

209
69



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**NEUROQUIMICA DEL OIDO INTERNO DE
CUYES TRATADOS CON ESTREPTOMICINA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Ana Georgina Iturbe Andreu

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pág
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	32
RESULTADOS.....	44
DISCUSION.....	47
CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

Existen evidencias de que los neurotransmisores en el vestíbulo de los vertebrados son de naturaleza química. Aunque su identidad aún no es conocida, se sospecha que pudiera ser el ácido gamma-aminobutírico (GABA) un mediador aferente y la acetilcolina (Ach) uno de los eferentes.

Usando como modelo el vestíbulo del cuy en el presente trabajo se trató de aportar evidencias en apoyo a lo anterior. Para esto se midió la actividad de la glutamato decarboxilasa (GAD), la enzima que sintetiza al GABA y la colin acetiltransferasa (CAT), enzima de síntesis de Ach en homogenados de vestíbulo aislado de cuyes, ya que la presencia de estas enzimas se ha considerado como marcador específico de neuronas GABAérgicas y colinérgicas.

Para estudiar la posible localización celular de estas enzimas se aprovechó que el efecto deletéreo de la estreptomycin sobre el vestíbulo se conoce y que por estudios de microscopía electrónica se ha encontrado que este antibiotico destruye las células pilosas sensitivas del epitelio sensorial vestibular casi por completo sin dañar ni las células de sostén, ni a las terminales sinápticas ó a las fibras nerviosas.

Se encontró que en homogenados de vestíbulo de cuy existe tanto actividad de GAD como de CAT y que aquella posee propiedades semejantes a la existente en el vestíbulo del pollo. Al investigar ambas enzimas en vestibulos de cuyes inyectados con sulfato de estreptomycin por 20, 25, 30, 35 y 50 días la actividad de la GAD disminuyó progresivamente de acuerdo al

tiempo de tratamiento mientras la actividad de CAT no se modificó. Por estudios de microscopía electrónica se observó que la estreptomycin destruye las células pilosas sin dañar las otras estructuras del epitelio sensorial vestibular, por lo que se comprobó que existía una correlación entre la destrucción de las células pilosas del vestíbulo y una disminución de la actividad de la GAD.

Con base en estos resultados se puede postular que en el vestíbulo del cuy, la GAD se encuentra en la célula pilosa, mientras que la CAT está ubicada en un tipo celular ó boton sinápticos que podrían ser las terminales nerviosas de las fibras eferentes, siendo el GABA y la Ach sus respectivos neurotransmisores.

INTRODUCCION

El aparato acústico-vestibular en los vertebrados es el encargado de percibir los sonidos y de ayudar a mantener el equilibrio. Está constituido por tres partes, el oído externo, el oído medio y el oído interno.

El oído externo en el humano está formado por el pabellón auricular y por el conducto auditivo externo. El pabellón auricular u oreja es una fina estructura de cartilago, recubierta de piel, colocada a los lados de la cabeza que posee la función de recoger los sonidos y dirigirlos a través del conducto auditivo. El conducto auditivo es un tubo de 2.5 cm de longitud, cerrado internamente por la membrana del tímpano.

El oído medio ó caja del tímpano está constituido por tres pequeños huesos (martillo, yunque y estribo) y por la trompa de Eustaquio, que comunica el oído medio con la naso-faringe. El tímpano es una pequeña membrana oval unida en toda su circunferencia externa a la parte final de la cavidad ósea del conducto auditivo externo. Su parte central sobresale un poco hacia el interior, donde se une con el martillo, éste se une al yunque y éste último se articula con el estribo; estos huesecillos unidos entre sí son los responsables de transmitir las vibraciones desde el tímpano al oído interno, amplificándolas más de diez veces. El oído medio y el oído interno se comunican mediante dos pequeñas perforaciones: la ventana oval cubierta por la base del estribo y la ventana redonda cubierta por una membrana transparente.

El oído interno situado profundamente dentro del hueso

temporal del cráneo, contiene los receptores al sonido y los que ayudan al mantenimiento del equilibrio. Consiste en un conducto membranoso (laberinto membranoso), encerrado en un análogo óseo (laberinto óseo). El laberinto membranoso está constituido fundamentalmente por tres conductos semicirculares, de los que depende el sentido del equilibrio, que parten de una cavidad llamada utrículo conectada con otra llamada sáculo. Desde el sáculo el conducto membranoso gira en espiral varias veces para formar la cóclea ó caracol, que contiene los órganos que perciben las vibraciones sonoras. (fig 1).

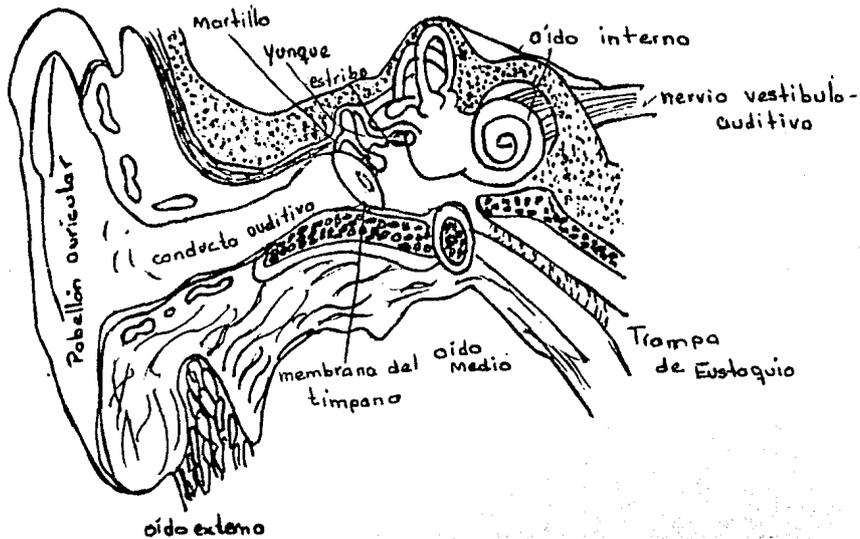


FIG 1.- ESQUEMA QUE REPRESENTA EL OIDO HUMANO

El laberinto óseo está lleno de un líquido de composición semejante al líquido cefalorraquídeo llamado perilinfa y el laberinto membranoso a su vez está lleno de otro líquido rico en potasio llamado endolinfa. (28)

AUDICION: Las variaciones de presión del aire causadas por los sonidos, hacen vibrar el tímpano y esas vibraciones son conducidas hasta la ventana oval por los huesecillos del oído medio, los cuales como ya dijimos las amplifican. Las vibraciones de la ventana oval, a su vez, alcanzan el caracol o cóclea a través del líquido del oído interno. El movimiento de este líquido repercute también en la membrana basilar en uno de cuyos lados esta el órgano de Corti, constituido por células pilosas sensitivas provistas de prolongaciones citoplasmáticas llamados estereocilios que alcanzan con su punta la membrana tectoria adyacente. Cuando el órgano de Corti se mueve por las variaciones de presión del líquido del caracol, sus células envían señales a las miles de fibras nerviosas con las que están vinculadas. Estas fibras, que forman primero el nervio coclear y después el nervio acústico, transmiten señales a las zonas auditivas del cerebro, donde son interpretadas como sonidos.

Aunque el esclarecimiento de las bases moleculares de la función auditiva es por demás interesante, en este trabajo se escogió estudiar la función vestibular por lo que se ha hecho referencia más amplia a ésta.

SENTIDO DEL EQUILIBRIO: La audición como ya dijimos no es la única función del oído. Todas las acciones desde la más simple a las más complejas, como caminar, correr, trepar e incluso sentarse, se sirven del sentido del equilibrio. Este sentido está sometido al control de la parte del oído interno denominada vestibulo, que registra únicamente las variaciones de movimiento (aceleraciones) y de posición de la cabeza así como la fuerza de

la gravedad.

El vestíbulo membranoso como se ha dicho, comprende los conductos semicirculares y las cavidades del utrículo y del sáculo que siguen la forma de su análogo óseo. (fig 2).

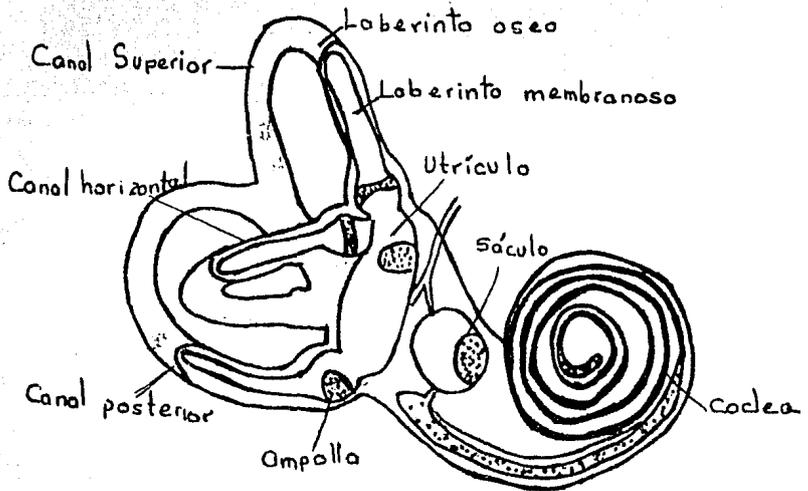


FIG 2.- DIAGRAMA DE LOS ORGANOS QUE COMPONEN EL OIDO INTERNO (Hudspeth A.J. 1983).

Los movimientos de la cabeza son percibidos por células especializadas en la mecanorrecepción, - las células pilosas sensitivas, - ubicadas en los conductos semicirculares, que se encuentran dispuestos en planos perpendiculares entre si y están llenos de líquido (la endolinfa). En la base de cada conducto existe una parte más ancha llamada ampolla, que contiene una porción de epitelio sensitivo. Las células pilosas sensitivas están coronadas por una cúpula de material gelatinoso, constituyendo la cresta ampular. Cuando la cabeza cambia de

posición, la endolinfa contenida en los conductos se mueve y ejerce presión sobre las células pilosas ubicadas en las crestas, las cuales generan señales. Estas señales son enviadas al cerebro donde son interpretadas como movimientos.

El utrículo y el sáculo, cavidades que se intercomunican entre sí contienen, así mismo, en regiones especializadas llamadas manchas ó maculas, células pilosas sensitivas responsables de detectar cambios en la aceleración lineal y de registrar la fuerza de la gravedad.

Otros factores que cooperan con el sentido del equilibrio son: la vista, que ayuda al individuo a adaptar la posición del cuerpo al ambiente, de manera que el equilibrio pueda conservarse correctamente. También contribuye al equilibrio la sensación del movimiento de las demás partes del cuerpo mediante receptores somáticos (sensores en las articulaciones y en la piel). En realidad el sistema del mantenimiento del equilibrio y la orientación es multimodal por lo que el estudio de la función vestibular resulta difícil, pero muy interesante. (fig 3). (35)

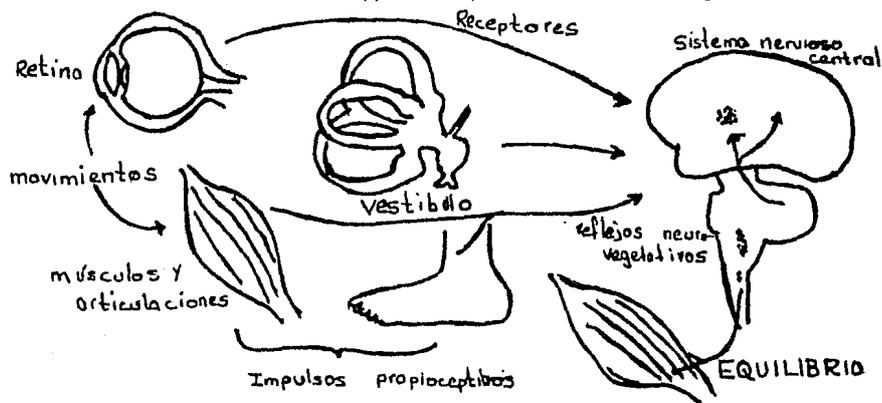


FIG 3.- ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS ORGANOS QUE CONSTITUYEN EL SISTEMA DEL MANTENIMIENTO DEL EQUILIBRIO Y LA POSTURA.

Las porciones de epitelio sensorial son los verdaderos órganos sensitivos del vestíbulo dispuestos de tal forma que constituyen un sistema muy eficiente para ayudar en la orientación en el espacio y la percepción de la aceleración lineal y angular. (fig 4).



Fig 4.- Porciones sensoriales en el oído interno, a,b,c son las crestas vestibulares. (modificada de "Tissues and organs de Kessel y Kardon Eds. 1970 p. 107)

El epitelio sensorial tiene la misma estructura tanto en la mácula como en las crestas y está constituido por 5 elementos: Las células pilosas que por su forma han sido clasificadas en tipo I y tipo II, las células de soporte, las sinapsis aferentes y eferentes y un mecanismo de acoplamiento mecánico que varía de las máculas a las crestas. (10).

Las células pilosas tipo I, tienen forma de botella, con la base redondeada y la porción del cuello angosta, en su parte apical presentan una cutícula a la cual está anclado un cilio verdadero o cinocilio y varias prolongaciones de la membrana plasmática llamados pelos sensorios ó estereocilios. En su parte basal están contactadas con la envoltura calciforme de la prolongación

terminal de una fibra nerviosa aferente. A esta prolongación llegan fibras nerviosas eferentes y forman sinapsis. (fig 5).

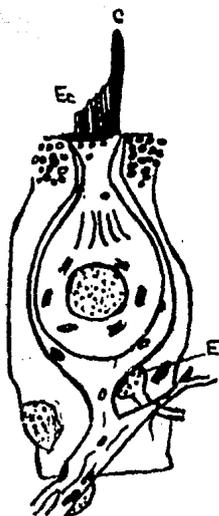


FIG 5.- ESQUEMA DE LA CELULA PILOSA TIPO I Y SUS INERVACIONES
Ec.- ESTEREOCILIO A.- TERMINAL NERVIOSA AFERENTE EN FORMA
DE CALIZ E.- TERMINAL NERVIOSA EFERENTE Y C.- CINOCILIO.

