Este hallazgo podría encajar bien con un vínculo temporal entre las especificaciones neuronales vestibular/acústica y las especificaciones del destino macular del utrículo/século (Deng y Wu, 2016). El posible papel de CRABP-I en la neurogénesis ótica también estaría en línea con su implicación sugerida en la diferenciación y migración de neuronas en el tejido ótico en desarrollo de pollo (Propping et al., 2007). Además, CRABP-I podría ser una proteína candidata para mediar

las transiciones de mesénquimas a epitelios (Bard et al., 2008), un acontecimiento clave en la neurogénesis ótica (Álvarez et al., 1989). Se necesitan estudios experimentales para determinar si posibles cambios en la expresión de *CRABP-I* son decisivos para la diferenciación y delaminación de los neuroblastos (Kleinjan et al., 1997; Akama et al., 2013).

7.2.5. CRABP-I EN EL DESARROLLO DEL MESENQUIMATOSO PERIÓTICO.

La interacción tisular epitelio-mesénquima se considera esencial para la formación del oído interno, que implicaría la vía de señalización del AR (Romand et al., 2006b; Frenz et al., 2010; Braunstein et al., 2009; Monks y Morrow, 2012). En este aspecto, las proteínas de unión a retinoides celulares, en particular las CRABP, desempeñarían un papel importante, como se ha demostrado en la organogénesis de los ratones (Dollé et al., 1990). Nuestros resultados mostraron expresión de *CRABP-I* en el mesénquima periótico (véase también Deng y Wu, 2016), lo que sugiere su implicación en la especificación de áreas discretas de este tejido y en la formación de la futura cápsula ótica. Debido a la proximidad de estas áreas mesenquimales, *CRABP-I* positivas, al laberinto membranoso en desarrollo, las proteínas CRABP-I podrían estar implicadas en la interacción epitelio-mesénquima, mediante la regulación de la actividad del AR en el desarrollo del oído interno. Es particularmente notable que en el oído interno embrionario de ratón los tres genes de *Raldhs* se expresan sólo en el epitelio ótico, excluyendo el mesénquima periótico (Romand et al., 2006b), similar al caso observado para la expresión de *Raldh3* de pollo (Sánchez-Guardado et al., 2009). Sin embargo, la expresión *aldh1a2* en pez cebra está presente en este último tejido (Pittlik et al., 2008). Con respecto al oído interno de las aves, no hay, por lo tanto, ninguna fuente de AR presente en el mesénquima periótico distinta de la correspondiente a la actividad de CYP1B1 (Cardeña-Núñez et al., 2020). Así, se detectó una fuerte expresión de *Cyp1B1* entre el epitelio óptico y el cerebro posterior en todas las etapas analizadas, destacando especialmente el caso del mesénquima cerca de la pared del conducto coclear. Las enzimas CYP26s y receptores del AR, RAR, así como otros

miembros de la vía de señalización del AR, también puede desempeñar un papel clave en estos eventos interactivos (para una revisión, véase Romand et al., 2006b).

7.3. POSIBLE PAPELS DE LAS ENZIMAS CYP26A1, CYP26B1 Y CYP26C1 EN LA ESPECIFICACIÓN DEL EPITELIO ÓTICO.

Los resultados preliminares ilustran que, en el embrión temprano, las enzimas CYP26s se requieren colectivamente para limitar la actividad del AR y permitir que se produzcan patrones adecuados y morfogénesis (Pennimpede et al., 2010). Este estudio proporciona una descripción detallada de los patrones de expresión de los ARNm de los genes *Cyp26*s en el desarrollo del oído interno de aves.

7.3.1. CYP26 Y LA PLACODA ÓTICA: INDUCCIÓN Y REGIONALIZACIÓN.

La enzima Cyp26A1 está fuertemente expresada en la porción caudal del cerebro posterior durante la extensión del eje antero-posterior durante la embriogénesis temprana (MacLean et al., 2001), donde juega un papel crítico en la prevención de la exposición prematura producida por la actividad de RALDH2 en los somitas vecinos (Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001; Niederreither y Dolle, 2008). El gen *Cyp26A1* también se expresa en la parte rostral del epiblasto anterior y en la placa neural durante el desarrollo temprano, y luego específicamente en el rombómero 2 del cerebro posterior (Fujii et al., 1997), lo que indica que la enzima CYP26A1 también protege las regiones del tubo neural rostral temprano de los efectos posteriorizantes del AR (Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001). Los experimentos con mutantes nulos para *Cyp26A1* llevan a la conclusión de que los defectos fenotípicos observados en el momento de la pérdida de la función de *CYP26A1* se deben al aumento de los niveles del AR en el embrión, y no a la ausencia de un metabolito funcional generado por la oxidación mediada por *CYP26A1* (Pennimpede et al., 2010). La expresión del gen *Cyp26C1* también se detecta en el mesénquima anterior y en la placa neural del embrión de ratón, aunque ligeramente más tarde que el *Cyp26A1*, y posteriormente en los rombómeros 2 y 4 del rombecéfalo (Tahayato et al., 2003; Uehara et al., 2007).

Debido a que la enzima Cyp26C1 cataboliza el AR en compuestos mayormente inactivos y se expresa en el mesodermo, es de gran interés determinar su relación espacial con *Raldh2*, la enzima que genera el AR en el mesodermo. La expresión de *Cyp26C1* es mucho más extensa en el embrión del pollo que en los embriones de ratón, y comienza mucho antes (Reijntjes et al., 2004). En el estadio HH14, *Cyp26C1* se expresa en el mesénquima cefálico derivado de la cresta neural adyacente al cerebro posterior, tanto post-ótico como pre-ótico. En el estadio HH15, el dominio de la expresión mesenquimal pre-ótica ha comenzado a contraerse caudalmente y a concentrarse alrededor de la vesícula ótica. En el estadio HH18, la expresión del mesénquima del cerebro posterior se ha concentrado en dos regiones discretas: rostral y caudal a la vesícula ótica. También se reveló en las secciones un nuevo dominio de *Cyp26C1* en el cuadrante ventral de la vesícula ótica (Reijntjes et al., 2004). En este sentido, la función principal de los *Cyp26*s es proteger los tejidos de la exposición excesiva al AR (Niederreither et al., 2002). El aumento general de los niveles de AR más tarde en el desarrollo, junto con la brusca disminución de la regulación de los *Cyp26*s, también sugiere que las células totalmente diferenciadas son más resistentes a la exposición excesiva al AR que las células indiferenciadas o inmaduras (Romand et al., 2006a). Nuestros resultados en el desarrollo del oído interno de aves confirman estos hallazgos.

7.3.2. PAPEL DE LAS ENZIMAS CYP26S EN LA DIFERENCIACIÓN DE DOMINIOS EPITELIALES.

El equilibrio local entre las actividades de *Raldh* y *Cyp26s* puede ser responsable de la distribución asimétrica del AR en algunas estructuras en desarrollo, como la retina embrionaria (McCaffery et al., 2000). Cuando se comparan las expresiones de los genes *Raldhs* con los *Cyp26s*, parece que las áreas *Raldh*-positivas de los epitelios en la región ventrolateral del esbozo ótico delimitan un dominio rodeado por una amplia región mesenquimal que expresa las enzimas metabolizadoras CYP26s. Esto sugiere que los niveles de AR deben ser estrictamente controlados en el epitelio ótico. Una posibilidad es que las regiones *Cyp26s* positivas metabolicen el AR que de otra manera podría

difundirse hacia el mesénquima, impidiendo así que el AR llegue a este tejido. Sin embargo, hay observaciones que indican que el AR es importante para la condensación del mesénquima periótico (Frenz y Liu, 1997).

Otra posibilidad es que las enzimas metabolizadoras puedan restringir la señalización del AR en las células que residen en el epitelio del oído interno. Es posible que la función de los *Cyp26s* sea prevenir la afluencia de AR desde fuera del otocisto, de modo que el otocisto pueda funcionar como un sistema cerrado sin necesidad de AR externo durante el desarrollo temprano. En esta línea de evidencia, Choo y colaboradores (1998) demostraron que el tratamiento con AR resultó en una embriopatía del otocisto, presumiblemente debido a una modificación transitoria de su distribución endógena en algunas partes del oído interno embrionario. En este sentido, un estudio que utilizó un reportero transgénico lacZ de sensibilidad al AR reveló que las enzimas *CYP26s* pueden actuar como inhibidores locales de la señalización del AR. En este estudio, se demostró que la actividad de lacZ está ausente en una franja de la retina embrionaria donde se expresan los genes *Cyp26s* durante el desarrollo (Choo et al., 1998; Sakai et al., 2004). Sin embargo, cuando los embriones se exponen al AR exógeno, la banda lacZ negativa se borra transitoriamente y también se observa una intensa expresión de lacZ en regiones adyacentes (Luo et al., 2004). Se concluyó que el exceso de AR anula la capacidad metabolizadora de las enzimas CYP26s, lo que resulta en la activación ectópica de la señalización del AR en la retina. Una función similar de las enzimas CYP26s puede ser necesaria para limitar la señalización del AR en el epitelio coclear presuntivo, donde podría actuar para la especificación del destino celular o la diferenciación sensorial coclear.

Una tercera posibilidad, que no puede descartarse formalmente, es que la actividad de las enzimas *CYP26s* pueda llevar a la producción, de forma específica para cada región, de nuevos metabolitos activos de AR como el 4-oxo RA (Pijnappel et al., 1993; Achkar et al., 1996). Sin embargo, hasta ahora no ha habido evidencia genética de la función de estos compuestos “alternativos" del AR en el ratón (Sakai et al., 2001; Abu-Abed et al., 2001; Niederreither et al., 2002).

En el oído interno en desarrollo de los embriones de ratón, el AR muestra una retirada gradual de la capacidad de respuesta del AR, primero del tejido ótico anterior y luego del tejido ótico posterior, lo que es una consecuencia probable del desplazamiento caudal de los límites de la expresión de *Raldh2* y los *Cyp26s* dentro del mesénquima subyacente al epitelio ótico en desarrollo (Sirbu et al., 2005). Utilizando la hibridación *in situ* durante el desarrollo del oído interno del ratón, se encontró, en el estadio E9,5, una fuerte expresión de *Cyp26A1* en el mesénquima axial caudal y ventral al otocisto y en una región caudal restringida del epitelio ótico (Romand et al., 2006b). En E10,5, se observaron fuertes señales de *Cyp26A1* en los tejidos mesenquimales que rodean los dominios laterales y ventrales del otocisto, así como en el epitelio ótico ventral que da origen al epitelio coclear. Dos días después, la expresión de *Cyp26A1* permaneció fuerte en el mesénquima que rodea todos los canales semicirculares y la región ventral del otocisto (Romand et al., 2006b).

En el estadio E9,5, la expresión de *Cyp26B1* era alta en las células del cerebro posterior de los rombómeros 5 y 6, que están adyacentes al otocisto (MacLean et al., 2001). Los genes se expresaron débilmente en la mitad dorsal del epitelio ótico. En E10,5, los dominios de expresión de *Cyp26B1* en el epitelio del otocisto eran mucho más restringidos en comparación con los del gen *Cyp26A1*. Los transcriptos de gen *Cyp26B1* estaban presentes en dos regiones focales correspondientes al epitelio sensorial coclear prospectivo y la parte lateral del epitelio ótico opuesto al epitelio sensorial vestibular prospectivo. En E12.5, *Cyp26B1* se expresó en una pequeña región del epitelio sensorial vestibular y en el mesénquima que rodea el canal semicircular horizontal. En etapas que van de E14,5 a E18,5, las señales *Cyp26B1* se limitaron a los epitelios sensoriales en el sáculo, el utrículo, las crestas y la cóclea. El nivel significativamente más alto de *Cyp26s* en una etapa temprana del desarrollo sugiere que restringir el AR a regiones altamente localizadas es esencial para los eventos morfogenéticos y organogénicos normales (Romand et al., 2006a).

Estudios previos durante el desarrollo del oído interno aviar mostraron que el *Cyp26C1* se expresa en ectodermo periótico rostral, pero no caudal (Blentic et al., 2003; Reijntjes et al., 2004). En el estadio E9,5 de ratón, la expresión de *Cyp26C1* se ve desde

el mesénquima cervical caudal a la vesícula ótica, cuya expresión era más fuerte que la del gen *Cyp26A1*. En E10,5, se describió una expresión de *Cyp26C1* restringida regionalmente en el epitelio del otocisto, en oposición al conducto endolinfático en desarrollo y adyacente a las células mesenquimales teñidas. La expresión débil persistió en parte del epitelio del oído interno (cóclea) en E12,5. Esta expresión fue casi completamente suprimida en E14,5 (Tahayato et al., 2003).

7.3.3. DIFERENCIACIÓN TERRITORIAL DEL CONDUCTO ENDOLINFÁTICO POR LAS ENZIMAS CYP26S.

En embriones de ratón de estadio E14,5, los transcriptos de *Cyp26A1* se confinaron al conducto endolinfático, los tejidos que rodean la membrana redonda de la ventana y debajo del epitelio sensorial en el sáculo. En la región coclear, el *Cyp26A1* sólo estaba presente en el epitelio coclear. Sin embargo, en el estadio E18,5, no se detectaron transcriptos de *Cyp26A1* en el oído interno, excepto en el conducto endolinfático (Romand et al., 2006b). Estos resultados se equiparan con los nuestros, en los que se puede apreciar que el gen *Cyp26A1* es el único con una clara presencia en el conducto endolinfático durante todas las etapas de desarrollo del oído interno analizadas.

7.3.4. DIFERENCIACIÓN DE ELEMENTOS SENSORIALES POR *CYP26S*.

En referencia al trabajo de Luo y colaboradores anteriormente mencionados, (2004), nuestros resultados muestran que los tres genes *Cyp26s* se expresan en la región caudal del otocisto, incluyendo el elemento sensorial auditivo de aves, la papila basilar, siendo los genes *Cyp26A1* y *Cyp26C1* los que presentan un marcaje más extenso, mientras que *Cyp26B1* muestra un marcaje más limitado a los elementos sensoriales. Dichas expresiones se van restringiendo a lo largo del desarrollo, de tal manera que, en el último estadio analizado, tan sólo el gen *Cyp26B1* aparece expresado en la papila basilar. En nuestros resultados, es también destacable observar como el gen *Cyp26B1* se va restringiendo cada vez más hacia zonas sensoriales como las crestas o al epitelio entre las máculas del utrículo y el sáculo. Y el gen *Cyp26C1* se suma a esta tendencia,

sobre todo en el último estadio analizado (HH34). No deja de ser interesante destacar, ya que en las primeras etapas del desarrollo los genes que mostraban una mayor semejanza de expresión correspondían a los genes *Cyp26A1* y *Cy26C1*. Habría que estudiar si este cambio de comportamiento en la expresión tiene que ver con un cambio en la expresión de las diferentes enzimas RALDHs.

A medida que descifremos más el papel de las enzimas CYP26s en la protección de determinadas células/tejidos del AR ectópico, obtendremos una mejor comprensión del papel del AR y de su mecanismo de acción dentro de determinados tipos de células. Esto requerirá nuevas herramientas que permitan evaluar en tiempo real las relaciones entre las CYP26s y la señalización del AR, así como el desarrollo de terapias retinoides más específicas con menor probabilidad de consecuencias teratogénicas.

CONCLUSIONES GENERALES

8. CONCLUSIONES GENERALES

El AR es una molécula difusible eficaz producida por el metabolismo del retinol que gobierna diversos eventos biológicos, tales como especificación, diferenciación y morfogénesis durante etapas embrionarias y postnatales, con áreas afectadas sensibles a diferentes umbrales del AR.

8.1. *CYP1B1*.

El gen *Cyp1B1* se postula como una vía alternativa de síntesis de AR que mantiene relación con otros elementos de la cascada de señalización y que permitiría un control más preciso de los niveles de esta molécula en los tejidos en desarrollo.

8.2. *CRABP*.

La proteína CRABP-I pueden ser necesaria para prevenir los efectos del AR; células y tejidos con mayor sensibilidad al AR muestran niveles más fuertes de expresión *CRABP-I*. La expresión heterogénea de *CRABP-I* observada en el epitelio ótico en desarrollo es consistente con esta hipótesis. Así, la proteína CRABP-I podrían regular la actividad del AR en el desarrollo del sistema endolinfático, que tiene altos niveles de la enzima RALDH3.

En relación con la especificación de los elementos sensoriales, la mayoría de los cuales se desarrollan de una banda antero-posterior de expresión de *Fgf10* observada en la vesícula ótica ventromedial, los diferentes niveles de la expresión de *CRABP-I* a lo largo de este dominio pro-sensorial podrían determinar la localización exacta de cada elemento sensorial derivado de él. Así, los territorios presuntivos de la mácula de utrículo y la papila basilar mostraron expresión de *CRABP-I* más fuerte, mientras que la mácula de sáculo, localizada entre ellos, no mostró expresión de *CRABP-I*. Las crestas anterior y posterior, que se desarrollan en los extremos de la banda *Fgf10*-positiva,

expresan niveles intermedios de expresión de *CRABP-I* en el estadio de la vesícula ótica y ninguna expresión en la siguiente etapa que se está considerando. Estas diferencias podrían reflejar diferentes grados de sensibilidad al AR durante su especificación inicial y diferenciación final. Consideraciones similares se podrían tener en cuenta durante el desarrollo del ganglio acústico-vestibular y el mesénquima periótico.

8.3. *CYP26s*.

Las enzimas CYP26s son un claro ejemplo de control interno de exposición a una molécula altamente activa durante la morfogénesis y diferenciación como el ácido retinoico, principalmente en los estadios más tempranos, y por ende, más vulnerables a su acción teratogénica. Parece que la misión de estas enzimas consiste en crear una barrera protectora contra el AR exógeno proveniente del mesénquima circundante al epitelio ótico.

REFERENCIAS GENERALES

1. REFERENCIAS GENERALES.

Abelló G, Alsina B. (2007) Establishment of a proneural field in the inner ear. Int J Dev Biol 51: 483-493.

Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. (2001) The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. Genes Dev 15 (2), 226-240.

Abu-Abed S, MacLean G, Fraulob V, Chambon P, Petkovich M, Dolle P. (2002) Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. Mech Dev 110: 173-177.

Achkar CC, Derguini F, Blumberg B, Langston A, Levin AA, Speck J, Evans RM, Bolado J Jr, Nakanishi K, Buck J, Gudas LJ. (1996) 4-Oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 93 (10): 4879-4884.

Akama K, Horikoshi T, Nakayama T, Otsu M, Imaizumi N, Nakamurae M, Todae T, Inuma M, Hirano H, Kondo Y, Sizuki Y, Inoue N. (2013) Proteomic identification of differentially expressed genes during differentiation of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) embryonic stem cells to astrocyte progenitor cells in vitro. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1834 (2): 601-610.

Allenby G, Bocquel M-T, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo J, Chambon P, Levin A. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. Proc Natn Acad Sci USA 90: 30-34.

Allodi I, Hedlund E. (2014) Directed midbrain and spinal cord neurogenesis from pluripotent stem cells to model development and disease in a dish. Front Neurosci 20; 8: 109.

Alsina B, Abelló G, Ulloa E, Henrique D, Pujades C, Giraldez F. (2004) FGF signalling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo. Dev Biol 267(1): 119-34.

Alsina B, Giraldez F, Pujades C. (2009) Patterning and cell fate in ear development. Int J Dev Biol 53: 1503-1513.

Alsina B, Whitfield TT. (2017) Sculpting the labyrinth: Morphogenesis of the developing inner ear. Semin Cell Dev Biol. 65: 47-59.

Altman J, Bayer AB. (1982) Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. Springer Verlag New York.

Álvarez IS. (1988) Estudio estructural y morfométrico de las primeras fases del desarrollo del embrión de pollo. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

Álvarez IS, Martín-Partido G, Rodriguez-Gallardo L, González-Ramos C, Navascués J. (1989) Cell proliferation during early development of the chick embryo otic anlage: quantitative comparison of migratory and nonmigratory regions of the otic epithelium. J Comp Neurol 290 (2): 278-288.

Álvarez IS, Navascués J. (1990) Shaping, invagination, and closure of the chick embryo otic vesicle: scanning electron microscopic and quantitative study. Anat Rec 228: 315–326.

Alvarez Y et al. (2003) Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. Development 130 (25): 6329-6338.

Aström A, Tavakkol A, Pettersson U, Cromie M, Elder JT, Voorhees JJ. (1991) Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). J Biol Chem 17: 662-666.

Badeeb OM, Micheal S, Koenekoop RK, den Hollander AI, Hedrawi MT. (2014) CYP1B1 mutations in patients with primary congenital glaucoma from Saudi Arabia. BMC Med Genet 28; 15: 109.

Baldwin WS, Marko PB, Nelson DR. (2009) The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. BMC Genomics 10, 169.

Balmer JE, Blomhoff R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. J Lipid Res 43: 1773-1808.

Barald KF, Kelley MW. (2004) From placode to polarization: new tunes in inner ear development. Development 131 (17): 4119-4130.

Bard JB, Lam MS, Aitken S. (2008) A bioinformatics approach for identifying candidate transcriptional regulators of mesenchyme-to-epithelium transitions in mouse embryos. Dev Dyn 237(10): 2748-2754.

Basch ML, Brown RM, Jen HI, Groves AK. (2016) Where hearing starts: the development of the mammalian cochlea. J Anat 228(2): 233-254.

Bejjani BA, Xu L, Armstrong D, Lupski JR, Reneker LW. (2002) Expression patterns of cytochrome P4501B1 (Cyp1b1) in FVB/N mouse eyes. Exp Eye Res 75: 249-257.

Benbrook DM, Chambon P, Rochette-Egly C, Asson-Batres MA. (2014) History of retinoic acid receptors. Subcell Biochem 70: 1-20.

Bhattacharyya KK, Brake PB, Eltom SE, Otto SA, Jefcoate CR. (1995) Identification of a rat adrenal cytochrome P450 active in polycyclic hydrocarbon metabolism as rat CYP1B1. Demonstration of a unique tissue-specific pattern of hormonal and aryl hydrocarbon receptor-linked regulation. J Biol Chem 270: 11595-11602.

Blentic A, Gale E, Maden M. (2003) Retinoic acid signalling centers in the avian embryo identified by sites of expression of synthesizing and catabolizing enzymes. Dev Dyn 227: 114-127.

Blomhoff R, Blomhoff HK. (2006) Overview of retinoic metabolism and function. J Neurobiol 66: 606-630.