Las células pilosas tipo II son cilíndricas, columnares y al igual que las células tipo I, presentan en su parte apical una cutícula con un cinocilio y varios estereocilios. En su región sináptica, colocada basalmente, existen múltiples terminaciones nerviosas de las fibras vestibulares eferentes y aferentes que forman sinapsis de botón. (fig 6).

FIG 6.- ESQUEMA DE LA CELULA
PILOSA TIPO II.



Todas las células sensoriales contienen gran número de mitocondrias, lisosomas, el aparato de Golgi colocado en la región supranuclear y los ribosomas unidos al retículo endoplásmico. En las células sensoriales tipo I este retículo endoplásmico se encuentra por abajo del núcleo, el cual se encuentra en la porción más baja de la célula.

Separando cada una de las células sensoriales se encuentran células de soporte de epitelio cúbico con características especiales como un núcleo basal y gran cantidad de gránulos posiblemente secretores en la porción supra nuclear.

Las Áreas sensoriales en la parte vestibular del laberinto están rodeadas por las llamadas células oscuras, células especialmente diferenciadas, que probablemente toman parte en la producción y cambios iónicos de la endolinfa.

La célula pilosa es un transductor mecano-eléctrico extremadamente sensible, capaz de convertir una fuerza mecánica (el estímulo aplicado a los pelos sensorios) en una señal eléctrica (mensaje enviado al cerebro).

Como ya dijimos estas células presentan sinapsis de tipo aferente que transmiten la información al sistema nervioso central y están moduladas por sinapsis eferentes procedentes de centros superiores.

VIAS VESTIBULARES: Las vías nerviosas que conectan el aparato vestibular con el cerebro y la médula espinal son complejas y no están tan bien rastreadas como lo están las de otros sistemas sensoriales; se sabe, sin embargo, que todas las señales nerviosas del nervio vestibular viajan inicialmente hacia uno de

los dos destinos siguientes: el tallo cerebral, justo sobre la médula espinal, o al cerebelo, en la parte posterior del cerebro. Las fibras del nervio vestibular que llegan al tallo cerebral terminan en alguno de los cuatro grupos celular-nervioso llamados núcleos vestibulares: el superior, el lateral o de Deiters, el medio, el descendente o inferior.

Tres de estos grupos neuronales -el medio, el lateral y el inferior- reciben la mayoría de las terminaciones centrales de las fibras aferentes que inervan los órganos otolíticos (utrículo y sáculo) del laberinto. Las fibras nerviosas aferentes que inervan los canales semicirculares terminan principalmente en los núcleos vestibulares superior, medio y lateral, pero muchas fibras continúan hasta el cerebelo.

Además de estas vías vestibulares aferentes los núcleos vestibulares también reciben fibras de la médula espinal, del cerebelo, del tallo cerebral y de centros superiores (34).

El tracto vestibuloespinal que es directo, se origina exclusivamente en el núcleo vestibular lateral. Las fibras atraviesan la médula oblongada detrás del núcleo olivar y continúan por el funículo anterior de la médula espinal. Las fibras vestibuloespinales terminan en las neuronas motoras alfa y gamma en todos los niveles de la médula espinal, especialmente en las intumescencias cervical y lumbar. Este tracto es de primordial importancia para regular el tono muscular en todo el cuerpo a fin de mantener el equilibrio.

La porción vestibular del cerebelo o arquicerebelo recibe fibras de los núcleos vestibulares superior, medio e inferior, además

de un pequeño número de fibras directas del nervio vestibular. En dirección opuesta, las fibras del arquicerebelo terminan en el complejo nuclear vestibular. El papel del arquicerebelo en cuanto al mantenimiento del equilibrio se efectúa a través de las vías que van de los núcleos vestibulares a las neuronas motoras bajas y mediante las conexiones reticuloespinales y cerebelorreticulares, que influyen en el tono muscular en el contexto de postura y locomoción.

Dentro del tallo cerebral en la porción ascendente dentro del fascículo longitudinal medio, las fibras que lo constituyen conectan los núcleos vestibulares con los núcleos de los nervios abductor, troclear y oculomotor. Las fibras del núcleo vestibular superior son directas en tanto que las de los núcleos lateral e inferior son cruzadas, y el núcleo vestibular medial contribuye con fibras para ambos fascículos. Esta parte del fascículo longitudinal medial proporciona movimientos sincronizados o conjugados de los ojos, coordinados con movimientos de la cabeza a fin de mantener la fijación visual. Dicha coordinación se basa principalmente en la información recibida por los núcleos vestibulares de los conductos semicirculares. (2B).

La actividad vestibular también alcanza al tálamo, al colículo superior y otros centros superiores pero la vía exacta aún no se conoce. (fig 7).

La integridad del aparato vestibular ha sido tradicionalmente evaluada por medición de los movimientos oculares (nistagmus) producidos en respuesta a la estimulación de las crestas ampulares, ya que los reflejos oculomotores en especial la fase lenta del nistagmus son producidas como respuesta a estímulos

vestibulares. (6).

NISTAGMUS: Consiste en un movimiento ocular sincrónico compuesto de dos fases: la fase lenta, en la que los ojos se mueven en forma progresiva semejante al movimiento de los ojos para enfocar un objeto y la fase rápida, en la cual hay un movimiento brusco (una rápida sacudida) de retorno de los ojos al punto en donde se

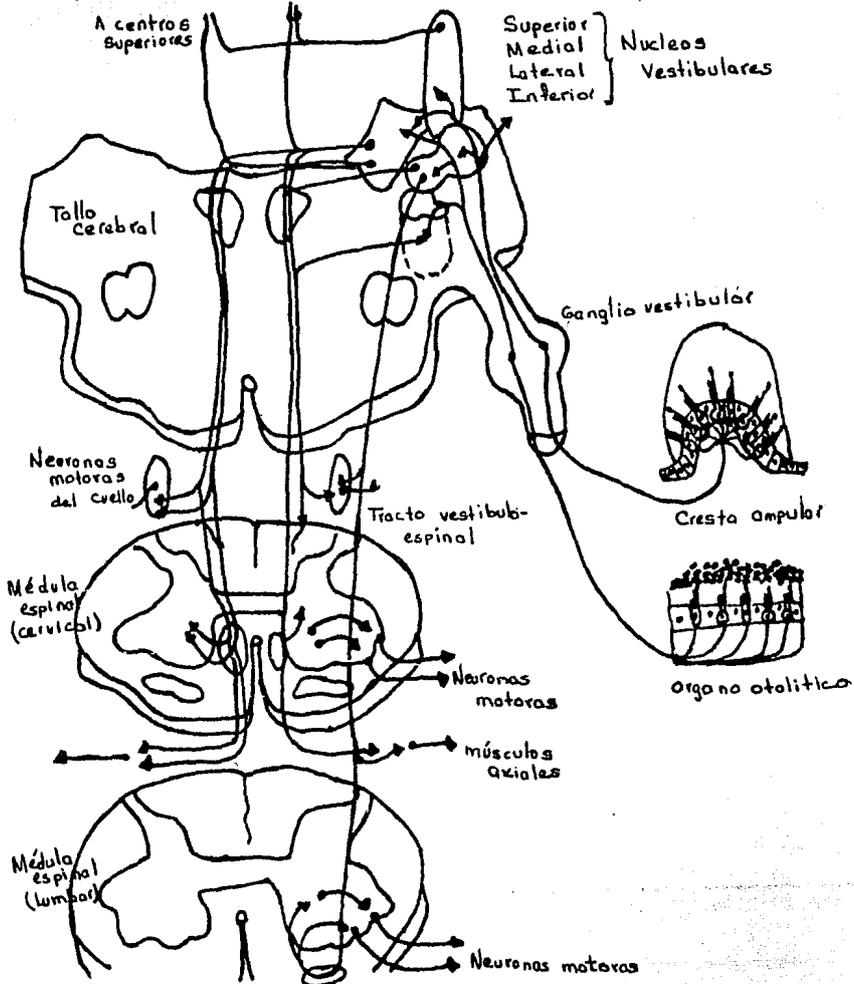


FIG 7.- ESQUEMA DE LAS VIAS VESTIBULARES (Netter, F.H., 1903).

inicio la fase lenta. Por convención, la dirección del componente rápido, es usado para especificar la dirección del nistagmus.

El nistagmus se caracteriza por diferentes parámetros: forma, dirección, frecuencia, intensidad y circunstancias en que se presenta, y estas características nos orientan en el diagnóstico. En la mayoría de los casos el nistagmus se puede clasificar en dos categorías:

Nistagmus optocinético: es un nistagmus vertical puro, rotatorio puro o multidireccional, es de origen central, y se produce por prolongada y recurrente estimulación de las vías visuales sensibles a imágenes en movimiento. Esta forma de nistagmus se puede inducir clínicamente colocando al sujeto en un cilindro rotatorio marcado con rayas luminosas y oscuras alternadas.

Nistagmus vestibular: es un nistagmus horizontal rotatorio; se origina por un estímulo prolongado y asimétrico en el receptor de un canal semicircular o por desórdenes neurológicos que inducen estimulación asimétrica de los núcleos vestibulares o en la vía vestibulocerebelosa. El nistagmus vestibular puede inducirse clínicamente, es una prueba muy importante de la función normal vestibular, y se le conoce como nistagmus calórico. Cuando se inyecta en el canal auditivo externo de un oído agua fría ó tibia dependiendo de la orientación de la cabeza del paciente, el calor o el frío producen una excitación prolongada sobre uno o más canales semicirculares produciéndose así el nistagmus con el componente rápido en dirección opuesta al lado estimulado si se usa agua fría y con dirección del oído estimulado si el agua está tibia. (18).

Como hemos dicho para que se produzca el nistagmus vestibular es necesario que la cresta ampullar de un canal semicircular se estimule asimétricamente. La estimulación asimétrica se produce cuando uno ó varios canales semicirculares de un lado son excitados por una aceleración angular sostenida mientras que los del otro lado se inhiben. Por ejemplo veamos lo que sucede cuando se presenta una aceleración angular horizontal hacia la izquierda: los impulsos del canal semicircular horizontal izquierdo excitan a las neuronas de los núcleos vestibulares lateral y medial izquierdos, mientras que los núcleos vestibulares del lado derecho reciben menos impulsos que lo normal de el canal semicircular horizontal derecho. Las neuronas de los núcleos vestibulares del lado izquierdo actúan excitando a las neuronas motoras que controlan a los músculos rectus medial izquierdo y rectus lateral derecho de los ojos y además, excitan al nervio abductor (VI par de los nervios craneales) que amplifica la excitación del músculo rectus medial izquierdo. Simultáneamente las neuronas motoras que controlan los movimientos antagónicos de estos músculos están inhibidas por los núcleos vestibulares. Como los estímulos al canal semicircular continúan, el circuito en los núcleos vestibulares y la formación reticular actúan como un integrador para producir un constante incremento en la señal excitatoria e inhibitoria que llega a las neuronas motoras extraoculares. Los ojos, entonces se mueven lentamente hacia la derecha.

Cuando la actividad vestibulo-extraocular responsable de la fase lenta del nistagmus llega a cierto nivel, es interrumpida abruptamente por el mecanismo de la fase rápida que regresa los

ojos a su posición original. Este mecanismo depende de un grupo separado de neuronas que repentinamente se activan cuando el nervio oculomotor llega a un nivel de excitación alto. (fig B).

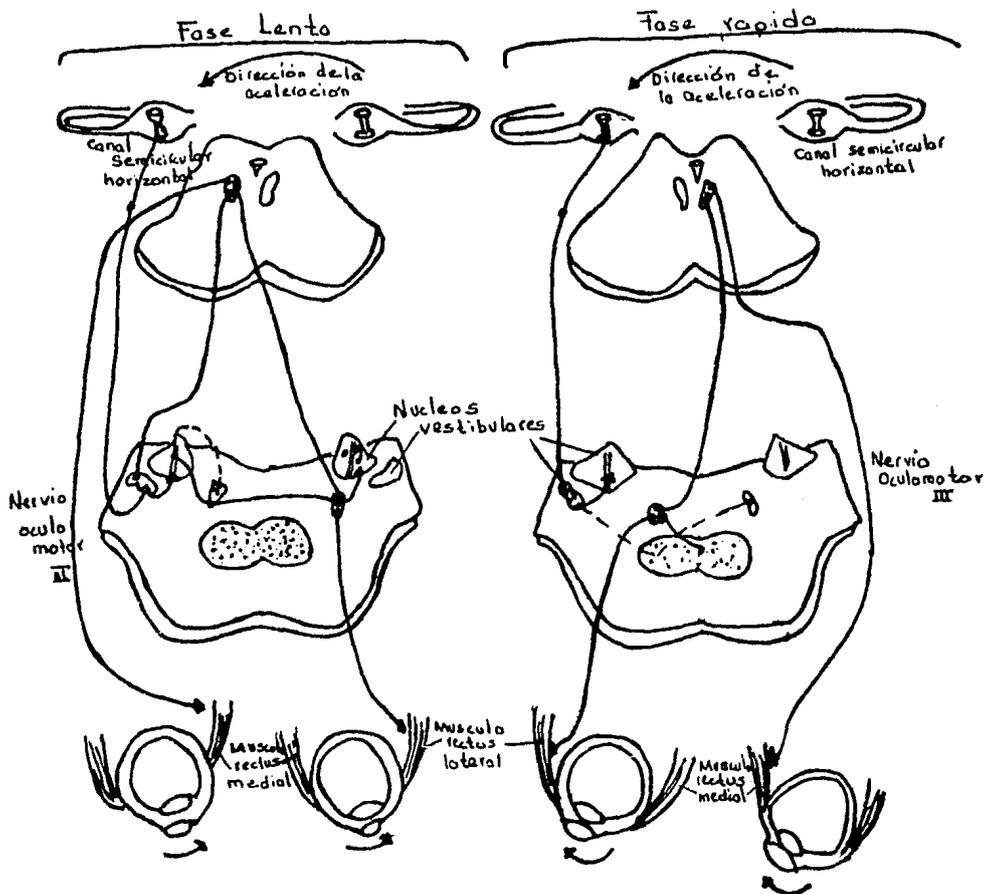


FIG. 6.- ESQUEMA QUE REPRESENTA LAS VIAS PARA LA PRODUCCION DEL NISTAGMUS (Netter, F.H., 1983).