Blomhoff R, Gree MH, Berg T, Norum KR. (1990) Transport and storage of vitamin A. Science 250: 339-404.

Boddupalli CS, Bar N, Kadaveru K, Krauthammer M, Pornputtapong N, Mai Z, Ariyan S, Narayan D, Kluger H, Deng Y, Verma R, Das R, Bacchiocchi A, Halaban R, Sznol M, Dhodapkar MV, Dhodapkar KM (2016) Interlesional diversity of T cell receptors in melanoma with immune checkpoints enriched in tissue-resident memory T cells. JCI Insight. 1 (21): e88955.

Bonnet E, Touyarot K, Alfos S, Pallet V, Higueret P, Abrous DN. (2008) Retinoic Acid Restores Adult Hippocampal Neurogenesis and Reverses Spatial Memory Deficit in Vitamin A Deprived Rats. PLoS ONE 3: e3487.

Bok J, Chang W, Wu DK. (2007). Patterning and morphogenesis of the vertebrate inner ear. Int. J Dev Biol 51: 521-533.

Bok J, Raft S, Kong KA, Koo SK, Drager UC, Wu DK. (2011) Transient retinoic acid signalling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. Proc Natl Acad Sci USA 108: 161-166.

Boylan JF, Gudas LJ. (1991) Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. J Cell Biol 112: 965-979.

Boylan JF, Gudas LJ. (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. J Biol Chem 267 (30): 21486-21491.

Braunstein EM, Monks DC, Aggarwal VS, Arnold JS, Morrow BE. (2009) Tbx1 and Brn4 regulate retinoic acid metabolic genes during cochlear morphogenesis. BMC Dev Biol. 9: 31.

Brigande JV, Kiernan AE, Gao X, Iten LE, Fekete DM. (2000) Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: do compartment boundaries play a role? Proc Natl Acad Sci USA 97: 11700-11706.

Budhu AS, Noy N. (2002) Direct channelling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. Mol. Cell. Biol. 22: 2632-2641.

Bushue N, Wan YJY. (2010) Retinoid pathway and cancer therapeutics. Adv Drug Deliv Rev. 62 (13): 1285-98.

Buters JT, Sakai S, Richter T, Pineau T, Alexander DL, Savas U, Doehmer J, Ward JM, Jefcoate CR, Gonzalez FJ. (1999) Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. Proc Natl Acad USA 96: 1977.

Cadot S, Frenz D, Maconochie M. (2012) A novel method for retinoic acid administration reveals differential and dose-dependent downregulation of Fgf3 in the developing inner ear and anterior CNS. Dev Dyn 241: 741-758.

Cai AQ, Radtke K, Linville A, Lander AD, Nie Q, Schilling TF. (2012) Cellular retinoic acid-binding proteins are essential for hindbrain patterning and signal robustness in zebrafish. Development 139: 2150-2155.

Cardeña-Núñez S, Hidalgo-Sánchez M, Sánchez-Guardado LÓ. (2013) "Especificación del epitelio ótico por los genes Irx". Trabajo presentado por Sheila Cardeña Núñez, Licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al título de Licenciada con Grado. Universidad de Extremadura.

Cardeña-Núñez S, Sánchez-Guardado LÓ, Corral-San-Miguel R, Rodríguez-Gallardo L, Marín F, Puelles L, Aroca P, Hidalgo-Sánchez M. (2016) Expression patterns of Irx genes in the developing chick inner ear. Brain Struct Funct 222 (5): 2071-2092.

Cardeña-Núñez S, Sánchez-Guardado L.Ó, Hidalgo-Sánchez M. (2020) Cyp1B1 Expression Patterns in the Developing Chick Inner Ear. Dev Dyn 249: 410-424.

Carney PR, Silver J. (1983) Studies on cell migration and axon guidance in the developing distal auditory system of the mouse. J Comp Neurol. 215 (4): 359-369.

Chambers D, Wilson L, Maden M, Lumsden A. (2007) RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. Development 134: 1369-1383.

Chatterjee S, Kraus P, Lufkin T. (2010) A symphony of inner ear developmental control genes. BMC Genet 11: 68.

Chavarria-Soley G, Sticht H, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Pasutto F, Reis A, Rautenstrauss B. (2008) Mutations in CYP1B1 cause primary congenital glaucoma by reduction of either activity or abundance of the enzyme. Hum Mutat 29 (9): 1147-1153.

Chen AC, Yu K, Lane MA, Gudas LJ. (2003) Homozygous deletion of the CRABPI gene in AB1 embryonic stem cells results in increased CRABPII gene expression and decreased intracellular retinoic acid concentration. Arch Biochem Biophys 411: 159-173.

Chen H, Howald WN, Juchau MR. (2000) Biosynthesis of all-transretinoic acid from all-trans-retinol: Catalysis of all-trans-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. Drug Metab Dispos 28, 315-322.

Chen J, Streit A. (2013) Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors. Hear Res 297: 3-12.

Chithalen JV, Luu L, Petkovich M. (2002) HPLC-MS/MS analysis of the products generated from all-trans-retinoic acid using recombinant human CYP26A. J Lipid Res 43(7): 1133-1142.

Choo D, Sanne JC, Wu DK. (1998) The differential sensitivities of inner ear structures to retinoic acid during development. Dev. Biol 204: 136-150.

Choudhary D, Jansson I, Schenkman JB, Sarfarazi M, Stoilov I. (2003) Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. Arch Biochem Biophys 414: 91-100.

Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. (2004) Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1. Drug Metab Dispos 32 (8): 840-847.

Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. (2005) Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. Arch Biochem Biophys 436: 50-61

Christou M, Savas U, Schroeder S, Shen X, Thompson T, Gould MN, Jefcoate CR. (1995) Cytochromes CYP1A1 and CYP1B1 in the rat mammary gland: cell-specific expression and regulation by polycyclic aromatic hydrocarbons and hormones. Mol Cell Endocrinol 115: 41-50.

Chytil F, Stump DG. (1991) Cellular retinoic acid- and retinol binding proteins. In Retinoids: 10 years on. J. H. Saurat: 38-45.

Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M. (2000) Signalling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. Dev Biol 217 (1): 10-24.

Cohlan SQ. (1953) Excessive intake of vitamin A during pregnancy as a cause of congenital anomalies in the rat. AMA Am J Dis Child 86 (3): 348-349.

Cohlan SQ. (1954) Congenital anomalies in the rat produced by excessive intake of vitamin A during pregnancy. Pediatrics 13 (6): 556-567.

Collins CA, Watt FM. (2008) Dynamic Regulation of Retinoic Acid-Binding Proteins in Developing, Adult and Neoplastic Skin Reveals Roles for Beta-Catenin and Notch Signalling. Dev Biol 324: 55-67.

Collins MD, Mao GE. (1999) Teratology of retinoids. Annu Rev Pharmacol Toxicol 39: 399-430.

Crandall JE, Goodman T, McCarthy DM, Duester G, Bhide PG, Dräger UC, McCaffery P. (2011) Retinoic Acid Influences Neuronal Migration from the Ganglionic Eminence to the Cerebral Cortex. J Neurochem 119: 723-735.

de Bruijn DR, Oerlemans F, Hendriks W, Baats E, Ploemache RR, Wieringa B, van Kessel AG. (1994) Normal development, growth and reproduction in cellular retinoic acid binding protein-I (CRABPI) null mutant mice. Differentiation 58 (2): 141-148.

de Roos K, Sonneveld E, Compaan B, ten Berge D, Durston AJ, van der Saag PT. (1999) Expression of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) during mouse and *Xenopus laevis* embryogenesis. Mech Dev 82:205-211.

Dejong CA, Wilson JY. (2014) The cytochrome P450 superfamily complement (CYPome) in the annelid Capitella teleta. PLoS One 9, e107728.

Dekker EJ, Vaessen MJ, van den Berg C, Timmermans A, Godsave S, Holling T, Nieuwkoop P, van Kessel AG, Durston A. (1994) Overexpression of a cellular retinoic acid binding protein (xCRABP) causes anteroposterior defects in developing Xenopus embryos. Development 120: 973-985.

Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C. (1999) Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. Mol Cell Biol 19: 7158-7167.

Dencker L, Annerwall E, Busch C, Eriksson U. (1990) Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. Development 110: 343-352.

Deng X, Wu DK. (2016) Temporal Coupling between Specifications of Neuronal and Macular Fates of the Inner Ear. Dev Biol 414: 21-33.

Di Renzo F, Corsini E, Broccia ML, Marinovich M, Galli CL, Giavini E, Menegola E. (2009) Molecular Mechanism of Teratogenic Effects Induced by the Fungicide Triadimefon: Study of the Expression of TGF-MRNA and TGF- and CRABPI Proteins during Rat in Vitro Development. Toxicol Appl Pharmacol 234: 107-116.

Díez-del-Corral R, Olivera-Martínez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. (2003) Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. Neuron 40: 65-79.

Diaz-Hernandez ME, Bustamante M, Galvan-Hernandez CI, Chimal-Monroy J. (2013) Irx1 and Irx2 are coordinately expressed and regulated by retinoic acid, TGFbeta and FGF signaling during chick hindlimb development. PLoS One 8: e58549.

Dollé P, Ruberte E, Leroy P, Morriss-Kay G, Chambon P. (1990) Retinoic acid receptors and cellular binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. Development 110: 1133-1151.

Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. (1999). Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signalling by retinoic acid. J. Biol. Chem. 274: 23695-23698

Donovan M, Olofsson B, Gustafson A-L, Dencker L, Eriksson U. (1995) The Cellular Retinoic Acid Binding Proteins. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 53 (1-6): 459-465.

Doshi M, Marcus C, Bejjani BA, Edward DP. (2006) Immunolocalization of CYP1B1 in normal, human, fetal and adult eyes. Exp Eye Res 82: 24-32.

Dubey A, Rose RE, Jones DR, Saint-Jeannet JP. (2018) Generating retinoic acid gradients by local degradation during craniofacial development: One cell's cue is another cell's poison. Genesis 56 (2).

Duester G, Mic FA, Molotkov A. (2003) Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retilnaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. Chem Biol Interact 143-144: 201-210.

Durston AJ. (2015) Time, space and the vertebrate body axis. Seminars in Cell & Developmental Biology, Volume 42: 66-77.

Ealy M, Ellwanger DC, Kosaric N, Stapper AP, Heller S. (2016) Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. Proc Natl Acad Sci USA. 113 (30): 8508-8513.

Ebeid M, Huh SH. (2017) FGF signalling: diverse roles during cochlear development. BMB Rep. 50 (10): 487-495.

El-kady MA, Mitsuo R, Kaminishi Y, Itakura T. (2004a) cDNA cloning, sequence analysis and expression of 3-methylcholanthrene-inducible cytochromeP450 1B1 in carp (Cyprinus carpio). Environ Sci 11 (4): 231-40.

El-kady MA, Mitsuo R, Kaminishi Y, Itakura T. (2004b) Isolation of cDNA of novel cytochrome P450 1B gene, CYP1B2, from Carp (*Cyprinus carpio*) and its induced expression in gills. Environ Sci 11 (6): 345-354.

Fawcett D, Pasceri P, Fraser R, Colbert M, Rossant J, Giguere V. (1995) Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. Development 121: 671-679.

Fekete DM. (1996) Cell fate specification in the inner ear. Curr Opin Neurobiol 6: 533-541.

Fekete DM, Campero AM. (2007) Axon guidance in the inner ear. Int J Dev Biol 51: 549-556.

Fekete DM. (1997) Involvement of programmed cell death in morphogenesis of the vertebrate inner ear. Development 124(12): 2451-61.

Fekete DM, Wu DK. (2002) Revisiting cell fate specification in the inner ear. Curr Opin Neurobiol 12: 35-42.

Fiorella PD, Napoli JL. (1991) Expression of cellular RA binding protein in Escherichia coli: characterization and evidence that holoCRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. J Biol Chem 266 (16): 572-579.

Fiorella PD, Napoli JL. (1994) Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. J Biol Chem 269: 10538-10544

Frank D, Sela-Donenfeld D. (2019) Hindbrain induction and patterning during early vertebrate development. Cell Mol Life Sci. 76 (5): 941-960.

Frenz DA, Liu W. (1997) Effect of retinoic acid on otic capsule chondrogenesis in high-density culture suggests disruption of epithelial-mesenchymal interactions. Teratology 56 (4): 233-240.

Frenz DA, Liu W, Cvekl A, Xie Q, Wassef L, Quadro L, Niederreither K, Maconochie M, Shanske A. (2010) Retinoid signalling in inner ear development: a ''Goldilocks'' phenomenon. Am J Med Genet A 152A: 2947-2961.

Fritzsch B. (2003) Development of inner ear afferent connections: forming primary neurons and connecting them to the developing sensory epithelia. Brain Res Bull 60 (5-6): 423-433.

Fritzsch B, Elliott KL. (2017) Gene, cell, and organ multiplication drives inner ear evolution. Dev Biol 431 (1): 3-1.

Fujii H, Sato T, Kaneko S, Goto, O, Fujii-Kuriyam, Y, Osawa K, Kato S, Hamada H. (1997) Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. EMBO J 16 (14): 4163-4173.

Geelen JA. (1979) Hypervitaminosis A induced teratogenesis. CRC Crit Rev Toxicol 6 (4): 351-375.

Gerlach-Bank LM, Cleveland AR, Barald KF. (2004) DAN Directs Endolymphatic Sac and Duct Outgrowth in the Avian Inner Ear. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. 229: 219-230.

Giguère V, Lyn S, Yip P, Siu C, Amin S. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid binding protein. Proc Natn Acad Sci USA 87: 6233-6237.

Glover JC, Renaud JS, Rijli FM. (2006) Retinoic acid and hindbrain patterning. J Neurobiol 66: 705-725.

Godard CA, Leaver MJ, Said MR, Dickerson RL, George S, Stegeman JJ. (2000) Identification of cytochrome P450 1B-like sequences in two teleost fish species (scup, Stenotomus chrysops and plaice, Pleuronectes platessa) and in a cetacean (striped dolphin, Stenella coeruleoalba). Mar Environ Res 50(1-5):7-10.

Godard CAJ, Goldstone JV, Said MR, Dickerson RL, Woodin BR, Stegeman JJ. (2005) The new vertebrate CYP1C family: Cloning of new subfamily members and phylogenetic analysis. Biochem Biophys Res Commun 331: 1016-1024.

Gomez-Skarmeta JL, Glavic A, de la Calle-Mustienes E, Modolell J, Mayor R. (1998) Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. EMBO J 17: 181-190.

Gorry P, Lufkin T, Dierich A, Rochette-Egly C, Décimo D, Dollé P, Mark M, Durand B, Chambon P. (1994) The cellular retinoic acid binding protein I (CRABPI) is dispensible. Proc Natn Acad Sci USA 91: 9032-9036.

Groves AK, Fekete DM. (2012) Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. Development 139: 245-257.

Groves AK, Zhang KD, Fekete DM. (2013) The Genetics of Hair Cell Development and Regeneration. Annu Rev Neurosci 36: 361-381.

Gudas LJ, Wagner JA. (2011) Retinoids regulate stem cell differentiation. J Cell Physiol 226 (2): 322-330.

Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O, Hukkanen J, Evisalmi S, Anttila S, Rane A, Mantyla M, Purkunen R, Saarikoski S, et al. (1997) Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. Carcinogenesis 18: 391-397.

Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88: 49-92.

Hans S, Westerfield M. (2007) Changes in retinoic acid signalling alter otic patterning. Development 134: 2449-2458.

Hemond SG and Morest DK. (1992) Tropic effects of otic epithelium on cochleo-vestibular ganglion fiber growth in vitro. Anat Rec 232 (2): 273-284.

Hidalgo-Sánchez M, Alvarado-Mallart R, Alvarez IS. (2000) Pax2, Otx2, Gbx2 and Fgf8 Expression in Early Otic Vesicle Development. Mech Dev 95: 225-229.

Holder N, Hill J. (1991) Retinoic Acid Modifies Development of the Midbrain-Hindbrain Border and Affects Cranial Ganglion Formation in Zebrafish Embryos. Dev Camb Engl 113: 1159-1170.

Hollemann T, Chen Y, Grunz H, Pieler T. (1998) Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling. EMBO J 17: 7361-7372.

Itakura T, El-Kady M, Mitsuo R, Kaminishi Y. (2005) Complementary DNA cloning and constitutive expression of cytochrome P450 1C1 in the gills of carp (*Cyprinus carpio*). Environ Sci 12 (2): 111-120.

Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, Evans RM. (2006) Retinoic Acid Is Required Early during Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus. Proc Natl Acad Sci USA 103: 3902-3907.

Jönsson ME, Orrego R, Woodin BR, Goldstone JV, Stegeman JJ. (2007) Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. Toxicol Appl Pharmacol 221: 29-41.

Kalter H. (1960) The teratogenic effects of hypervitaminosis A upon the face and mouth of inbred mice. Ann N Y Acad Sci 85: 42-55.

Kalter H, Warkany J. (1961) Experimental production of congenital malformations in strains of inbred mice by maternal treatment with hypervitaminosis A. Am J Pathol 38: 1-21.

Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, Sugimoto E. (1993) Retinoic acid receptor gamma 2 gene expression is upregulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. Biochem J 293 (Pt 3): 807-812.

Kelley MW, Xu XM, Wagner MA, Warchol ME, Corwin JT. (1993) The Developing Organ of Corti Contains Retinoic Acid and Forms Supernumerary Hair Cells in Response to Exogenous Retinoic Acid in Culture. Dev Camb Engl 119: 1041-1053.

Kelly M, Chen P. (2007) Shaping the mammalian auditory sensory organ by the planar cell polarity pathway. Int J Dev Biol 51: 535-547.

Kelly MC, Chen P. (2009) Development of form and function in the mammalian cochlea. Curr Opin Neurobiol 19: 395-401.

Kessel M. (1992) Respecification of vertebral identities by retinoic acid. Development 115(2): 487-501.

Kikuchi T, Tonosaki A, Takasaka T. (1988). Development of apicalsurface structures of mouse otic placode. Acta Otolaryngol 106: 200-207.

Kitamoto T, Momoi M, Momoi T. (1989) Expression of cellular retinoic acid binding protein II (chick-CRABP II) in the chick embryo. Biochem Biophys Res Commun 164: 531-536.

Kleinjan DA, Dekker S, Vaessen MJ, Grosveld F. (1997) Regulation of the CRABP-I Gene during Mouse Embryogenesis. Mech Dev 67: 157-169.

Knowlton V.Y. (1967) Correlation of the development of membranous and bone labyrinth, sensory ganglia, nerves and brain centers of the chick embryo. J Morphol 121(3):179-208.

Kochhar DM. (1967) Teratogenic activity of retinoic acid. Acta Pathol Microbiol Scand 70 (3): 398-404.

Kochhar DM. (1973) Limb development in mouse embryos. I. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. Teratology 7 (3): 289-298.

Kojima T, Asano S, Takahashi N. (2013) Teratogenic Factors Affect Transcription Factor Expression. Biosci Biotechnol Biochem 77 (5): 1035-1041.

Kwasigroch TE, Kochhar DM. (1980) Production of congenital limb defects with retinoic acid: phenomenological evidence of progressive differentiation during limb morphogenesis. Anat Embryol (Berl) 161 (1): 105-113.

Ladher RK, O'Neill P, Begbie J. (2010) From shared lineage to distinct functions: the development of the inner ear and epibranchial placodes. Development 137: 1777-1785.

Lammer GJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Lott IT, Richard JM, Sun SC. (1985) Retinoic acid embryopathy. New England J Med 333: 837-841.

Lampron, C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P. (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. Development 121: 539-548.

Lang H, Bever MM, Fekete DM. (2000) Cell proliferation and cell death in the developing chick inner ear: spatial and temporal patterns. J Comp Neurol 417 (2): 205-220.

Lang H and Fekete DM. (2001) Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells. Dev Bol 234 (1): 120-137.

Lassiter RN, Stark MR, Zhao T, Zhou CJ. (2014) Signalling mechanisms controlling cranial placode neurogenesis and delamination. Dev Biol 389: 39-49.

León Y, Sánchez-Galiano S, Gorospe I. (2004) Programmed cell death in the development of the vertebrate inner ear. Apoptosis 9(3): 255-264.

Leonard L, Horton C, Maden M, Pizzey JA. (1995) Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. Dev Biol 168: 514-528.

Leroy P, Krust A, Zelent A, Mendelsohn C, Garnier JM, Kastner P, Dierich A, Chambon P. (1991a) Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. Embo J 10: 59-69.

Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. (1991b) Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 10138-10142.

Levi L, Lobo G, Doud MK, von Lintig J, Seachrist D, Tochtrop GP, Noy N. (2013) Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis. Cancer Research 73 (15): 4770-4780.

Lin Z, Cantos R, Patente M, Wu DK. (2005) Gbx2 is required for the morphogenesis of the mouse inner ear: a downstream candidate of hindbrain signalling. Development 132: 2309-2318.

Liu W, Levi G, Shanske A, Frenz DA. (2008) Retinoic acid induced inner ear teratogenesis caused by defective Fgf3/ Fgf10-dependent Dlx5 signaling. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 83: 134-144.

Luo T, Wagner E, Crandall JE, Dräger UC. (2004) A retinoic-acid critical period in the early postnatal mouse brain. Biol Psychiatry 56 (12): 971-980.

Lupo G, Liu Y, Qiu R, Chandraratna RA, Barsacchi G, He RQ, Harris WA. (2005) Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. Development 132: 1737-1748.

Lyn S, Giguère V. (1994) Localization of CRABP-I and CRABP-II mRNA in the early mouse embryo by whole-mount in situ hybridization: Implications for teratogenesis and neural development. Dev. Dynamics 199: 280-291.

MacLean G, Abu-Abed S, Dolle P, Tahayato A, Chambon P, Petkovich M. (2001) Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. Mech Dev 107: 195-201.

MacLean G, Li H, Metzger D. (2007) Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. Endocrinology 148 (10): 4560-4567.

Maden M. (2006) Retinoids and spinal cord development. J Neurobiol 66: 726-738.

Maden M, Blentic A, Reijntjes S, Seguin S, Gale E, Graham A. (2007) Retinoic acid is required for specification of the ventral eye field and for Rathke's pouch in the avian embryo. Int J Dev Biol 51: 191-200.