Mecanismos de transucción de las células pilosas

Como ya dijimos la parte epical de las células pilosas consiste

de 40 a 80 esterocilios y en el vestibulo un cilio verdadero o cinocilio, el cilio aparece en el extremo del haz y los esterocilios aumentan de tamaño desde el otro extremo siendo más largos los más cercanos al cinocilio.

Los pelos sensorios de los mecanoreceptores de las crestas están incluidos en la cúpula que se extiende hasta el lado opuesto de la ampolla. (fig 9). La aceleración angular en el mismo plano que el canal semicircular causa que el fluido dentro del canal, por inercia tienda a resistir el movimiento, presionando contra la cúpula, está presión causa que la cúpula se deforme ya sea en forma cóncava o convexa doblando así a los pelos sensorios. este doblamiento inicia un fenómeno denominado transducción, que altera la polarización eléctrica de la superficie de la membrana de las células pilosas. La células se despolarizan si la punta del haz de esterocilios se dobla hacia el cinocilio mientras que se hiperpolariza cuando se estimula en dirección opuesta. Debido a que todas las células pilosas de las crestas están orientadas en la misma dirección con respecto al cinocilio, todas responden en la misma forma. (fig 9).

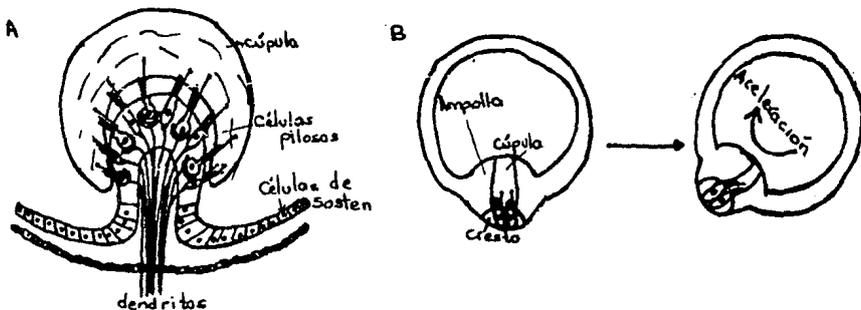


FIG 9.- A.- REPRESENTA LA AMPOLLA DE UNO DE LOS CANALES SEMICIRCULARES (Barr M.L. 1978) B.- REPRESENTA LOS ESTÍMULOS QUE RECIBEN LAS CRESTAS (Hudspeth 1983).

Los pelos de las células sensoriales en las máculas están cubiertas por una membrana otolítica gelatinosa cubierta con cristales de carbonato de calcio, llamados otoconias. (fig 10) Debido a que la otoconia es más densa que el fluido que la rodea, la membrana otolítica tiende a moverse bajo la influencia de la aceleración lineal. Por ejemplo, cuando la mácula del utrículo normalmente en posición horizontal se mueve, la fuerza de gravedad tiende a mantener la membrana otolítica en posición horizontal, esto hace que se doblen los pelos sensorios. Puesto que las máculas contienen células pilosas que tienen dos diferentes orientaciones, este doblamiento hace que algunas células se despolaricen y otras se hiperpolaricen (fig 10) (20).

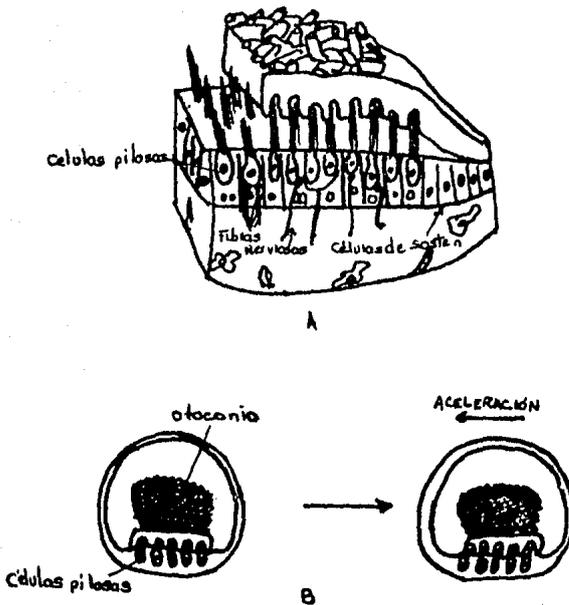


FIG 10. - ESQUEMA QUE REPRESENTA EL RECEPTOR OTOLÍTICO (Parker 1901) B. - REPRESENTA LOS ESTIMULOS QUE RECIBEN LAS MÁCULAS (Hudspeth 1983).

Se ha pensado que el mecanismo mediante el cual se lleva

a cabo la transducción se encuentra asociado a canales iónicos presentes en los estereocilios. (20) En la célula pilosa hay siempre canales iónicos abiertos, cuando los estereocilios se doblan en dirección del cinocilio se abren más canales asociados en la zona apical, provocando la entrada de iones potasio (21) atraídos por el potencial negativo de la célula pilosa que cae a -40 milivolts. Si los estereocilios se doblan en dirección opuesta los canales que inicialmente estaban abiertos son rápidamente cerrados y el potencial de membrana se decaende a -65 milivolts. Cuando los canales de transducción de la célula pilosa se abren hay un cambio en el potencial de reposo de la propia célula que se extiende hasta su parte basal. El potencial ahora se denomina potencial receptor. Este cambio de potencial provoca que se abran canales iónicos en la parte basal de la célula permitiendo selectivamente la entrada de Ca^{2+} .

Mecanismos de transmisión de las fibras nerviosas.

Una vez que los iones calcio son admitidos en las células pilosas, por un fenómeno que aún se desconoce para estas células, esto ocasiona que un mensajero químico sea liberado a la región intersináptica. Cuando esta substancia atraviesa este espacio y llega a la terminal nerviosa aferente se une con los receptores específicos sobre la membrana de ésta y provoca un cambio en la permeabilidad de la membrana lo que a su vez provoca una despolarización que produce un potencial de acción transformándose así en una señal eléctrica (impulso nervioso) que viaja hacia el cerebro. (fig 12). A este tipo de sinápsis se

les llama sinápsis química ya que están mediadas por un mensajero químico, que se denomina neurotransmisor.

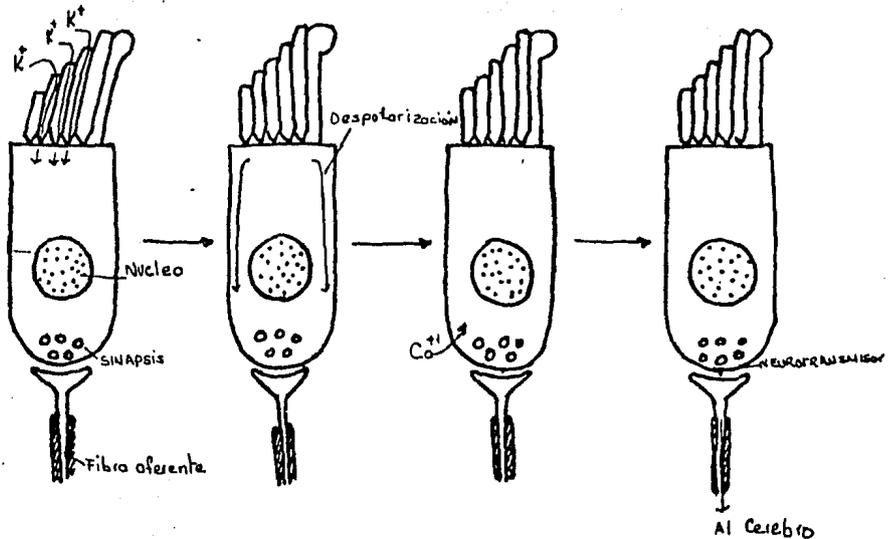


FIG 11. - REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS EVENTOS QUE DESENCADENAN UN ESTIMULO SOBRE EL HAZ DE ESTEREOCILIOS EN LA CELULA PILOSA

Existen evidencias de tipo morfológico y fisiológico de que la sinapsis tanto aferente como eferente a nivel vestibular son efectivamente de naturaleza química aunque se desconoce la identidad del mediador. (fig12). (3), (11), (12), (37), (38), (43), (44) y (46).

Según Werman (42) los criterios que deben cumplirse para que una sustancia química sea aceptada como neurotransmisor son :

1) Identidad de acción: el transmisor presupuesto debe inducir el mismo resultado que el transmisor natural en las células postsinápticas. Es decir debe modificar a través de los mismos

mecanismos la conducta iónica de la membrana.

- 2) Presencia de enzimas determinantes de la síntesis del positio transisor en la neurona que lo produce.
- 3) Inactivación. Presencia de un sistema responsable de la eliminación del transisor una vez efectuada su acción.
- 4) Presencia. El transisor propuesto debe estar presente en la neurona que lo produce y encontrarse potencialmente accesible para su utilización.
- 5) Liberación del transisor. Durante la estimulación nerviosa la sustancia transmisora debe ser detectada en el fluido extracélular de la región de la sinápsis activada.
- 6) Identidad farmacológica. Agentes que interactúan con los agentes sinápticos fisiológicos debe interaccionar con el transisor propuesto en la misma forma.

En el vestibulo, de los neurotransmisores de los que se han acumulado más evidencias siguiendo los criterios de Werman son la acetilcolina (Ach) como uno de los más probables mediadores eferentes y el ácido gamma-amino butirico (GABA) como uno de los aferentes.

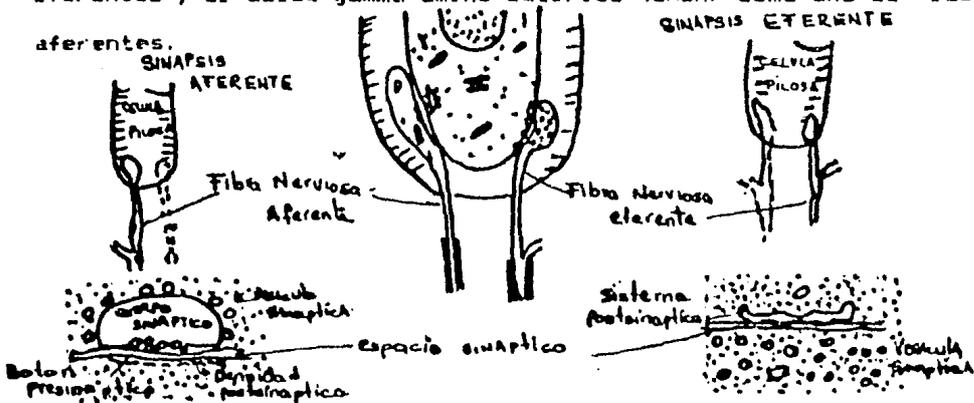


FIG 12. -- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS UNIONES SINAPTICAS QUE CONTACTAN CON LAS CELULAS PILOSAS. (Benschelun, 1980).

Antecedentes que apoyan al GABA y a la Ach como
neurotransmisores en el vestibulo

Para el GABA las evidencias que apoyan su participación en la neurotransmisión vestibular son las siguientes:

1) Las respuestas espontáneas y evocadas en el laberinto de la raya son inhibidas por picrotoxina (un inhibidor del receptor a GABA) (14).

2) Se ha encontrado síntesis de GABA a partir de glutamato en el vestibulo de peces lo que implica la presencia de la descarboxilasa glutámica (GAD) (13).

3) El GABA aplicado ionotópicamente imita la acción del estímulo neuronal en el laberinto del gato (15).

4) La picrotoxina aplicada sistémicamente, bloquea los efectos del vértigo de origen periférico sensorial vestibular. (9).

5) Presencia de un sistema de captación de alta afinidad de 3H GABA en vestibulo de pollo (30)

6) Actividad de GAD en crestas aisladas del vestibulo del pollo (28)

7) Presencia de un receptor de tipo postsináptico (33).

Y para la Ach:

1) Se ha demostrado histoquímicamente actividad de la acetil colinesterasa (AChE), enzima que degrada a la Ach, en la cresta ampular, sáculo y utrículo en el oído interno de la chinchilla y el cuy (23)

2) La presencia AChE a lo largo de la base interna de las células pilosas tipo II (7).

3) Se ha demostrado actividad de colin acetiltransferasa (CAT) la enzima que sintetiza acetilcolina, en las fibras eferentes de la línea lateral del pez y se han registrado potenciales inhibitorios postsinápticos imitados por Ach y bloqueados por tubocurarina (13).

4) Se ha demostrado actividad de CAT en crestas aisladas del oído interno del pollo y la aparición de esta actividad coincide con la llegada tardía de las fibras eferentes (31).

La mayoría de las evidencias que apoyan al GABA y a la acetilcolina como neurotransmisores en el vestibulo se han obtenido en peces, anfibios y aves; en mamíferos este tipo de estudios han sido muy escasos principalmente a causa de la inaccesibilidad de su oído interno, aunque se sospecha que también estos dos mediadores participan en la neurotransmisión en el vestibulo de los mamíferos. En este trabajo se tratará de aportar evidencias que apoyen esta suposición usando como modelo el vestibulo aislado del cuy (*Cavia cobaya*). Con este fin, se determinará la actividad de las enzimas sintetizantes de acetilcolina y GABA ya que de los criterios para postular una sustancia como neurotransmisor antes mencionados, la presencia de las enzimas que los sintetizan es particularmente importante, no sólo porque la velocidad de formación del neurotransmisor, como de cualquier metabolito, depende de la actividad de la enzima sintetizante, sino también porque, la poza metabólica de la cual se liberan preferentemente los neurotransmisores al espacio sináptico es una poza de neurotransmisor recientemente

sintetizado. Además la localización de las enzimas sintetizantes, desde el punto de vista de su distribución tanto regional como subcelular, se correlaciona bastante bien con la función sináptica del neurotransmisor.

Al tratar de implicar tanto al GABA como a la Ach como neuromediadores en el vestíbulo, se infiere que sus enzimas de síntesis se comportarán bioquímicamente como aquellas descritas para el sistema nervioso central. Esto no sería raro para la terminal sináptica eferente, aunque tampoco para la célula pilosa (que sería la presináptica para la fibra aferente) ya que estas células han sido llamadas paraneuronas, pues derivan embriológicamente del ectodermo (40).

Ahora se revisarán algunas propiedades de estas enzimas, que como se ha dicho, han sido consideradas excelentes marcadores de neuronas GABAérgicas y colinérgicas.

Glutamato descarboxilasa (GAD) (EC4.1.1.15)

La GAD cataliza el único paso de síntesis de GABA, la descarboxilación del glutamato según la reacción siguiente:



Como todas las descarboxilasas de aminoácidos la GAD requiere de fosfato de piridoxal como coenzima: existen evidencias experimentales de que la enzima no está saturada con su coenzima, ni in vitro ni in vivo, y de que gran parte de su actividad depende del fosfato de piridoxal libre. Esta coenzima parece ser un importante factor de la regulación de la actividad de la GAD.

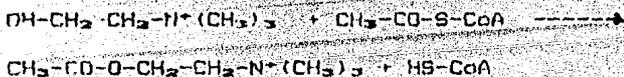
El glutamato, sustrato de la GAD, está fácilmente disponible,

se conoce bien sus rutas de formación a partir de intermediarios del ciclo de Krebs, de las cuales la más importante parece ser la transaminación del α -cetoglutarato con otros aminoácidos, particularmente el aspartato (transaminasa glutámico-oxalacética). Además existen evidencias de que hay una poza de glutamato derivada de la glutamina, que forma un compartimento especial y que probablemente esté íntimamente relacionada con la poza liberable de GABA. En cuanto al fosfato de piridoxal, se sintetiza a partir de piridoxal y ATP por acción de la piridoxal cinasa.

En las terminales GABAérgicas, el GABA es sintetizado por dos poblaciones diferentes de la GAD. Una de ellas es la enzima soluble, que solo depende de coenzima firmemente unida a la apoenzima y que sintetiza GABA a partir de una poza de glutamato formada preferentemente a partir de glutamina. El GABA formado de esta manera se libera por despolarización de la terminal, por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} . La segunda población de la GAD que se señaló es aquella que se encuentra probablemente unida a la membrana presináptica in vivo, en presencia de K^+ y/o Ca^{2+} , y depende del fosfato de piridoxal libre. El glutamato que esta población de GAD usa como sustrato proviene probablemente del ciclo de Krebs. (fig 13).

Colina acetiltransferasa (CAT) (EC 2.3.1.6)

La CAT cataliza la síntesis de acetilcolina a partir de colina y acetil coenzima A, según la reacción siguiente:



La colina para la síntesis de acetilcolina proviene del medio

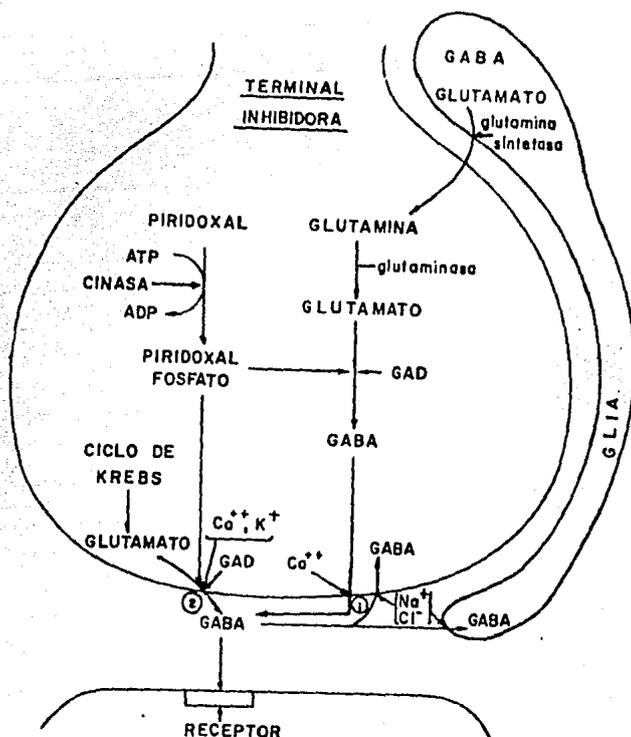


FIG 13 MODELO BIOQUÍMICO DEL FUNCIONAMIENTO DE LAS SINAPSIS GABAérgicas. EXISTEN DOS POBLACIONES DE LA GLUTAMATO DECARBOXILASA (GAD), UNA SOLUBLE Y OTRA UNIDA A MEMBRANA CON LA PARTICIPACION DE POTASIO Y /CALCIO. (TAPIA Y MEZA 1983).

extracelular mediante un sistema de captura de alta afinidad dependiente de Na^+ . (22) En cuanto a la acetil-CoA que se usa para la síntesis de acetilcolina, proviene fundamentalmente del piruvato, aunque existen evidencias de que también puede formarse en pequeñas cantidades a partir de acetato y de citrato.

La síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato está catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (CPDH). Puesto que, la CAT es una enzima soluble que se encuentra en el citoplasma de las terminales sinápticas, y el CPDH ha sido localizado en las mitocondrias, se ha planteado el problema de cómo la acetil-CoA

mitochondrial se hace accesible a la CAT citoplásmica, por lo que se han propuesto tres diferentes fuentes de acetil-CoA para la síntesis de acetilcolina (22).

a) La acetil-CoA (intermitocondrial) es convertida en citrato el cual es transportado al citoplasma donde la ATP: citrato liasa (EC4.1.3.6.) convierte al citrato a acetil-CoA y oxalacetato.

b) La acetil-CoA por si misma puede ser transportada directamente o difundir a través de la membrana mitocondrial.

c) La terminal nerviosa colinérgica contiene un CPDH soluble.

Estudios cinéticos de la CAT han demostrado que existen dos poblaciones diferentes una soluble y la otra unida a la membrana (Binishin, 1982), y por electroforesis se han encontrado diferentes formas moleculares en cerebro de rata, gato, conejo, ratón y mono así como en el órgano eléctrico del pez torpeda que difieren sólo en su carga de superficie.

Se ha visto que una de las propiedades de la CAT es que es activada por sales y se propone que el ión cloruro podría servir como un regulador específico (fig 14) (41).

Localización celular de la GAD y de la CAT

Para determinar la localización celular de estas enzimas se pensó en aprovechar el efecto de alguna sustancia que dañe selectivamente un tipo celular del vestibulo dejando intactos los demas.

Los antibioticos del grupo de los aminoglicosidos por ejemplo estreptomycin, kanamicina y neomicina muestran efectos

indeseables sobre todo al ser usados en tratamientos largos, uno

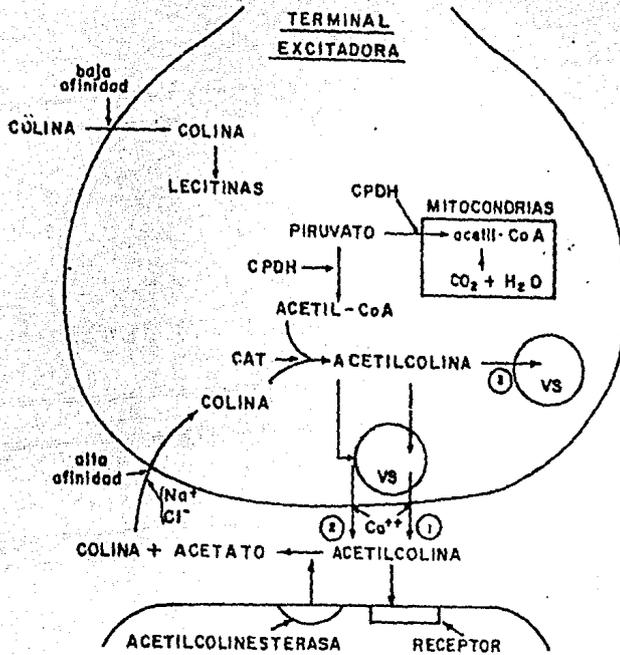


FIG 14 MODELO BIOQUIMICO DEL FUNCIONAMIENTO DE LAS SINAPSIS COLINERGICAS. LA ACETILCOLINA SE SINTETIZA POR LA COLINA ACETILTRANSFERASA (CAT). A PARTIR DE POZAS ESPECIFICAS DE COLINA Y ACETILCOLINA. (TAPIA Y MEZA 1983).

de estos efectos es una acción tóxica sobre los mecanismos de la audición y el equilibrio por lo que se les denomina sustancias ototóxicas. Aunque existen algunos que dañan principalmente el vestíbulo como la estreptomina por ejemplo y otros que son francamente cocleotóxicos como la kanamicina, la mayoría de los medicamentos ototóxicos son tanto cocleotóxicos como vestibulotóxicos, esto se debe probablemente al origen embriológico común de estas dos partes del oído interno que resulta en similitudes morfológicas, funcionales y bioquímicas en

las células pilosas.

En general de los antibióticos aminoglucosidos más conocidos el orden de vestibulotoxicidad es estreptomina > sisomicina > gentamicina > tobramicina > ó = netilmicina > amikacina = kanamicina = neomicina = dihidroestreptomina (5) Por su mayor especificidad vestibulotóxica se escogió, por tanto, la estreptomina.

Estreptomina

La estreptomina fué aislada por primera vez de *Streptomyces griseus* en 1943 por Waksman quien demostró que este antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* y desde entonces se convirtió en uno de los remedios más efectivos contra todos los tipos de tuberculosis. Sin embargo el uso de la estreptomina en la actualidad está limitado por sus efectos neurotóxicos y ototóxicos reportados por primera vez en 1945 por Hinshaw y Feldman (46). Cerca del 75% de los pacientes a los que se les administran 2 gr de estreptomina por 60 a 120 días manifiestan algunas disfunciones vestibulares detectables como pueden ser: náuseas, vómitos y dificultad para mantener el equilibrio que persiste por 1 a 2 semanas, vértigo cuando se ponen de pie y dificultad para sentarse o pararse en la oscuridad. Estos síntomas "agudos" desaparecen poco a poco ya que son superados por procesos compensatorios y quedan latentes de modo que solo se presentan cuando se cierran los ojos. (48).

El mecanismo tóxico de la estreptomina sobre las células pilosas aún no está muy bien estudiado aunque se ha propuesto que actúa de dos maneras generales; una de ellas sobre la membrana

celular y la otra en el metabolismo (26).

Al alcanzar la estreptomicina el fluido del oído interno se produce una unión instantánea del antibiótico a las células pilosas dando como resultado una reducción del potencial negativo de la membrana por interacciones electrostáticas causando a la vez un incremento en la entrada de iones potasio debido al cambio en la permeabilidad de la membrana (22). En cuanto al metabolismo se ha encontrado que la estreptomicina interactúa con los ribosomas de las células pilosas causando una alteración en el código genético dando como resultado una introducción errónea de aminoácidos en las proteínas que se están produciendo, lo que puede interferir con los procesos vitales de mantenimiento y reparación de la membrana celular. (25) y (39).

Por otra parte estudios con microscopía electrónica muestran que el daño de la estreptomicina sobre las células sensoriales del vestíbulo comienza con daños en el núcleo y las mitocondrias (8).

Los efectos ototóxicos de la estreptomicina estudiados por microscopía electrónica consisten en la destrucción selectiva de las células pilosas del vestíbulo, afectando principalmente a las células tipo I y más tarde con dosis mayores a las células de tipo II mientras que las células de soporte y las terminales nerviosas no sufren ningún daño ni aún a dosis tan altas como 300 mg / Kg de peso (8).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se tomó como modelo el laberinto membranoso aislado del oído interno del cual, midiendo en un homogenado la GAD y la CAT y abordando la localización celular por destrucción selectiva de las células

pilosas con estreptomycin. Además se estudiaron algunas de las propiedades de la GAD y se verificó la destrucción de las células pilosas por microscopía electrónica.

MATERIAL Y METODOS

Se usaron cuyes sanos pigmentados (*Cavia cobaya*) recién nacidos de una colonia ubicada, en el Laboratorio de Otoneurobioquímica del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., desarrollada a partir de pies de cría obtenidos de la Granja de Zapotitlán de la U.N.A.M.

Para la obtención del tejido se disecaron los laberintos membranosos de ambos oídos internos de un cuy para cada determinación de la actividad de la GAD y los de dos cuyes para la CAT.

Las técnicas de disección fueron implementadas en nuestro laboratorio y consisten en: abrir el cráneo sagitalmente, extraer totalmente el cerebro, separar las bulas auditivas del hueso temporal y bajo el microscopio estereoscópico extraer las crestas ampulares, el utrículo y el sáculo los cuales se reciben en el medio de reacción enfriado en hielo.

Determinación de la actividad de GAD.

La actividad de la glutamato descarboxilasa se determinó por el método de Wayne y Brady (47) con algunas modificaciones.

Reactivos:

- 1.- Buffer de KH_2PO_4 (MCR), 0.2M pH7.3, 1.361g/50ml
- 2.- Fosfato de piridoxal (SIG), 10^{-4} (final) 0.011g/5ml
- 3.- Mercaptoetanol (SIG), 10mM (final) 0.1755ml/25ml.
- 4.- Acido L. glutámico (SIG), 10mM (final) pH 7.3 0.2646/50ml.
- 5.- Acido D,L. ($1-^{14}\text{C}$) glutámico (New England Nuclear, Chicago USA) 0.06 μCi (final), 0.01ml/0.5ml, actividad específica 54mCi/mmol.
- 6.- Liquifluor 250ml (1g de 2.5 difeniloxazol (SIG). 0.0125g de

1,4bis 2-S feniloxazolil) en 250ml de tolueno (J.T.B.M.).

7.- H_2SO_4 (J.T.B.M.) 3.6N, 9.8ml/100ml de H_2O .

8.- Hidróxido de hiamina en metanol 1M (AMER).

Clave de la fuente de reactivos: SIG.- proveniente de la compañía Sigma, San Luis Missouri, E.U.A.; J.T.B.M.- J.T.Baker, México; MRC.- Merck, México y AMER.- Amersham.

Fundamento : La GAD cataliza la descarboxilación del grupo - carboxilo del glutamato formando GABA y CO_2 . En nuestro ensayo para la determinación de la actividad de GAD se usa como fuente de la enzima el tejido vestibular homogenado el cual se incuba con ácido glutámico marcado con carbono 14 en el carbono 1 y fosfato de piridoxal, el CO_2 marcado que se desprende al terminar la reacción se captura en una base fuerte y su radiactividad es evaluada en un contador de centelleo líquido.