Maden M, Horton C, Graham A, Leonard L, Pizzey J, Siegenthaler G, Eriksson U. (1991) Domains of retinoic acid binding protein I (CRABP I) expression in the hindbrain and neural crest of the mouse embryo. Mech Dev 37: 13-23.

Maden M, Ong D, Chytil F. (1988) Spatial distribution of cellular proteins binding to retinoic acid in the chick limb bud. Nature 335: 733-735.

Maden M, Sonneveld E, van der Saag PT, Gale E. (1998) The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. Development 125: 4133-4144.

Maier EC, Whitfield TT. (2014) RA and FGF signalling are required in the zebrafish otic vesicle to pattern and maintain ventral otic identities. PLoS Genet 10 (12): e1004858.

Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. (2006) Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signalling pathway during mouse embryogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 46: 451-480.

Marovitz, WF, Shugar JM, Khan KM. (1976) The role of cellular degeneration in the normal development of (rat) otocyst. Laryngoscope 86 (9): 1413-1425.

Mason KE. (1935) Foetal death, prolonged gestation, and difficult parturition in the rat as a result of vitamin A-deficiency. Am J Anat 57 (2): 303-349.

McCaffery P, Dräger UC. (2000) Regulation of retinoic acid signalling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. Cytokine Growth Factor Rev 11 (3): 233-249.

Meinhardt H. (1983) A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs. J Embryol Exp Morphol 76: 115-137.

Michalik L, Wahli W. (2007) Guiding ligands to nuchlear receptors. Cell 129: 723-733

Meinhardt H. (2008) Models of biological pattern formation: from elementary steps to the organization of embryonic axes. Curr Top Dev Biol 81: 1-63.

Merabet S, Galliot B. (2015) The TALE face of Hox proteins in animal evolution. Front Genet 6: 267.

Mic FA, Molotkov A, Fan X, Cuenca AE, Duester G. (2000) RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. Mech Dev 97: 227-230.

Michalik L, Wahli W. (2007) Guiding Ligands to Nuclear Receptors. Cell 129: 649-651.

Monks DC, Morrow BE. (2012**)** Identification of putative retinoic acid target genes downstream of mesenchymal Tbx1 during inner ear development. Dev Dyn 241 (3): 563-573.

Morriss-Kay GM, Murphy P, Davidson DR, Hill RE. (1991) Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. EMBO J 10: 2985-2995.

Morriss-Kay GM, Tuckett F, Solursh M. (1986) The effects of Streptomyces hyaluronidase on tissue organization and cell cycle time in rat embryos. J Embryol Exp Morphol 98: 59-70.

Morsli H, Choo D, Ryan A, Johnson R, Wu DK. (1998) Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. J Neurosci 1; 18 (9): 3327-3335.

Müller F, O'Rahilly R. (1985) The first appearance of the neural tube and optic primordium in the human embryo at stage 10. Anat Embryol 172: 157-169.

Müller F, O'Rahilly R. (1986) Somitic-vertebral correlation and vertebral levels in the human embryo. Am J Anat 177 (1): 3-19.

Müller F, O'Rahilly R. (1987) The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. Anat Embryol (Berl) 176 (4): 413-430.

Müller F, O'Rahilly R. (1988) The development of the human brain from a closed neural tube at stage 13. Anat Embryol (Berl) 177 (3): 203-224.

Munnamalai V, Fekete DM. (2013) Wnt signalling during cochlear development. Semin Cell Dev Biol. 24(5): 480-489.

Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD. (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 7:3026–31 Cancer Res 57, 3026-3031.

Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. (2001) Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 297-316.

Muskhelishvili L, Thompson PA, Kusewitt DF, Wang C, Kadlubar FF. (2001) In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytochrome P450 1B1 expression in human normal tissues. J Histochem Cytochem 49: 229-236.

Nakajima Y. (2015) Signalling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects. Congenit Anom (Kyoto) 55: 17-25.

Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sato M, Shibukawa Y, Masuhiro Y, Kano K, Matsumoto T, Sugiya H. (2020) All-Trans Retinoic Acid Induces Reprogramming of Canine Dedifferentiated Cells into Neuron-like Cells. PLoS ONE 15: e0229892.

Napoli JL. (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism, FASEB J 10: 993-1001.

Napoli JL. (2017) Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. Pharmacology & Therapeutics 173: 19-33.

Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. J Biol Chem 279 (23): 23847-23850.

Nelson DR. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. BBA Proteins Proteom 1814: 14-18.

Nesterenko AM, Kuznetsov MB, Korotkova DD, Zaraisky AG. (2017) Morphogene adsorption as a Turing instability regulator: Theoretical analysis and possible applications in multicellular embryonic systems. PLoS One 12 (2): e0171212.

Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B, et al. (2002) Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signalling during mouse development. Nat Genet 31 (1): 84-88.

Niederreither K, Dollé P. (2006) Molecular mediators of retinoic acid signalling during development. Adv Dev Biol 16: 105-143.

Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. Nat Genet 21: 444-448.

Nikolic P. (2000) Apoptosis in the developing rat cochlea and its related structures. Brain Res Dev Brain Res 119 (1): 75-83.

Nishikori T. (1999) Apoptosis during inner ear development in human and mouse embryos: an analysis by computer-assisted three-dimensional reconstruction. Anat Embryol (Berl) 200 (1): 19-26.

Novitch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S. (2003) A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. Neuron 40: 81-95.

Nugent P, Greene RM. (1994) Interactions between the Transforming Growth Factor Beta (TGF Beta) and Retinoic Acid Signal Transduction Pathways in Murine Embryonic Palatal Cells. Differ Res Biol Divers 58: 149-155.

Nugent P, Potchinsky M, Lafferty C, Greene RM. (1995) TGF-Beta Modulates the Expression of Retinoic Acid-Induced RAR-Beta in Primary Cultures of Embryonic Palate Cells. Exp Cell Res 220: 495-500.

O'Rahilly R. (1963) The Early Development of the Otic Vesicle in Staged Human Embryos. J Embryol Exp Morphol. 11: 741-55.

Ohta S, Schoenwolf GC. (2018) Hearing crosstalk: the molecular conversation orchestrating inner ear dorsoventral patterning. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 7 (1).

Ohyama T, Groves AK, Martin K. (2007) The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. Int J Dev Biol 51: 463-472.

Olaya-Sánchez D, Sánchez-Guardado LÓ, Ohta S, Chapman SC, Schoenwolf GC, Puelles L, Hidalgo-Sánchez M. (2016) Fgf3 and Fgf16 expression patterns define spatial and temporal domains in the developing chick inner ear. Brain Struct Funct. 222 (1): 131-149.

Ong DE, Newcomer ME, Chytil F. (1994) Cellular retinoid binding proteins. In ‘‘The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine,’’ 2nd ed., Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (eds). New York: Raven Press: 283-317.

Otto S, Bhattacharyya KK, Jefcoate CR. (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in rat adrenal, ovary, and testis microsomes is catalyzed by the same novel cytochrome P450 (P450RAP). Endocrinology 131: 3067-3076.

Otto S, Marcus C, Pidgeon C, Jefcoate CR. (1991). A novel adrenocorticotropin-inducible cytochrome P450 from rat adrenal microsomes catalyzes polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. Endocrinology 129: 970-982.

Palenski TL, Sorenson CM, Jefcoate CR, Sheibani N. (2013). Lack of Cyp1b1 promotes the proliferative and migratory phenotype of perivascular supporting cells. Lab Invest 93: 646-662.

Pennimpede T, Cameron DA, MacLean GA, Li H, Abu-Abed S, Petkovich M. (2010) The Role of CYP26 Enzymes in Defining Appropriate Retinoic Acid Exposure during Embryogenesis. Birth Defects Research (Part A) 88: 883-894.

Piersma AH, Hessel EV, Staal YC. (2017) Retinoic acid in developmental toxicology: Teratogen, morphogen and biomarker. Reprod Toxicol 72: 53-61.

Pijnappel WW, Hendriks HF, Folkers GE, van den Brink CE, Dekker EJ, Edelenbosch C, van der Saag PT, Durston AJ. (1993) The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. Nature 366 (6453): 340-344.

Pittlik S, Domingues S, Meyer A, Begemann G. (2008) Expression of zebrafish aldh1a3 (*Raldh3*) and absence of aldh1a1 in teleosts. Gene Expr Patterns 8: 141-147.

Pottenger LH, Christou M, Jefcoate CR. (1991) Purification and immunological characterization of a novel cytochrome P450 from C3H/10T1/2 cells. Arch Biochem Biophys 286: 488-497.

Propping C, Mönig B, Luksch H, Mey J. (2007) Distribution of the Cellular Retinoic Acid Binding Protein CRABP-I in the Developing Chick Optic Tectum. Brain Res 1168: 21-31.

Purves D, Augustine, GJ, Fitzpatrick D, Hall, WC, Lamantia AS, et al. (2007) Neurociencia. Editorial médica Panamericana. 3ª edición.

Radosevic M, Robert-Moreno A, Coolen M, Bally-Cuif L, Alsina B. (2011) Her9 Represses Neurogenic Fate Downstream of Tbx1 and Retinoic Acid Signaling in the Inner Ear. Dev Camb Engl 138: 397-408.

Raft S, Groves AK. (2015) Segregating neural and mechanosensory fates in the developing ear: patterning, signalling, and transcriptional control. Cell Tissue Res 359: 315-332.

Ramón y Cajal S. (1908a) Terminación periférica del nervio acústico de las aves. Trab Lab Invest Biol 6: 161-176.

Ramón y Cajal S. (1908b) Les ganglions terminaux du nerf acoustique des oiseaux. Trab Lab Rech Biol 6: 195-224.

Reijntjes S, Gale E, Maden M. (2003) Expression of the retinoic acid catabolising enzyme CYP26B1 in the chick embryo and its regulation by retinoic acid. Gene Expr Patterns 3: 621-627.

Reijntjes S, Gale E, Maden M. (2004) Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. Dev Dyn 230: 509-517.

Represa JJ. (1990) Patterns of epitheli-al cell death during early development of the human inner ear. Ann Otol Rhinol Laryngol 99 (6 Pt 1): 482-488.

Riccomagno MM, Takada S, Epstein DJ. (2005) Wnt-Dependent Regulation of Inner Ear Morphogenesis Is Balanced by the Opposing and Supporting Roles of Shh. Genes Dev 19: 1612-1623.

Rieder CR, Parsons RB, Fitch NJ, Williams AC, Ramsden DB. (2000) Human brain cytochrome P450 1B1: immunohistochemical localization in human temporal lobe and induction by dimethylbenz(a)anthracene in astrocytoma cell line (MOG-G-CCM). Neurosci Lett 278: 177-180.

Robertson M. (1987) Towards a biochemistry of morphogenesis. Nature 330: 420-421.

Romand R, Albuisson E, Niederreither K, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. (2001) Specific expression of the retinoic acid-synthesizing enzyme RALDH2 during mouse inner ear development. Mech Dev 106: 185-189.

Romand R, Dolle P, Hashino E. (2006b) Retinoid signalling in inner ear development. J Neurobiol 66: 687-704.

Romand R, Kondo T, Dolle P, Hashino E. (2006a) Dynamic expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes in the developing mouse inner ear. J Comp Neurol 496: 643-654.

Romand R, Krezel W, Beraneck M, Cammas L, Fraulob V, Messaddeq N, Kessler P, Hashino E, Dollé P. (2013) Retinoic acid deficiency impairs the vestibular function. J Neurosci 33 (13): 5856-5866.

Romand R, Niederreither K, Abu-Abed S, Petkovich M, Fraulob V, Hashino E, Dolle P. (2004) Complementary expression patterns of retinoid acidsynthesizing and -metabolizing enzymes in pre-natal mouse inner ear structures. Gene Expr Patterns 4: 123-133.

Romand R, Sapin V, Ghyselinck NB, Avan P, Le Calvez S, Dollé P, Chambon, P, Mark M. (2000) Spatio-temporal distribution of cellular retinoid binding protein gene transcripts in the developing and the adult cochlea. Morphological and functional consequences in CRABP- and CRBPI-null mutant mice. Eur J Neurosci 12: 2793-2804.

Roselló-Díez A, Arques CG, Delgado I, Giovinazzo G, Torres M. (2014) Diffusible signals and epigenetic timing cooperate in late proximo-distal limb patterning. Development 141 (7): 1534-1543.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. (2000) Retinoids in embryonal development. Physiol Rev 80: 1021-1054.

Roux M, Zaffran S. (2016) Hox Genes in Cardiovascular Development and Diseases. J Dev Biol 24: 4 (2).

Ruben RJ. (1967) Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. Acta Otolaryngol: Suppl 220: 1-44.

Ruberte E, Dollé P, Chambon P, Morriss-Kay G. (1991) Retinoic acid receptors and cellular retinoid-binding proteins II: their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. Development 111: 45-60.

Ruberte E, Friederich V, Chambon P, Morriss-Kay G. (1993) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. Development 118: 267-282.

Ruberte E, Friederich V, Morriss-Kay G, Chambon P. (1992a) Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. Development 115: 973-987.

Ruberte E, Nakshatri H, Kastner Ph, Chambon P. (1992b) Retinoic acid receptors and binding proteins in mouse limb development. In Retinoids in Normal Development and Teratogenesis. (ed. G. M. Morriss-Kay): 99-111. Oxford: Oxford University Press.

Saari J, Bredberg D, Garwin G. (1982) Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid retinoid binding proteins from bovine retina and retina pigment epithelium, ft. Biol Chem 257 (13): 329-333.

Sakai Y, Meno C, Fujii H. (2001) The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterio- posterior axis within the mouse embryo. Genes Dev 15 (2): 213-225.

Sánchez-Calderón H. (2005a) Diferenciación de los elementos vestibulares y cocleares del oído interno de vertebrados. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

Sánchez-Calderón H, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G, Hidalgo-Sánchez M. (2007a) Fgf19 expression patterns in the developing chick inner ear. Gene Expr Patterns 7 (1-2): 30-38.

Sánchez-Calderón H, Martín-Partido G, Hidalgo-Sánchez M. (2002) Differential Expression of Otx2, Gbx2, Pax2, and Fgf8 in the Developing Vestibular and Auditory Sensory Organs. Brain Res Bull 57: 321-323.

Sánchez-Calderón H, Martín-Partido G, Hidalgo-Sánchez M. (2004) Otx2, Gbx2, and Fgf8 expression patterns in the chick developing inner ear and their possible roles in otic specification and early innervation. Gene Expr Patterns 4 (6): 659-669.

Sánchez-Calderón H, Martín-Partido G, Hidalgo-Sánchez M. (2005b) Pax2 expression patterns in the developing chick inner ear. Gene Expr Patterns 5 (6): 763-773.

Sánchez-Calderón H, Milo M, León Y, Varela-Nieto I. (2007b) A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. Int J Dev Biol 51: 557-570.

Sánchez-Guardado LO, Ferrán JL, Mijares J, Puelles L, Rodríguez-Gallardo L, Hidalgo-Sánchez M. (2009) Raldh3 gene expression pattern in the developing chicken inner ear. J Comp Neurol 514 (1): 49-65.

Sanchez-Guardado LO, Ferran JL, Rodriguez-Gallardo L, Puelles L, Hidalgo-Sanchez M. (2011) Meis gene expression patterns in the developing chicken inner ear. J Comp Neurol 519: 125-147.

Sánchez-Guardado LO, Puelles L, Hidalgo-Sánchez M. (2013) Fgf10 expression patterns in the developing chick inner ear. J Comp Neurol 521: 1136-1164

Sánchez-Guardado LO, Puelles L, Hidalgo-Sánchez M. (2014) Fate map of the chicken otic placode. Development 141: 2302-2312.

Sánchez-Guardado LO, Puelles L, Hidalgo-Sánchez M. (2019) Origin of Acoustic-Vestibular Ganglionic Neuroblasts in Chick Embryos and Their Sensory Connections. Brain Struct Funct 224: 2757-2774.

Satoh T, Fekete DM. (2005) Clonal Analysis of the Relationships between Mechanosensory Cells and the Neurons That Innervate Them in the Chicken Ear. Dev Camb Engl 132: 1687-1697.

Savas U, Bhattacharyya KK, Christou M, Alexander DL, Jefcoate CR. (1994) Mouse cytochrome P-450EF, representative of a new 1B subfamily of cytochrome P-450s. Cloning, sequence determination, and tissue expression. J Biol Chem 269: 14905-14911.

Savory JG, Edey C, Hess B, Mears AJ, Lohnes D. (2014) Identification of novel retinoic acid target genes. Dev Biol 395 (2): 199-208.

Schilling TF, Nie Q, Lander AD. (2012) Dynamics and precision in retinoic acid morphogen gradients. Curr Opin Genet Dev 22: 562-569.

Schimmang T. (2007) Expression and functions of FGF ligands during early otic development. Int J Dev Biol 51: 473-481.

Schneider-Maunoury S, Pujades C. (2007) Hindbrain signals in otic regionalization: walk on the wild side. Int J Dev Biol 51: 495-506.

See AW, Kaiser ME, White JC. (2008) A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. Dev Biol 316 (2): 171-190.

Serpente P, Tumpel S, Ghyselinck NB, Niederreither K, Wiedemann LM, Dolle P, Chambon P, Krumlauf R, Gould AP. (2005) Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. Development. 132: 503-513.

Shaw N, Elholm M, Noy N. (2003) Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. The Journal of Biological Chemistry 278 (43): 41589-41592.

Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. Cancer Res 56: 2979-2984.

Sienknecht UJ, Fekete DM. (2009) Mapping of Wnt, Frizzled, and Wnt Inhibitor Gene Expression Domains in the Avian Otic Primordium. J Comp Neurol 517: 751-764.

Singh RK, Chowdhury A, Sani BP. (1990) Detection of cellular retinoic acid-binding protein in chick embryonic tissues by monoclonal antibodies. Cell Diff Dev 32: 131-140.

Sirbu IO, Gresh L, Barra J, Duester G. (2005) Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. Development 132: 2611–2622.

Sissung TM, Price DK, Sparreboom A, Figg W. (2006) Pharmacogenetics and Regulation of Human Cytochrome P450 1B1: Implications in Hormone-Mediated Tumor Metabolism and a Novel Target for Therapeutic Intervention. Mol Cancer Res 4 (3).

Smith SM, Pang K, Sundin O, Wedden SE, Thaller C, Eichele G. (1989) Molecular approaches to vertebrate limb morphogenesis. Development 107 (suppl.): 121-131.

Smith WC, Nakshatri H, Leroy P, Rees J, Chambon P. (1991) A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. Embo J 10: 2223-2230.

Stefanovic S, Zaffran S. (2017) Mechanisms of retinoic acid signalling during cardiogenesis. Mech Dev 143: 9-19.

Stoilov I, Rezaie T, Jansson I, Schenkman JB, Sarfarazi M. (2004). Expression of cytochrome P4501b1 (Cyp1b1) during early murine development. Mol Vis 10: 629-636.

Stoner CM, Gudas LJ. (1989) Mouse cellular retinoic acid binding protein: cloning, complementary DNA sequences, and mRNA expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 wild type and RA-3-10 mutant teratocarcinoma cells. Cancer Res 49: 1490-1504.

Su Y, Meng A. (2002) The Expression of Gbx-2 during Zebrafish Embryogenesis. Mech Dev 113: 107-110.

Su YX, Hou CC, Yang WX. (2015) Control of hair cell development by molecular pathways involving Atoh1, Hes1 and Hes5. Gene 558: 6-24.

Sundelin J, Das S, Eriksson U, Rask L, Peterson P. (1985) The primary structure of bovine cellular retinoic acid-binding protein. J Biol Chem 260: 6494-6499.

Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF. (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. J Biol Chem 269: 13092-13099.

Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessell TM, Eichele G. (1999) Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. Dev Biol 216: 282-296.

Tahayato A, Dolle P, Petkovich M, et al. (2003) Cyp26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. Gene Expr Patterns 3 (4):449-454.

Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, et al. (2004) A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. J Biol Chem 279 (1): 77-85.

Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. (1999) Retinoic Acid and Neurotrophins Collaborate to Regulate Neurogenesis in Adult-Derived Neural Stem Cell Cultures. J Neurobiol 38: 65-81.

Takase S, Ong DE, Chytil F. (1979) Cellular retinol-binding protein allows specific interaction of retinol with the nucleus in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 76: 2204-2208.

Takase S, Ong D, Chytil F. (1986) Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. Arch Biochem Biophys 247: 328-334.

Tan SS, Morriss-Kay GM. (1986) Analysis of cranial neural crest cell migration and early fates in postimplantation rat chimeras. J Embryol Exp Morph 98: 21-58.

Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, et al. (1996) Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. J Biol Chem 271: 2832428330.

Thatcher JE, Isoherranen N. (2009) The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. Expert Opin Drug Metab Toxicol 5 (8): 875-886.

Thiede BR, Mann ZF, Chang W, Ku YC, Son YK, Lovett M, Kelley MW, Corwin JT (2014) Retinoic acid signalling regulates the development of tonotopically patterned hair cells in the chicken cochlea. Nat Commun 20 (5): 3840.

Thompson DL, Gerlach-Bank LM, Barald KF, Koenig RJ. (2003) Retinoic acid repression of bone morphogenetic protein 4 in inner ear development. Mol Cell Biol 23: 2277-2286.

Tonk EC, Pennings JL, Piersma AH. (2015) An adverse outcome pathway framework for neural tube and axial defects mediated by modulation of retinoic acid homeostasis. Reprod Toxicol 55: 104-13.

Tuazon FB, Mullins MC. (2015) Temporally coordinated signals progressively pattern the anteroposterior and dorsoventral body axes. Seminars in Cell & Developmental Biology Volume 42: 118-133.

Tzimas G, Nau H. (2001) The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis. Curr Pharm Des 7: 803-831.

Uehara M, Yashiro K, Mamiya S, Nishino J, Chambon P, Dolle P, Sakai Y. (2007) CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse. Dev Biol 302 (2): 399-411.

Vaage S. (1969) The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (Gallus domesticus). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. Ergeb Anat Entwicklungsgesch 41 (3): 3-87.

Vadlamuri SV, Glover DD, Turner T, Sarkar MA. (1998) Cancer Lett 122: 143-150.

Vaessen MJ, Kootwijk E, Mummery C, Hilkens T, Bootsma D, Van Kessel AD. (1989) Preferential expression of cellular retinoic acid-binding protein in a subpopulation of neural cells in the developing mouse embryo. Differentiation 40: 99-105.

Vaessen MJ, Meijers JHC, Bootsma D, Van Kessel AD. (1990) The cellular retinoic acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic acid-induced malformations. Development 110: 371-378.