Procedimiento: Una vez que se han extraído las crestas ampulares, el utrículo y el sáculo de los dos oídos internos de un cuy se reciben en un tubito de 1ml sumergido en hielo que contiene el medio de reacción el cual está constituido por:

	Volumen adic- cionado	conc. final
Acido L glutámico	200 μ l	10mM
mercapto etanol	80 μ l	10mM
Fosfato de piridoxal	40 μ l	10 $^{-4}$ M
Buffer de fosfatos	160 μ l	0.2M

Se pasan a un homogenizador de vidrio y se homogenizan dando 20 golpes (550rpm) con un pistón de teflón.

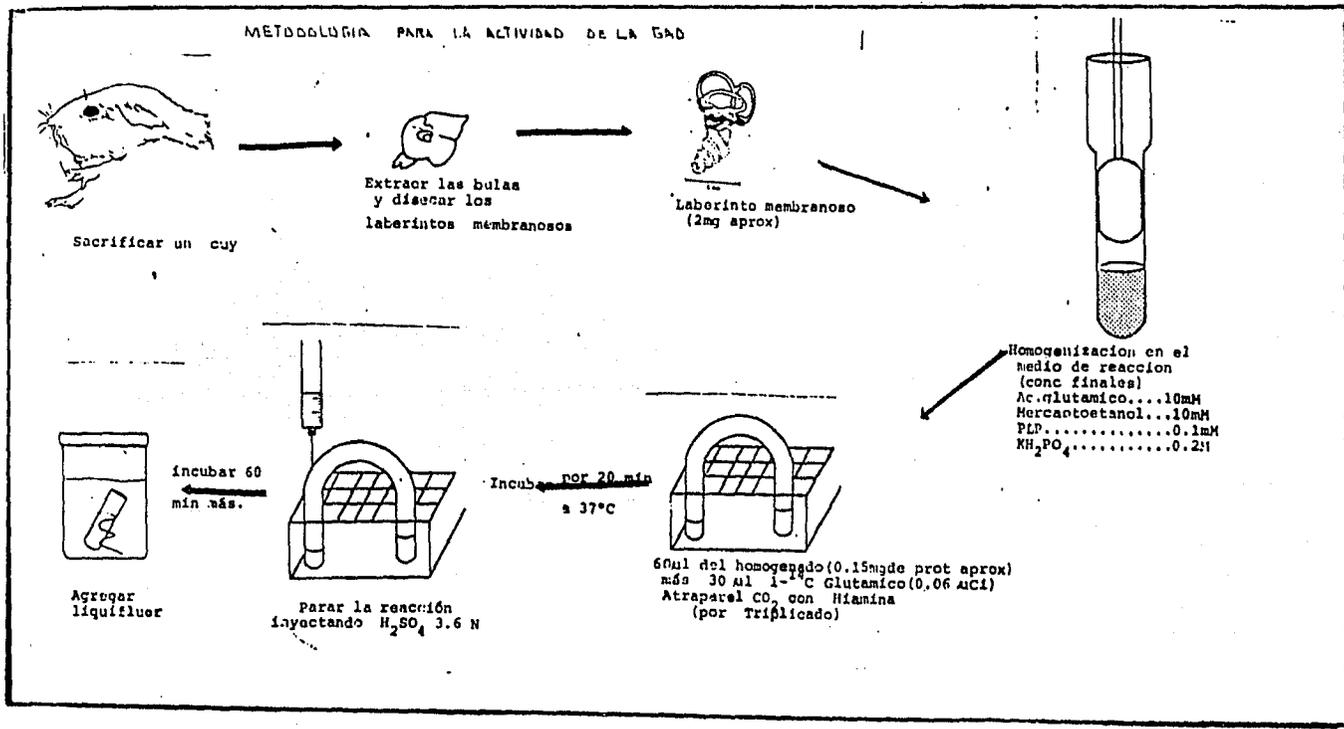
Se colocan 60 μ l de este homogenado y 30 μ l de Acido D.L.(1- ^{14}C) glutámico (0.06 μ Ci) en tubos de 3mm de diametro y 30mm de largo, obteniendo un volumen total de 90 μ l por tubo.

Tubos	Ac DL (1- ¹⁴ C) glutámico 30µl	H ₂ SO ₄ 50µl	Homogenado 60µl
1			
2	problemas		
3			
4			
5	blancos		
6			

A los tubitos que van a ser blancos se les agregan 50 µl de H₂SO₄ 3.6N para parar la reacción al tiempo "cero". Una vez que se ha agregado el homogenado se agita la mezcla en un vortex y cada tubito se conecta mediante una manguera de latex de 10 cm de longitud a otro tubito que contiene 0.1 ml de hidróxido de hiamina. Se incuban inmediatamente a 37°C por 20 minutos. Cada determinación se realiza por triplicado, se detiene la reacción inyectando a través de la manguera 100µl de H₂SO₄. Se post-incuba por 60min más para que se desprenda todo el CO₂. Pasado este tiempo los tubitos que contienen la hiamina se ponen en frascos viales con 8ml de liquiflúor y con una varilla de vidrio se saca la hiamina del tubito para que se mezcle con el líquido de centelleo. Se deja reposar por 24 horas en la oscuridad. Se determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido modelo Beckman L.S. 7000 dos minutos en el canal de carbono catorce. El homogenado sobrante se guarda en refrigeración para la determinación posterior de proteínas. (fig15).

Determinación de la constante de Michaelis.

La determinación de la GAD se realizó como se describe arriba en presencia de varias concentraciones (entre 0.1 y 20mM) de ácido glutámico.



34 (6)

Fig 15.- Esquema que representa el procedimiento para determinar la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD).

Determinación del pH óptimo de la reacción

Se efectuó determinando la actividad de GAD en experimentos distintos realizados como se indica arriba pero amortiguados a los pHs de 5.3, 6.3, 7.0, 7.3 y 8.3.

Evaluación del efecto de la concentración de proteína sobre la actividad de GAD

La GAD se determinó siguiendo el método arriba indicado pero a concentraciones crecientes de proteína en el homogenado.

Determinación de la actividad de CAT

La actividad de la CAT se determinó por el método de Fonnum (17) modificado por Meza y López (1984) en donde un homogenado de tejido vestibular se incubó en una solución amortiguadora que contiene acetil-Coenzima A marcada con tritio en el acetato y colina. La acetilcolina marcada que se forma en la reacción es extraída y su radiactividad es evaluada, por espectrometría de centelleo líquido.

Reactivos :

- 1.- Buffer de NaH_2PO_4 (M.R.C.) 0.038 M, pH 7.4, 2.626 g / 500 ml
- 2.- NaCl (Mallinckrodt, México) 3.6 M, 21 g / 100 ml
- 3.- EDTA (SIG) 0.066 M, 2.457 g / 100 ml ajustado a pH 7.4 con NaOH
- 4.- Sulfato de eserina (SIG) 1 mM, 3.82 mg / 5 ml de EDTA, pH 7.4
- 5.- Cloruro de colina (SIG) 0.2 M, 0.46 g / 10 ml
- 6.- Tritón X-100 (SIG) 10 % (1 ml de tritón + 9 ml de H_2O)
- 7.- Tetrafenilboro (SIG) 500 mg en 100 ml de acetonitrilo (J.T.B.M.)

8.- Líquido 500 ml (2 g de 2,5 difeniloxazol (SIG) 0.025 g de 1,4 bis 2-5 fenioxazolil) benceno; 2,2 p-fenileno bis (5-feniloxazol (SIG) , en 500 ml de tolueno (J.T.B.M.)

9.- S-acetil-coenzima A (SIG) 0/6 mM, 1.21 mg / 1 ml de H₂O

10.- Coenzima A acetil³H-Acetil (New England Nuclear, Chicago USA) 0.05 mCi, 0.05 mg / 0.5 ml, actividad específica 850.0 mCi /nmol, en solución acuosa pH 5

Las claves de los reactivos son las mismas de la GAD.

Procedimiento: para la determinación de la actividad de la CAT se requieren dos cuyes a los que se les extrae el labirinto membranoso y se recibe en un vaso de precipitados de 5ml sumergido en hielo que contiene el medio de reacción el cual consiste en:

	conc inicial	volumen adici- nado	conc final por tubo
NaCl	3.6 N	300ul	300mM
NaH ₂ PO ₄	0.0388M	300ul	10mM
Sulfato de eserina	0.001M	240ul	0.1mM
EDTA	0.056M	600ul	10mM
Cloruro de colina	0.200M	180ul	10mM
Triton X 100	10%	<u>12ul</u> 1632ul	0.05%

El medio de reacción que contiene el tejido vestibular se pasa a un homogenizador de vidrio y se homogeniza dando 20 golpes a 550 rpm con un pistón de teflón.

Se ponen 136ul de este homogenado y 40 ul de acetil ³H- CoA (0.2 µCi) en tubos de 3mm de diametro por 30mm de largo, obteniendo un

volumen total de 174 μ l por tubo.

Tubo	Acetil ³ H-CoA 40 μ l	Homogenado 134 μ l	
1			
2			blancos
3			
4			problem

Una vez que se ha colocado la acetil Co A, se agita la mezcla con un vortex y se incuban inmediatamente los tubitos a 37°C, por 15 minutos. Cada determinación se realiza por duplicado, se detiene la reacción por dilución al agregar 10 ml de buffer de fosfatos frío con una jeringa hipodérmica, teniendo el tubo con la mezcla de reacción en un frasco vial, y se le agregan 2 ml de Kalignost (tetrafenil boro en acetonitrilo) y 8 ml de liquiflúor.

Se efectúa la misma operación con los tubos blanco excepto que la reacción se detiene a tiempo "cero", por dilución con buffer, se deja reposar 24 horas en la oscuridad. Se determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido modelo Beckman L.S.7000, dos minutos en el canal de tritio. El homogenado sobrante se guarda en refrigeración para una posterior determinación del contenido de proteína. (fig 16).

Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas de cada homogenado se determinó por el método de Lowry y col, (26) usando albúmina sérica bovina como estandar y llevando acabo el análisis en un espectrofotómetro marca Beckman modelo Du-6.

Para la localización celular se usó Sulfato de Estreptomina de los laboratorios farmacéuticos Lakeside S.A. de C.V.

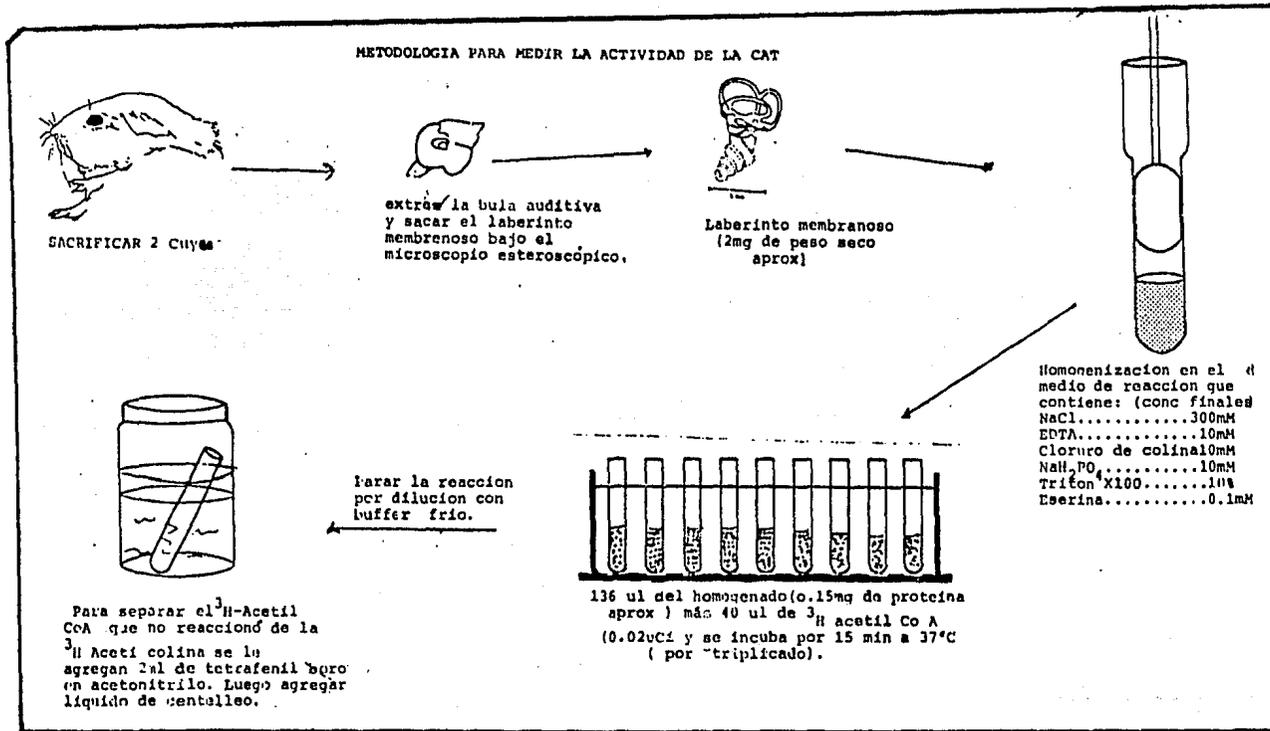


Fig 16.- Esquema que representa el procedimiento para determinar la actividad de la colin acetiltransferasa (CAT)

A cuyes recién nacidos de entre 110 y 115 g de peso se les aplicó una inyección intramuscular de sulfato de estreptomicina diariamente en una dosis de 300 mg / Kg de peso disuelto en 0.5 ml de solución salina fisiológica de acuerdo a los siguientes grupos:

grupo I	20 días
grupo II	25 días
grupo III	30 días
grupo IV	35 días
grupo V	50 días

Al terminar el tratamiento a la mitad de los cuyes de cada grupo se les extrajo el vestibulo y se determinó la actividad de la GAD y a la otra mitad la actividad de la CAT. Al mismo tiempo se inyectaron en la misma forma otros cuyes con 0.5 ml de solución salina isotónica para usarlos como controles.

Evaluación de la función vestibular.

Para determinar si los animales tratados con estreptomicina presentaban síntomas de daño vestibular, se efectuaron las siguientes pruebas:

Prueba calórica.

Con una jeringa de 5 ml a la que se le adaptó en la aguja un pedazo de tubo de plástico de 1mm de diámetro para obtener mayor presión, se inyectó de 3 a 5 ml de agua a 4°C ó a 35 ° C en el conducto auditivo externo del cuy. Se inclinó al animal 30 grados hacia el lado opuesto al que se le inyectó el agua y se observaron los ojos para detectar cualquier movimiento

del globo ocular (nistagmus).