Varela-Nieto I, Palmero I, Magariños M. (2019) Complementary and distinct roles of autophagy, apoptosis and senescence during early inner ear development. Hear Res 376: 86-96.

Vasiliou V, Gonzalez FJ. (2008) Role of CYP1B1 in glaucoma. Annu Rev Pharmacol Toxicol 48: 333-358.

Wassarman KM, Lewandoski M, Campbell K, Joyner AL, Rubenstein JL, Martinez S, Martin GR. (1997) Specification of the Anterior Hindbrain and Establishment of a Normal Mid/Hindbrain Organizer Is Dependent on Gbx2 Gene Function. Dev Camb Engl 124: 2923-2934.

Wei LN. (2016) Cellular Retinoic Acid Binding Proteins: Genomic and Non-Genomic Functions and Their Regulation. Subcell Biochem 81: 163-178.

Wei LN, Blaner WS, Goodman DS, Nguyen-Huu MC. (1989) Regulation of the Cellular Retinoid-Binding Proteins and Their Messenger Ribonucleic Acids during P19 Embryonal

Carcinoma Cell Differentiation Induced by Retinoic Acid Mol Endocrinol Baltim Md 3: 454-463.

White JC, Highland M, Kaiser M, Clagett-Dame M. (2000) Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. Dev Biol 220: 263-284.

White RJ, Schilling TF. (2008) How degrading: Cyp26s in hindbrain development. Dev Dyn 237 (10): 2775-2790.

Whitfield T, Haddon C, Lewis J. (1997) Intercellular signals and cell-fate choices in the developing inner ear: origins of global and of fine-grained pattern. Semin Cell Dev Biol 8 (3): 239-247.

Whitfield TT (2015) Development of the inner ear. Curr Opin Genet Dev 32: 112-118.

Whitfield TT, Hammond KL. (2007) Axial patterning in the developing vertebrate inner ear. Int J Dev Biol 51: 507-520.

Whitehead MC, Morest DK. (1985a) The growth of cochlear fibers and the formation of their synaptic endings in the avian inner ear: a study with the electron micro-scope. Neuroscience 14 (1): 277-300.

Whitehead MC, Morest DK. (1985b) The development of innervation patterns in the avian cochlea. Neuroscience 14 (1): 255-276.

Williams AL, Bohnsack BL. (2015) Neural crest derivatives in ocular development: discerning the eye of the storm. Birth Defects Res C Embryo Today 105: 87-95.

Williams AL, Eason J, Chawla B, Bohnsack BL. (2017) Cyp1b1 Regulates Ocular Fissure Closure Through a Retinoic Acid-Independent Pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci 58: 1084-1097.

Wilson JG, Roth CB, Warkany J. (1953) An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. Am J Anat 92 (2): 189-217.

Wilson L, Maden M. (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. Dev Biol 282: 1-13.

Won JY, Nam EC, Yoo SJ, Kwon HJ, Um SJ, Han HS, Kim SH, Byun Y, Kim SY. (2004) The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. Metabolism 53: 1007-1012.

Wu DK, Kelley MW. (2012) Molecular mechanisms of inner ear development. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4: a008409.

Wu DK, Oh S-H. (1996) Sensory Organ Generation in the Chick Inner Ear. J Neurosci 16: 6454-6462.

Xavier-Neto J, Sousa Costa ÂM, Figueira AC, Caiaffa CD, Amaral FN, Peres LM, da Silva BS, Santos LN, Moise AR, Castillo HA. (2015) Signalling through retinoic acid receptors in cardiac development: Doing the right things at the right times. Biochim Biophys Acta 1849: 94-111.

Xu M, Miller MS. (2004) Determination of murine fetal Cyp1a1 and 1b1 expression by real-time fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction. Toxicol Appl Pharmacol 201: 295-302.

Yin HC1, Tseng HP, Chung HY, Ko CY, Tzou WS, Buhler DR, Hu CH. (2008) Influence of TCDD on zebrafish CYP1B1 transcription during development. Toxicol Sci 103 (1): 158-168.

Ylikoski J, Pirvola U, Eriksson U. (1994) Cellular Retinol-Binding Protein Type I Is Prominently and Differentially Expressed in the Sensory Epithelium of the Rat Cochlea and Vestibular Organs. J Comp Neurol 349: 596-602.

Zanger UM, Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther 138 (1): 103-141.

Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky L. (2000) Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. Drug Metab Dispos 28: 292-297.

ANEXO: FAMILIA DE GENES *IRX*

10. ANEXO: FAMILIA DE GENES *IRX.*

10.1. RESUMEN DE LA FAMILIA DE GENES *IRX*.

10.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA DE GENES *IRX*.

Los genes *Iroquois* (*Iro* para invertebrados e *Irx* para vertebrados) codifican para una familia de factores de transcripción que contienen el homeodominio altamente conservado de la superclase TALE (*Three Aminoacid Loop Extension*), encontrados en animales desde nemátodos a seres humanos (Burglin, 1997), e implicados en el establecimiento de patrones y regionalización de tejidos embrionarios (Mummrnhoff et al., 2001).

Los genes *Iroquois* (Iro) fueron descubiertos en *Drosophila* durante una mutagénesis diseñada para identificar genes que afectaran al establecimiento del patrón de órganos sensoriales externos (Cavodeassi et al., 2001). Los seis *Iro*/*Irx* están organizados en dos grupos. Cada uno de ellos consistente en tres genes: *Irx1*, *Irx2* e *Irx4* pertenecen al grupo *IrxA* y se localizan en un cromosoma (diferente según especies), mientras que *Irx3*, *Irx5* e *Irx6* pertenecen al grupo *IrxB* y se localizan en otro cromosoma (también diferente según especies) (Mummenhoff et al., 2001). Diversos datos sugieren que lo más probable es que ambos grupos se originaran de un grupo de tres miembros ancestrales. Análisis filogenéticos en ratón de los genes homeobox relacionados con *Iroquois*, para lo que se dispuso de secuencias completas, mostraron que *Irx2* está más relacionado con *Irx5* y que *Irx1* está más relacionado con *Irx3*. También indican que *Irx4* es el miembro más divergente de ellos (Christoffels et al., 2000).

Por lo tanto, la duplicación del grupo probablemente ocurrió en un ancestro del linaje de vertebrados. La comparación de los miembros de la familia de los *Iro*/*Irx* en *Drosophila* y vertebrados indica que las proteínas de los vertebrados son más semejantes entre sí que las de la familia de *Drosophila* (Bosse et al., 2000; Peters et al., 2000). Por consiguiente, y en contraste con los genes *Hox* (Mann, 2000), las

duplicaciones de los genes que generaron el complejo *Iroquois* (Iro-C) y los grupos *Irx* de vertebrados podrían haber ocurrido independientemente y, en consecuencia, no derivarían de un grupo ancestral común (Cavodeassi et al., 2001).

10.1.2. FUNCIÓN DE LOS GENES *IRX* EN EL DESARROLLO DE VERTEBRADOS.

Los genes *Irx* participan en muchos procesos del desarrollo, desde especificación de territorios hasta el desarrollo de elementos de patrón de regionalización concreto (Gómez-Skarmeta y Modollel, 2002). Los genes *Iroquois* (*Iro* o *Irx*) están implicados en el establecimiento de patrones y regionalización de tejidos embrionarios en vertebrados e invertebrados (Bürglin, 1997; Mummenhoff et al., 2001). Estos genes se expresan inicialmente en grandes dominios para después restringirse a subdominios de estos grandes territorios. La expresión temprana tiene un papel dual: ayudar a conferir identidad y asentar un centro organizador dorso-ventral que otorga el patrón del tejido a ambos lados del límite de expresión del complejo *Iroquois* (*Iro-C*) (Díez de Corral et al., 1999). Además, nuevos dominios de expresión aparecen tarde en el desarrollo y son requeridos para actividades de establecimiento de patrones adicionales (Cavodeassi et al., 2001; Houweling et al., 2001).

El comienzo de la expresión de los seis genes *Irx* ha sido descrito previamente y confirmado por una gran cantidad de análisis: es diferente entre los miembros de un mismo grupo y diferente entre genes relacionados. Sin embargo, ha sido revelado que los patrones de expresión espacio-temporal en genes *Irx* de ratón de un mismo grupo se parecen entre ellos a partir del estadio HH35-36 (E9,5) en adelante. Por lo tanto, los genes agrupados tienen una expresión coordinada, indicando una regulación coordinada a nivel de grupo de genes (Houweling et al., 2001).

El patrón de expresión de *Iro*/*Irx* ha sido estudiado en órganos sensoriales externos de *Drosophila* y en el desarrollo embrionario del sistema nervioso y corazón (Goriely et al. 1999; Christoffels et al., 2000; Bao et al., 1999), las extremidades y los dedos (Houweling et al., 2001; Zülch et al., 2001), el pulmón (Becker et al., 2001), entre

otros. Ha sido mostrado que los genes *Irx* funcionan temprano durante el desarrollo para especificar la identidad de diversos territorios del cuerpo y, más tarde durante el desarrollo, funcionan para subdividir dichos territorios en dominios más pequeños (Cavodeassi et al., 2001).

10.1.3. FUNCIÓN DE LOS GENES *IRX* EN EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE VERTEBRADOS.

Los genes de la familia *Irx* han sido ampliamente estudiados durante el desarrollo embrionario del oído interno de ratón, pero poco se conoce sobre su posible papel en el desarrollo del oído interno de otros vertebrados (Bosse et al., 1997).

Nuestros trabajos se han centrado en el estudio de la expresión de los genes *Irx* durante el desarrollo del oído interno de aves, considerado como un modelo de estudio en trabajos experimentales en Biología del Desarrollo. Algunas de las razones para optar por aves es que su oído es más complejo porque cuenta con dos zonas sensoriales extra respecto del oído interno de mamíferos (mácula neglecta, mn; y mácula de la lagena, ml), con lo que puede aportar más información como modelo. Además, se tiene un amplio conocimiento del mapa de destino para el oído interno de aves (Sánchez-Guardado et al., 2014), lo que nos aporta información a la par que permite integrar nuestros resultados en un marco global. En nuestro estudio hemos realizado un análisis más detallado y hemos abordado la posible implicación de los genes de la familia *Irx* en el desarrollo del oído interno. Hemos hecho hincapié en algunos miembros representativos de cada uno de los dos grupos (*Irx1* para el grupo A y *Irx3* para el grupo B), facilitando así la descripción de los patrones de expresión.

10.2. MOTIVACIÓN

Este trabajo se engloba dentro de una exploración más amplia sobre el papel del ácido retinoico en el desarrollo embrionario del oído interno de aves, llevado a cabo por el grupo de investigación. A lo largo de este estudio se han analizado diversos genes

implicados en la regulación de la acción del ácido retinoico sobre los tejidos durante el desarrollo embrionario.

Diversos estudios apuntan la existencia de una relación entre la familia de genes *Irx* y el ácido retinoico. Por otro lado, otros miembros del grupo de investigación han estudiado la familia de la vía de señalización de los *FGFs.* Nuestros resultados sugieren la hipótesis de que la familia de genes *Irx* podría jugar un papel como elemento enlace entre la familia *Fgf* y los genes que regulan la acción del ácido retinoico, analizados en este trabajo. Por ese motivo, hemos considerado oportuno agregar un resumen del estudio realizado sobre la expresión de los genes *Irx* en el oído interno de aves en desarrollo.