Prueba rotatoria:

Se tomó al animal por el cuerpo y se le hizo rotar 20 veces sobre sí mismo, siempre hacia el mismo lado y con la misma velocidad, esto se realizó en un cuarto oscuro ó tapando los ojos del animal. Después se observaron los ojos del cuy para detectar movimientos oculares (nistagmus).

Prueba de enderezamiento:

Se colocó al animal sobre la espalda después de haberle tapado los ojos y se midió el tiempo que tarda en enderezarse sobre sus patas.

Reflejo de Preyer:

Consiste en que el animal se estremece si se le somete de improviso a un ruido estruendoso. En este trabajo el ruido consistió en una palmada efectuada cuando el animal no miraba.

Reflejo Pinal.

El animal mueve sus orejas hacia la fuente de sonido cuando se le somete a un sonido agudo. (1) Esto mismo se evaluó mediante una palmada.

Para ver los efectos de la inyección de estreptomicina sobre el estado general del animal, se les determinó, tanto a los animales tratados como a los controles, diariamente el peso corporal.

Microscopia electrónica.

Reactivos:

- 1) Glutaraldehído 3.0% (SIG) diluir 1:1
- 2) Cacodilato de sodio (SIG) 1 M. pH 7.3
- 3) Tetróxido de osmio (SIG) 1% en buffer de cacodilatos.

- 4) Alcohol etílico (J.T.B.M.) 30-40-50-60-70-80-90% y absoluto.
- 5) Óxido de 1,2, propileno (MER) 1:1 en alcohol etílico y conc.
- 6) EPON (EMS)
- 7) Azul de toluidina (SIG).

Las claves de la procedencia de los reactivos, es la misma que en los anteriores salvo EMS.- Electron Microscopy Sciences.

Procedimiento: Se sacrificaron los animales se separó la bula auditiva del cráneo, se abrió y se separó el caracol de la porción vestibular, se sumergió en glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilatos a pH 7.3 por dos horas. Pasado este tiempo se extrajo el laberinto membranoso bajo el microscopio estereoscópico y se recibió en glutaraldehído al 3%, se lavó con buffer y se post-fijó en tetróxido de osmio al 1% en cacodilatos 1M pH 7.3 isotónico por 4hrs. Después de la fijación en osmio se lavó en buffer y se inició la deshidratación que consistió en pasar el tejido en concentraciones crecientes de alcohol de 30% a 90% dejando el tejido por 15 min en cada diferente concentración de alcohol. Al terminar el tiempo en el cual el tejido debe permanecer en alcohol del 90% se pasó a una mezcla de alcohol absoluto y óxido de propileno 1:1 por 30 min y luego en óxido de propileno solo por 30 min más.

Para incluir el tejido en Epon, se pasó el tejido a epon-óxido de propileno y se dejó por 24hrs en un desecador, pasado este tiempo el tejido se pasó a Epon puro por 2 hrs en agitación; finalmente se pasó a Epon recién preparado y se puso a 50 C por 48 hrs, para su polimerización.

El tejido incluido y polimerizado la resina se cortó en un

microtomo en secciones semifinas de 1 a 2 micras, y se tiñó con azul de toluidina para observarlo bajo el microscopio de luz, hasta encontrar la orientación y el corte deseado. Más tarde se cortaron secciones finas de 200 a 300 Å y se observó al microscopio electrónico para lo cual el tejido se colocó en rejillas de plomo bañadas en oro y se contrastó con plomo y acetato de uranio.

Cálculos de la actividad de GAD en nmoles / hora / mg de proteína :

Se tiene una concentración de ácido glutámico frío = 10 mM en 1000 ml, 10,000 uM en 1000 ml y 10×10^6 nM en 1000 ml, en 0.09 ml que se ponen en la mezcla de reacción.

$$10 \times 10^6 \text{ nM} \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \longrightarrow 0.09 \text{ ml}$$

$$X = 900 \text{ nM en } 0.09 \text{ ml de la}$$

mezcla de reacción.

Para obtener las desintegraciones por minuto DPM partimos de la definición de :

$$1 \mu\text{Ci} \longrightarrow 2.22 \times 10^6 \text{ DPM}$$

$$0.06 \mu\text{Ci} \longrightarrow X$$

$$X = 132000 \text{ DPM}$$

(0.06 μCi es lo que ponemos en la mezcla de reacción).

$$132000 \text{ DPM} \longrightarrow 900 \text{ nM}$$

$$X \longrightarrow 1 \text{ nM}$$

$$X = 146.666 \text{ DPM en } 1 \text{ nmol}$$

Es decir 146.66 DPM / nmol de DL-glutamato. Pero como sólo se descarboxila el L-glutamato tenemos :

$\frac{146.66 \text{ DPM}}{2} = 73.33 \text{ DPM / nmol}$ del ác L-glutámico

Para obtener las DPM de las cuentas por minuto CPM (CPM problema - CPM blanco), la eficiencia del sistema es del 82 %

$$\text{CPM} \longrightarrow 82 \%$$

$$X \longrightarrow 100 \%$$

$$X = \text{DPM de las CPM}$$

Las nmolas del ácido glutámico que se descarboxila se obtiene:

$$\frac{\text{DPM de las CPM}}{73.333 \text{ DPM / nmol}} = \text{nmolas}$$

$$73.333 \text{ DPM / nmol}$$

Luego este valor de nmolas se multiplica por 3 ya que se reporta por hora y nosotros incubamos 20 minutos :

$$\text{nmolas de ácido L-glutámico} \times 3 = \text{nmolas / hr}$$

y esto se divide entre los miligramos de proteína en 0.06 ml es decir lo que se pone del homogenado en la reacción :

$$\frac{\text{nmolas / hr}}{\text{mg de prot.}} = \text{nmolas / hr / mg de proteína}$$

Cálculos para obtener la actividad de la CAT en nmoles / minuto / mg de proteína :

Se tiene una concentración de acetil-CoA fría = 0.6 nM en 1000 ml 600 μ molar en 1000 ml, en 0.1 que se pone en la mezcla de reacción :

$$600 \mu\text{molas} \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \longrightarrow 0.1 \text{ ml}$$

$$X = 0.06 \mu\text{molas en } 0.286 \text{ ml de}$$

mezcla de reacción.

Para obtener las desintegraciones por minuto DPM partimos de la definición de :

$$\begin{array}{l} 1 \mu\text{Ci} \longrightarrow 2.22 \times 10^6 \text{ DPM} \\ 0.02 \mu\text{Ci} \longrightarrow X \\ X = 4.44 \times 10^4 \text{ DPM} \end{array}$$

(0.02 uCi es lo que se pone en la mezcla de reacción).

$$\begin{array}{l} 4.44 \times 10^4 \text{ DPM} \longrightarrow 0.06 \mu\text{molas} \\ X \longrightarrow 1.00 \mu\text{molas} \\ X = 740 \text{ 000 DPM en 1 umola} \end{array}$$

por lo que en una nmola tendremos 740 DPM.

Se tienen pues 749 DPM / nmola de acetil-CoA

Para obtener las DPM de las cuentas por minuto CPM (CPM problema - CPM blanco), la eficiencia del sistema es de 41.3 %

$$\begin{array}{l} \text{CPM} \longrightarrow 41.3 \% \\ X \longrightarrow 100 \% \\ X = \text{DPM de las CPM} \end{array}$$

Las nmolas de la aceti-CoA que se desacetila se obtienen de la siguiente manera :

$$\frac{\text{DPM de las CPM}}{740 \text{ DPM}} = \text{nmolas}$$

Ya que se tienen calculadas las nmolas de acetil-CoA, como se reporta por minuto y como se incuba por 15 minutos se divide entre 15 :

$$\frac{\text{nmolas de acetil-CoA}}{15 \text{ minutos}} = \text{nmolas / minuto}$$

Y esto se divide entre los mg de proteína en 0.05 ml es decir lo que se pone del homogenado en la reacción :

$$\frac{\text{nmolas / min}}{\text{mg de proteína}} = \text{nmolas / minuto / mg de proteína}$$

RESULTADOS

El valor obtenido en las determinaciones de GAD en los homogenados del vestibulo de cuy es el resultado de 9 experimentos y fué de 224 nmolas/hr/mg de proteína. (tabla 1).

Cuando se investigaron sus propiedades, se encontró que al medir la actividad de GAD a diferentes concentraciones de proteína esta era lineal hasta 0.09mg (fig17).

Al medir la actividad de GAD a diferentes pHs, que van de 5.3 a 8.3 encontramos una curva típica de actividad dependiente del pH la enzima tiene mayor actividad a un pH de 7.3 por lo que se considera este como su pH óptimo. (fig18).

Al determinar la actividad de GAD a diferentes concentraciones de Ac. glutámico que van de 0.5 a 20mM se encontró una curva típica de Michaelis-Menten (de saturación). Cuando se graficó según Lineweaver-Burke se encontró que la Km era de 4.54 (fig 19).

El valor obtenido para la CAT es el resultado de 12 experimentos y fué de 0.455nmolas/min/mg de proteína. (tabla 1).

Los animales inyectados con estreptomicina muestran síntomas de daño vestibular desde los 20 días de tratamiento:

grupo I (20 días) ausencia de nistagmus después de la prueba calórica y de la prueba rotacional, reflejo de enderezamiento casi normal. los animales solo tardan en enderezarse 1seg más que los control.

grupo II (25 días) Los animales de este grupo no muestran nistagmus ni después de la prueba calórica ni después de la prueba rotacional, su reflejo de enderezamiento se ve

ACTIVIDAD DE DESCARBOXILASA DEL
ACIDO GLUTAMICO (GAD) Y DE COLIN
ACETILTRANSFERASA (CAT) EN EL
VESTIBULO DEL CUY.

ENZIMA	ACTIVIDAD
GAD	224 ± 11*
CAT	0.455 ± 0.023*

Tabla 1. # Resultados expresados en nmolas/hr/mg prot.
como media ± el error estandar de 9 experimentos
por triplicado.
Resultados expresados en nmolas/min/mg prot.
como media ± el error estandar de 12 experimentos
por triplicado.

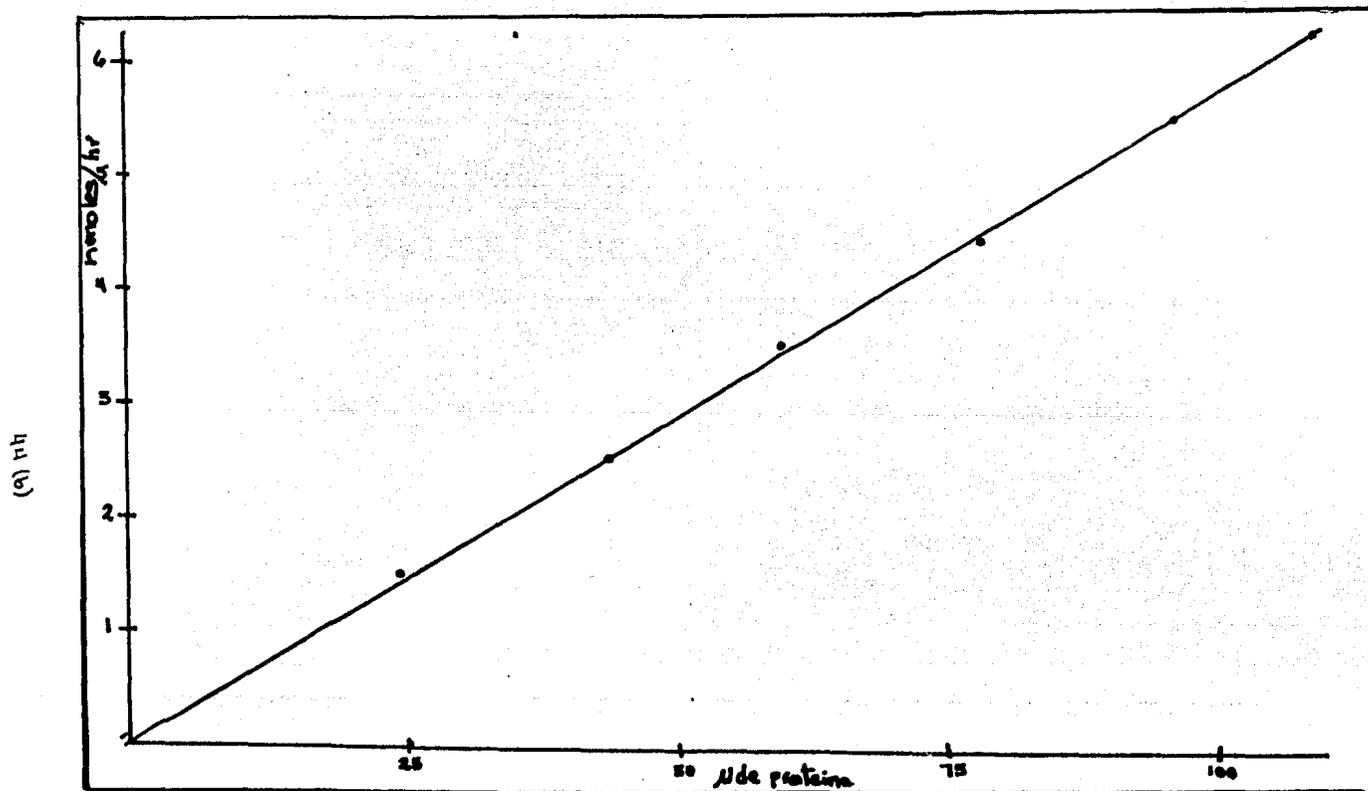


Fig 17.- Curva de actividad de GAD en función de la concentración de proteína. Los valores están expresados en nmolas/hr. Cada punto es la media de 3 experimentos efectuados por triplicado. ($r^2=0.956$)

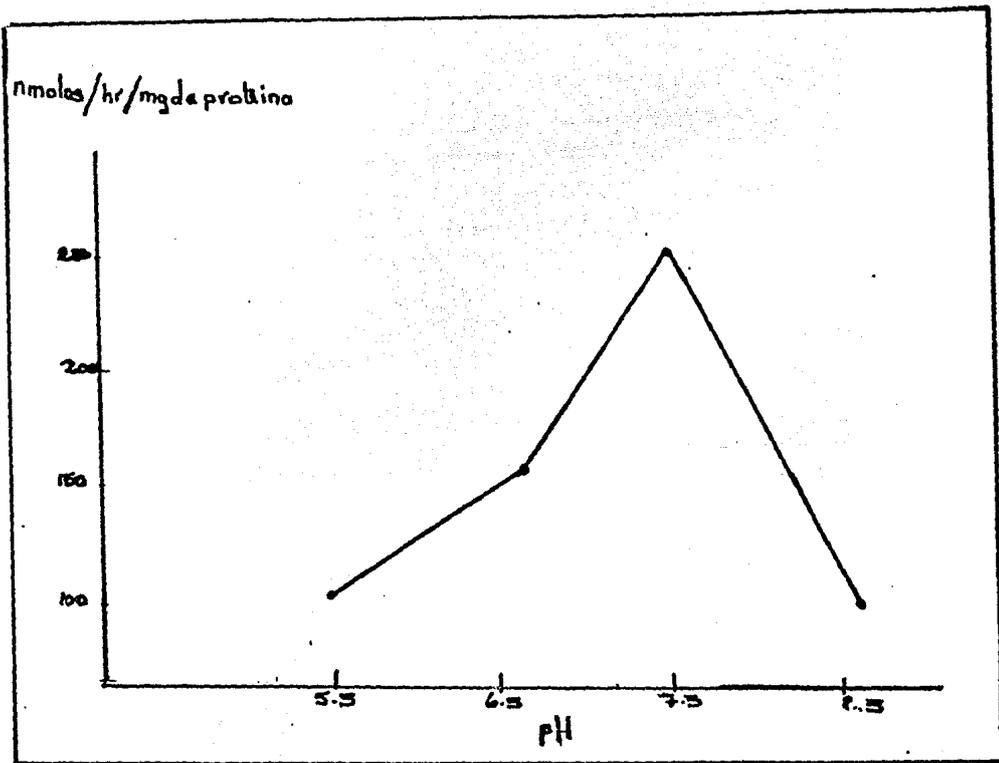


Fig 1B.- Efecto del pH sobre la actividad de GAD. Cada punto representa el promedio de dos experimentos por triplicado. La actividad de GAD está expresada en nmol/hr/mg de proteína.

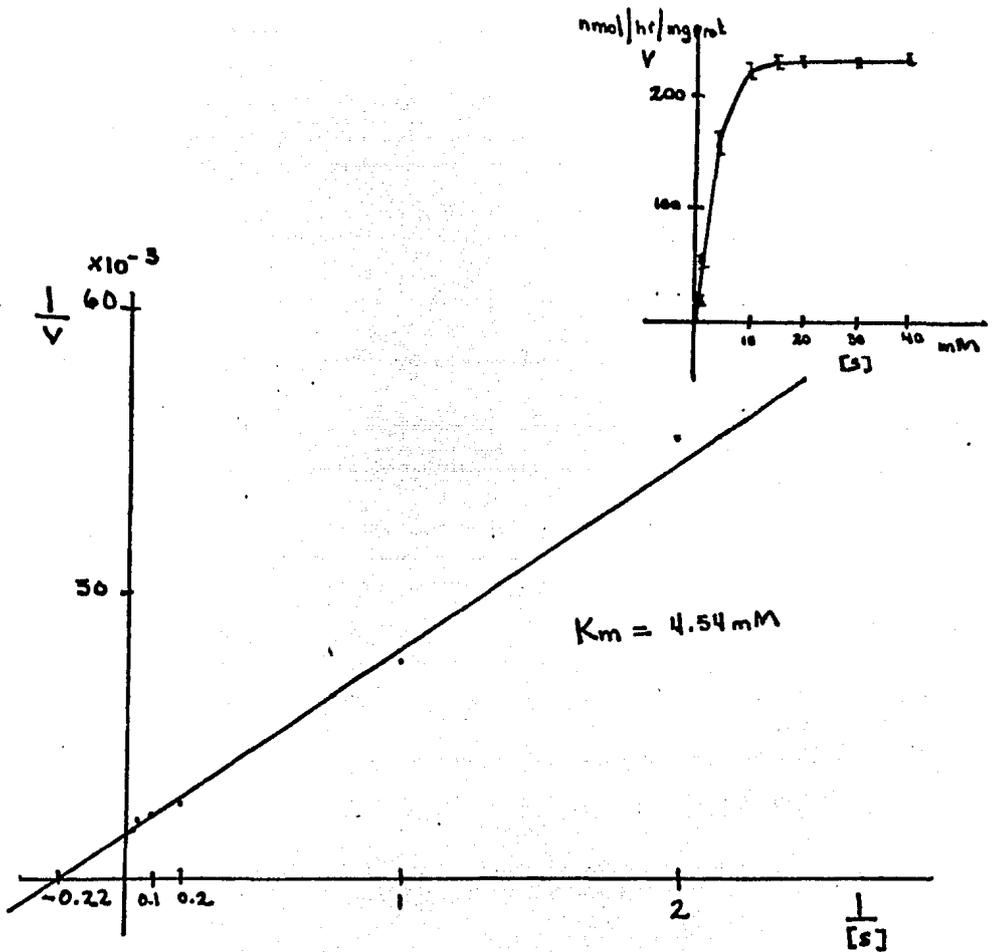


Fig 19.- Gráfica según Lineweaver-Burke de la actividad de GAD. En las ordenadas la recíproca de la velocidad V , expresada como nmol de sustrato descarboxilado por hora por miligramo de proteína. En las abscisas la recíproca de la concentración en milimoles de L-glutámico, los puntos representan el promedio de tres experimentos por triplicado. Las barras representan el error estándar. En el recuadro se muestra la curva original de la cual se tomaron los valores.

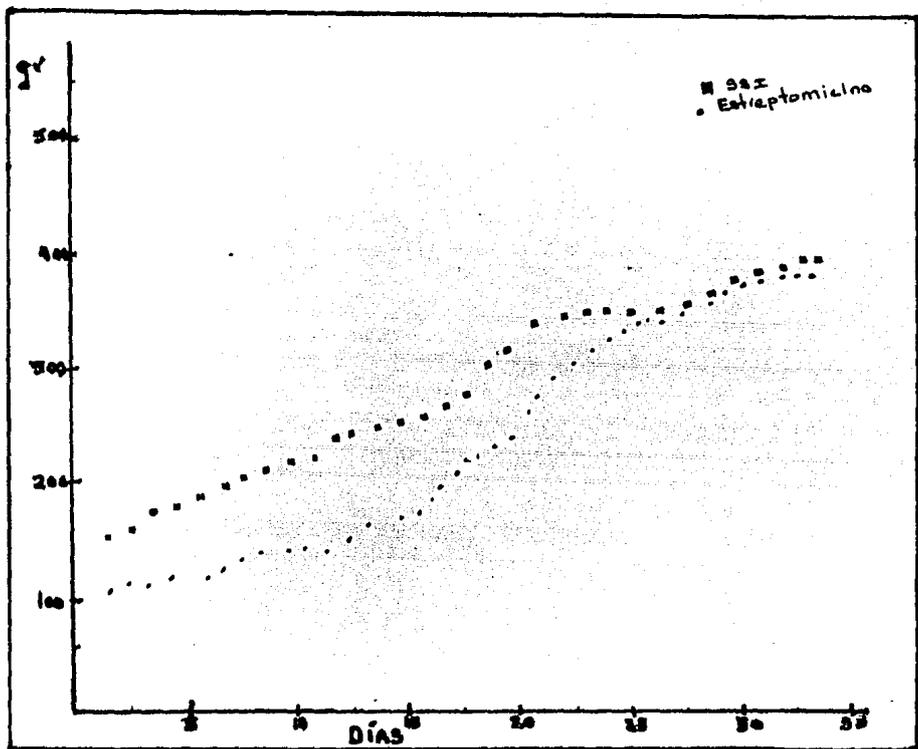


Fig 20.- Curva de peso en función de los días de tratamiento. Los animales fueron inyectados diariamente con sulfato de estreptomizina (300 mg /kg). y animales control inyectados con solución salina fisiológica.

alterado ya que tardan en enderezarse 2.5 seg, los animales control se enderezan en 0.5 seg.

grupo III (30 días) no muestran nistagnus después de las pruebas y tardan en enderezarse 3.5 seg.

grupo IV (35 días) En Los animales de este grupo no se observó nistagmus ni con la prueba calórica ni con la prueba rotacional y para enderezarse tardan de 4.5 a 6 seg.

grupo V. (50 días) No presentan nistagmus con ninguna de las dos pruebas y su reflejo de enderezamiento se ve muy alterado ya que tardan de 10 a 20 seg en enderezarse.

El peso de los animales inyectados con estreptomycinina fue muy semejante al de los animales control, los primeros días de la inyección los animales tratados aumentaban de peso más lentamente que los animales control pero se recuperaron rápidamente y al final del tratamiento pesaban lo mismo. (fig 20).

Al mismo tiempo se les determinó el reflejo de Preyer y el reflejo Pinal como muestras de un correcto funcionamiento auditivo y se encontró que no se alteran ni aún después de 50 días de tratamiento.

Al investigar la actividad de GAD en los animales que fueron inyectados por 20 días, muestran una actividad de 139nmolas/hr/mg de proteína 38.3% menor que la de los controles. Los animales con 25 días de tratamiento muestran una actividad de GAD de 130nmolas /hr/mg de proteína, 42% menos que la de los animales tratados con S.S.I. Los animales que recibieron la misma dosis de estreptomycinina que los anteriores por 30 días muestran una actividad de GAD de 89.6 nmolas/hr/mg de proteína es decir 60% menos que la de los controles. Los animales tratados por 35 días

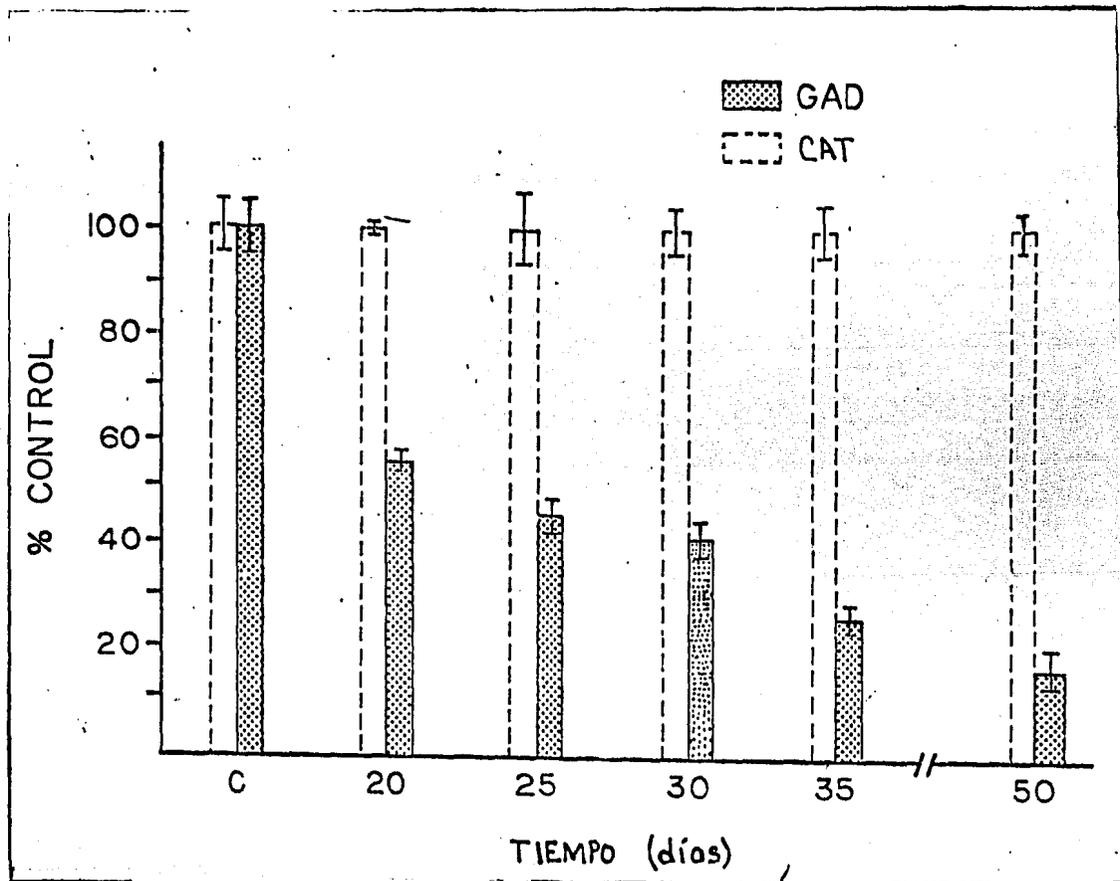


Fig 21.- Representación histografica de la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y de colinacetyltransferasa (CAT) en el vestibulo aislado de cuyes tratados con estreptomicina. expresados como % del control. Los controles fueron inyectados con SSI. Las barras representan el error estandar de la media de 3 a 5 experimentos por triplicado.

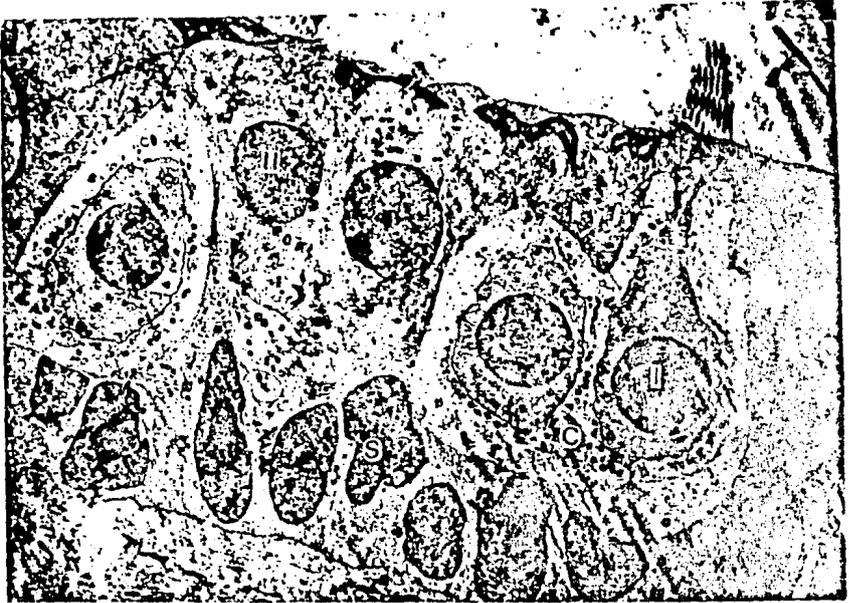
muestran una actividad de GAD de 67.2 nmolas/hr/mg de proteína es decir 73% menos que los animales tratados con S.S.I. Y los tratados por 50 días muestran una actividad de GAD de 33nmolas/hr/mg de proteína lo que nos indica una disminución de 85% en comparación con los controles. (fig 21).