10.3. GENES *IRX* Y ÁCIDO RETINOICO

En *Xenopus*, los genes *Irx1* e *Irx3* están regulados por el ácido retinoico, que se sabe es necesario para activar los genes renales tempranos y participar en la segmentación de los pronefros en el eje proximal-distal (Cartry et al., 2006; Wingert et al., 2007). La expansión del campo renal asociada a la sobreexpresión de los genes *Irx* es similar a la encontrada al aumentar la actividad del ácido retinoico (Cartry et al., 2006). Embriones con reducción o aumento de la señalización del AR mostraron disminución o regulación ascendente, respectivamente, de la expresión de ambos genes *Irx* (*Irx1* e *Irx3*) en el riñón de *Xenopus*. Por lo tanto, el AR regula positivamente los genes *Irx* en los pronefros, pero sólo cuando los tratamientos farmacológicos se realizaron en la fase tardía de la gástrula (Alarcón et al., 2008). Tanto *Irx1* como *Irx3* se activan mediante la señalización del AR. Esto es coherente con la reducción o el aumento de la señalización del AR regula a posteriori o a priori, respectivamente, la expresión de ambos genes, pero sólo cuando los tratamientos farmacológicos se realizaban en la fase tardía de la en etapas tardías de la gástrula/neurula temprana, pero no más tarde (Alarcón et al., 2008, Cartry et al., 2006). Es probable que el efecto del AR en la expresión del gen *Irx* sea indirecto (Wingert et al., 2007).

Esto sugiere un posible vínculo entre los genes *Irx* y la señalización del AR. De hecho, encontramos que tanto *Irx1* como *Irx3* se activan mediante la señalización de AR (Cartry et al., 2006), siendo mucho antes de que los genes *Irx* se expresen inicialmente. Así, el efecto de la AR en la expresión del gen *Irx* es probable que sea indirecto, probablemente a través de Lim1 y Pax8 (Cartry et al., 2006; Wingert et al., 2007).

Inmediatamente después de la ausencia de expresión de IRX1 e IRX2 se produce una cascada de alteración génica, que incluye, entre otras cosas, la pérdida de la enzima CYP26A1 en la cola, que es necesaria para degradar el AR y así proteger las células progenitoras de la diferenciación y la apoptosis. Aunque todavía se desconoce si la regulación a la baja de la actividad CYP26A1 es una consecuencia directa de la expresión ectópica IRX1/IRX2 (Freese et al., 2014).

El papel del AR en el control programado de la muerte celular durante el desarrollo de la extremidad posterior es bien conocido, así como sus efectos mediados por la señalización de BMP (Hernández-Martinez et al., 2009; Rodríguez-Leon et al., 1999; Abarca-Buis et al., 2011; Chimal-Monroy et al. 2011). Un estudio observó que la regulación descendente de la expresión de *Irx1* e *Irx2* en el tejido interdigital coincidió con el inicio de la muerte celular. Sin embargo, un hallazgo interesante es que, en el tejido interdigital, el AR inhibió la expresión de *Irx1* e *Irx2* antes de que se observaran los primeros signos de caspasa 3 activa. En este estudio, el AR inhibió la expresión de *Irx1* e *Irx2* por un mecanismo independiente de BMP. Sobre esta base, el presente estudio sugirió que la expresión *Irx1* e *Irx2* puede desempeñar un papel protector contra la muerte celular. De ello se deduce que la regulación descendente de los genes *Irx* en el tejido interdigital por el AR puede ser un prerrequisito para promover la cascada molecular que termina en la muerte celular, ya que los genes *Irx* pueden reprimir la expresión de genes involucrados en el proceso de muerte celular (Díez-Hernández et al., 2013).

En otro estudio, la expresión de *Irx1* e *Irx2* se observó en el límite del primordio esquelético y del tejido no cartilaginoso. En estas regiones el AR también inhibió la expresión de *Irx1* e *Irx2* concomitantemente con la regulación descendente de Sox9, antes de la inducción de la muerte celular. Dado que se sabe que el AR es un inhibidor

importante de la condrogénesis (Rodríguez-León et al., 1999) y sobre la base de que los productos de los genes *Irx* reprimen la expresión de *Bmp4* o *Msx* en otros sistemas, dos genes implicados en la muerte celular durante el desarrollo de las extremidades (Glavic et al. , 2001; Gómez-Skarmeta et al. , 2001; Grotewold y Ruther, 2002; Villa-Cuesta y Modolell, 2005), se puede considerar que la expresión del gen *Irx* durante la formación digital protege a las células comprometidas condrocitos frente a la muerte celular. delimitando los límites de los elementos esqueléticos (Díez-Hernández et al., 2013).

Por otra parte, *Irx4* y la subunidad RXRa del heterodúplex VDR/RXRa forman un complejo proteico, que inhibe la lenta expresión del gen MyHC3 en los ventrículos durante el desarrollo del corazón. Además, se requiere la región amino-terminal de *Irx4* para la inhibición (Wang et al., 2001).

Se ha indicado que la señalización del AR puede controlar la extensión de los dominios que expresan *Irx* en la placa neural en desarrollo (Gómez-Skarmeta et al., 1998). En la vesícula óptica de pollo, los genes *Irx* pertenecientes al grupo A o al grupo B estaban ausentes o débilmente expresados, respectivamente, en el territorio presuntivo del aparato endolinfático *Raldh3* positivo (Sánchez-Guardado et al., 2009). Estos hallazgos sugieren fuertemente que el AR puede igualmente reprimir *IrxA* e inducir la expresión de *IrxB* durante el patrón y la especificación del oído interno. El estudio de los efectos teratogénicos del AR en la expresión del factor de transcripción por qRT-PCR ha demostrado que la expresión de los genes *IrxA* se redujo mientras que la señalización de los miembros de la familia *IrxB* aumentó en respuesta al AR (Kojima et al., 2013). En el miembro posterior del pollo en desarrollo, el AR también inhibe las expresiones de *Irx1* e *Irx2* (grupo A) por un mecanismo independiente de BMP (Díaz-Hernández et al., 2013). Sin embargo, la expresión de *Irx3* se reduce en el tubo neural de las codornices deficientes en vitamina A (VAD) (Díez del-Corral et al., 2003).

Recientemente se ha publicado que la señalización de AR regula la expresión de *Irx2a*, directa o indirectamente, en la nefrona en desarrollo (Marra et al., 2019)

10.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la lectura y visualización de los resultados y la discusión sobre la expresión de la familia de genes *Irx* en el oído interno de aves, remitimos al trabajo de grado titulado "Especificación del epitelio ótico por los genes *Irx*" y también el artículo presentados por la doctoranda:

"Expression patterns of *Irx* genes in the developing chick inner ear" (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27783221/).

10.5. REFERENCIAS ESPECÍFICAS

NOTA: la lista de referencias se centra únicamente en los artículos mencionados en el apartado "10.3. Genes Irx y Ácido retinoico". Para un listado completo de las referencias, remitimos al trabajo de grado titulado "Especificación del epitelio ótico por los genes Irx" y también el artículo:
"Expression patterns of Irx genes in the developing chick inner ear" (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27783221/).

Abarca-Buis RF, Bustamante M, Cuervo R, Aguilar-Fernandez-de-Lara D, Chimal-Monroy J. (2011) Smad8 is expressed in the anterior necrotic zone: evidence for a role of bone morphogenetic proteins/SMAD signaling in the activation of a molecular cascade that culminates in cell death. Dev Growth Differ 53: 780-792.

Alarcón P, Rodríguez-Seguel E, Fernández-González A, Rubio R, Gómez-Skarmeta JL. (2008) A dual requirement for *Iroquois* genes during Xenopus kidney development. Development 135 (19): 3197-207.

Cartry J, Nichane M, Ribes V, Colas A, Riou JF, Pieler T, Dolle P, Bellefroid EJ, Umbhauer M. (2006) Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate. Dev Biol 299: 35-51.

Chimal-Monroy J, Abarca-Buis RF, Cuervo R, Diaz-Hernandez M, Bustamante M. (2011) Molecular control of cell differentiation and programmed cell death during digit development. IUBMB life 63: 899-906.

Díez-del-Corral R, Olivera-Martínez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. (2003) Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. Neuron 40: 65-79.

Díaz-Hernández ME, Bustamante M, Galván-Hernández CI, Chimal-Monroy J. (2013) *Irx1* and *Irx2* are coordinately expressed and regulated by retinoic acid, TGFbeta and FGF signaling during chick hindlimb development. PLoS One 8: e58549.

Freese NH, Lam BA, Staton M, Scott A, Chapman SC. (2014) A Novel Gain-Of-Function Mutation of the Proneural *IRX1* and *IRX2* Genes Disrupts Axis Elongation in the Araucana Rumpless Chicken. PLoS ONE 9 (11): e112364.

Glavic A, Gomez-Skarmeta JL, Mayor R. (2001) Xiro-1 controls mesoderm.patterning by repressing bmp-4 expression in the Spemann organizer. Dev Dyn 222: 368-376.

Gomez-Skarmeta J, de La Calle-Mustienes E, Modolell J. (2001) The Wntactivated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4. Development 128: 551-560.

Gómez-Skarmeta JL, Glavic A, de la Calle-Mustienes E, Modolell J, Mayor R. (1998) Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila *Iroquois* complex genes, controls development at the neural plate. EMBO J 17: 181-190.

Grotewold L, Ruther U. (2002) The Fused toes (Ft) mouse mutation causes anteroposterior and dorsoventral polydactyly. Dev Biol 251: 129-141.

Hernandez-Martinez R, Castro-Obregon S, Covarrubias L. (2009) Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. Development 136: 3669-3678.

Kojima T, Asano S, Takahashi N. (2013) Teratogenic factors affect transcription factor expression. Biosci Biotechnol Biochem 77: 1035-1041.

Marra AN, Cheng CN, Adeeb B, Addiego A, Wesselman HM, Chambers BE, Chambers JM, Wingert RA. (2019) *Iroquois* transcription factor *Irx2*a is required for multiciliated and transporter cell fate decisions during zebrafish pronephros development. Sci Rep 23: 9 (1): 6454.

Rodríguez-León J, Merino R, Macías D, Gañán Y, Santesteban E. (1999) Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. Nat Cell Biol 1: 125-126.

Sánchez-Guardado LO, Ferrán JL, Mijares J, Puelles L, Rodríguez-Gallardo L, Hidalgo-Sánchez M. (2009) Raldh3 gene expression pattern in the developing chicken inner ear. J Comp Neurol 514: 49-65.

Villa-Cuesta E, Modolell J. (2005) Mutual repression between msh and Iro-C is an essential component of the boundary between body wall and wing in Drosophila. Development 132: 4087-4096.

Wang GF, Nikovits W J, Bao ZZ, Stockdale FE. (2001) *Irx4* Forms an Inhibitory Complex with the Vitamin D and Retinoic. X Receptors to Regulate Cardiac Chamber-specific slow MyHC3 Expression. J Biol Chem 276 (31): 28835-28841.

Wingert RA, Selleck R, Yu J, Song HD, Chen Z, Song A, Zhou Y, Thisse B, Thisse C, McMahon AP. (2007) The cdx genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. PLoS Genet 3: 1922-1938.