Al determinar la actividad de CAT, ésta no muestra ninguna modificación en ninguno de los grupos durante todo el tratamiento con respecto a los animales control (fig 21).

Los estudios de microscopia electrónica muestran que el epitelio sensorial de los cuyes normales, está constituido por dos tipos de células pilosas, y es muy similar al de los demás mamíferos. (44), (17), (39). (fig 22a).

En los animales tratados por 20 días con sulfato de estreptomycin se observa una destrucción de las células pilosas en especial las tipo I, las terminales nerviosas se observan normales así como las fibras nerviosas y las células de sosten (fig 22b). Las células pilosas se observan hinchadas, con gránulos osmófilos en el citoplasma. En el núcleo hay una aglomeración de la cromatina y algunas células extruyen su citoplasma hacia la endolinfa. Los datos observados en este trabajo corroboran los anteriormente informados por Duvall y Wersall en 1964. (8).

A



B



Fig 22(a).- A: epitelio sensorial de la cresta ampular de un cuy insectado por 20 días con solución salina isotónica. I.- Célula pilosa tipo I II.- Célula pilosa tipo II. S.- Célula sustentadora y C.- Celiza nervioso.

B: Fibras nerviosas que se observan normales. (5000X).

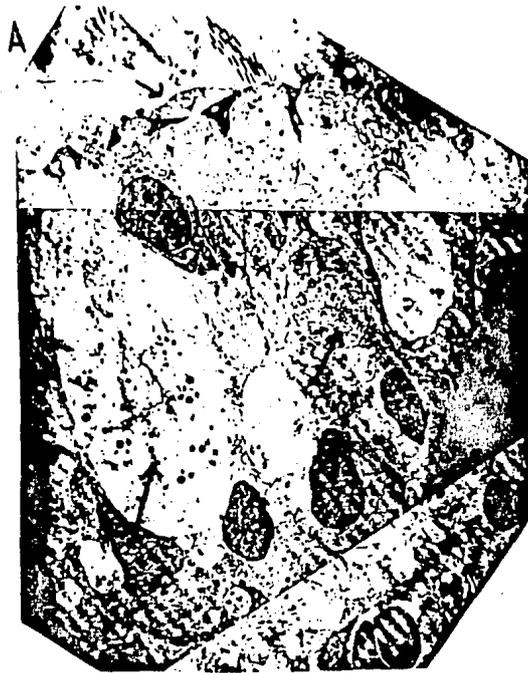


Fig 22(b).- A epitelio sensorial de la cresta anular de un cuy tratado por 20 días con sulfato de estreptomicina (300mg/kg). Se observa una célula pilosa tipo I destruida, otras hinchadas, con la cromatina en los núcleos aglomerada, en la parte superior se pueden observar células que extruyen su citoplasma.

B Las fibras nerviosas se observan normales. (5000X).

DISCUSION

En este trabajo se utilizaron laberintos aislados del oído interno del cuy a los que se le determinaron la actividad de GAD y CAT para establecer si estas enzimas que sintetizan GABA y acetilcolina están presentes en el vestíbulo.

Efectivamente, se encontraron ambas actividades en homogenados totales del vestíbulo del cuy, lo que podría indicar que las sustancias que sintetizan podrían estar actuando como neurotransmisores, en el vestíbulo del cuy. Aún más, las propiedades de la GAD son similares a las reportadas en el vestíbulo del pollo, como son un pH óptimo de 7.3 y una K_m para el ac. L-glutámico de aproximadamente 5mM (33), en donde el GABA es muy probablemente un neurotransmisor aferente.

El tipo de experimentos descritos anteriormente no nos permite señalar a la población celular en la que están localizadas estas actividades enzimáticas, se aprovechó que el efecto de la estreptomycinina sobre los receptores del vestíbulo se conoce desde hace mucho tiempo y que se ha visto por medio de microscopía óptica y electrónica que este antibiótico destruye selectivamente las células pilosas y no altera las terminales nerviosas ni las células de soporte. (8).

Cuando se inyectó estreptomycinina se observó daño vestibular como son ausencia de nistagmus después de la prueba calórica y la prueba rotacional así como alteraciones en el reflejo de enderezamiento. Este tratamiento no alteró el estado general de los animales puesto que el peso no se alteró.

Al medir la actividad de GAD y CAT en homogenados de vestibulos de cuyes que habian sido tratados con 300 mg / Kg de peso con sulfato de estreptomocina por periodos progresivos de tiempo desde 20 hasta 50 días se encontró una disminución progresiva de la actividad de GAD conforme aumentaba el tiempo de tratamiento mientras que la actividad de CAT no se modificaba.

Al verificar los efectos del tratamiento por microscopia electrónica, en los animales inyectados por 20 días, se comprobó que la estreptomocina destruye selectivamente las células pilosas sin dañar los demás tipos celulares del epitelio sensorial del vestibulo del cuy.

Ya que la GAD ya se encuentra disminuida a los 20 días de tratamiento, coincidente con una alteración de las células pilosas, podemos pensar que esta enzima se encuentra en estas células. Aunque no se tienen datos morfológicos para los demás días de tratamiento, es de esperarse que la destrucción de las células pilosas continuó, por lo que puede inferirse que la posterior disminución de la GAD, de acuerdo al tiempo de inyección, refleja ese efecto deletereo de la estreptomocina sobre las células pilosas. Por otro lado como la actividad de la CAT no se modifica después del tratamiento con el antibiotico su localización celular debe encontrarse en alguna de las poblaciones celulares que no sufren daño con el tratamiento; muy probablemente en las terminales nerviosas eferentes, aunque no se tienen evidencias directas al respecto.

CONCLUSIONES

- 1.- En el vestibulo del cuy existe actividad de la glutamato decarboxilasa y de colin acetiltransferasa, enzimas de síntesis de GABA y Acetilcolina respectivamente lo que apoya el posible papel como neurotransmisores de estas sustancias en este sistema. Además, la actividad de GAD presenta características similares a su homóloga del vestibulo del pollo, es decir un pH óptimo de 7.3 y una Km para el sustrato de aproximadamente 5mM.
- 2.- La inyección de sulfato de estreptomycinina en una dosis de 300 mg/kg de peso a cuyes por más de 20 días resulta en la disminución de la actividad de GAD y esta disminución es progresiva de acuerdo al tiempo de tratamiento, no produciéndose tal cambio en la actividad de CAT.
- 3.- Los estudios de microscopía electrónica muestran que con el tratamiento con sulfato de estreptomycinina desde los 20 días las células pilosas aparecen dañadas, las terminales nerviosas y las fibras nerviosas no se alteran.
- 4.- Al dañarse las células pilosas la actividad de glutamato decarboxilasa disminuye y esta disminución es progresiva y paralela a la alteración de aquellas.
- 5.- La disminución de GAD paralela a la disminución de las células pilosas por la acción de la estreptomycinina nos habla de que la localización celular de esta enzima podría ser

precisamente las células pilosas, y que la actividad de la CAT no se modifique nos dice que esta enzima debe localizarse en alguna de las poblaciones celulares que permanecen intactas, una de las cuales podrían ser los botones sinápticos eferentes.

Los resultados sugieren:

5.- El GABA y la Acetilcolina posiblemente intervengan en la neurotransmisión en el vestíbulo del cuy y en el de otros mamíferos. El GABA que aparentemente se localiza en las células pilosas podría actuar como un neurotransmisor aferente y la acetilcolina localizada probablemente en las terminales nerviosas eferentes podría ser uno de los mediadores eferentes en el vestíbulo del cuy.

REFERENCIAS

- 1.-Butler R.A.(1975). The influence of the external and middle ear on auditory en Auditory System (springer-verlog-eds) Berlin Heidelberg New York.pp 180-185.
- 2.- Bischoff. A. (1970) Ultraestructure of the peripheral Nervous System and sense organs. Atlas of normal and pathological anatomy.The C.V. Mosley Company St. Louis Missouri pag 286-447.
- 3.-Begger Sjoback,D and Gulley,R.L. (1979). Synaptic structures in the Type II hair cell in the vestibular system of guinea pig. Acta Otolaryngol 88:401-411.
- 4.- Benschalom,G. and Flock, A.(1980) Ultraestructur of synapsis in the lateral line caudal organ. Acta Otolaryngol 90: 161-174.
- 5.-Brown,R.D and Wood C.D.(1980). Vestibular pharmacology. en Textbook of Pharmacology,(S.N. Pradhan and R.P. Maickel eds), C.V. Mosby Co., St Louis.
- 6.- Cohen B. (1977)Stored neural activity in the vestibular testing en Aminoglycoside Ototoxicity (Lerner, Martz y Hawkins Eds) Little Brown pp 89.
- 7.-Dohmlan, G.F.(1974). Histochemistry and metabolism of the Inner ear, Handbook of Sensory Physiology: vestibular system. Part1. pp 185-212. (kornhuber, H.H. ed). Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- 8.-Duvall,A.J. and Wersall,J. (1964). Site of action of streptomycin upon inner ear sensory cells. Acta

Otolaryngol. 57:581-584.

- 9.- Ehrenberger, K., Benkoe, E., and Felix, D. Suppressive action of picrotoxin, a GABA antagonist, on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta Otolaryngol* 1982. 13: 269-73.
- 10.- Engstrom H. and Engstrom, B. (1981) The structure of vestibular sensory epithelia in the vestibular system: function and morphology (Torquato Gualtierotti ed.) pp 3-33. Springer verlag- New York, Heidelberg, Berlin.
- 11.- Engstrom H (1958) On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol* 49: 109-118.
- 12.- Furukawa, T and Ishii, Y (1967). Neurophysiological studies on hearing in goldfish: *J. Neurophysiol.* 30:1377.
- 13.- Flock, A. y Lam, D. (1967). Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. *Nature.* 249: 142-144.
- 14.- Flock, A Ultraestructure and function in the lateral line organs. En P. Cohen (Eds) *Lateral line detectors*, Indiana Univ. Press, Bloomington, IN 163-197.
- 15.- Felix y Ehrenberger (1982). The action of putative neurotransmitter substance in the cat labyrinth. *Acta Otolaryngol.* 1982 93: 101-105.
- 16.- Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24: 407-409.
- 17.- Fonnum, F, (1975) Radiochemical assays for choline acetyltransferase, en *Research Methods in Neurochemistry.* (Marcks, N. y Rodnight, eds). Plenum Press. New York. 18, 253-275.
- 18.- Honrubia, V. and Birns, J. (1981). Slow and fast components of Nystagmus: two systems with different characteristics en

Otoliglycoside Ototoxicity. (Lerner, Matz, Hawkins eds) Little Brown Boston.

- 19.- Hudspeth, A.J. (1983) The hair cells of the inner ear. *Scientific American* 247: 42-54.
- 20.- Hudspeth, A.J. (1983) Transduction and tuning by vertebrate hair cells. *Trends. Neurosci.* 6(9):366-369.
- 21.- Hudspeth, A.J. and Corey, D.P. (1977). Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2407.
- 22 - Hawkins J.E, Preston, R.E, (1975) Vestibular Ototoxicity en The vestibular system (R.F. Naunton Ed) New york academic pp. 321-349.
- 23.- Iurato, S, Luciano, L. Pannese, E. and Reale, E. (1971). Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the innerear. *Acta Otolaryng. supp* 279:1-50.
- 22.- Jope, R. (1979). High affinity choline transport and acetyl CoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *Brain Research Review.* 1, 313-344.
- 24.- Johnsson L.G. and Wright C.G. (1980). Streptomycin induced defects of the otoconial membrane. *Acta Otolaryngol* 89: 401-406.
- 25.- Lindemann H.J. (1969). Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol.* 67: 177-189.
- 26.- Lowry, D.H., Rosebroug, H.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 17.- Lerner S.A. and Matz, G.J. (1979) Suggestions for monitoring

patients during treatment with aminoglycoside antibiotics. Otolaryngol. Head, Neck, surg 87:222.

29.- Murray, B.L. (1974) Sistema auditivo y sistema vestibular en Sistema Nervioso Humano. pp271-290 Ed. Harla, S.A. de C.V México.

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

30.- Meza G. Hernandez C., y Ruiz, M. (1981) ^3H -GABA uptake in isolated vestibular cristae of chick inner ear, Soc. Neurosci. Abstr. 7, 147.

31.- Meza G. and López I., (1984) Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. Neuroscience letters 49 93-98.

32.- Meza G. and Gonzalez-Viveros, T. y Ruiz M. (1985) Specific ^3H gamma aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. Brain Research, 337: 179-183.

33.- Meza G. (1984) Some Characteristics of glutamic acid decarboxylase of chick ampullary cristae. J. Neurochemistry vol 43 No 3 643-639.

34.- Netter, F.H. (1983) Nervous System part I Anatomy and physiology en The CIBAS collection of Medical Illustrations CIBA.

35.- Parker, D.E (1981) The vestibular apparatus, Scientific American 243, 98-111.

36.- Planel H. (1982). La biología de la ingraviséz Mundo científico, (La Recherche) 16: 700-712.

37.- Rossi, M.L. Valli, P. and Casella, C. (1977) Post-synaptic potential recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. Brain Res. 290:376-379.

- 38.- Rossi, M.L. Prigioni, I. Valli, P. and Casella, C. (1980) Activation of the efferent system in the isolated frog labyrinth: Effects on the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibers of the posterior nerve. *Brain Res* 185: 127-137.
- 39.-Spöndlin H. (1965). Ultrastructural studies of the labyrinth in squirrel monkeys. En: First Symposium on the role of vestibular organs in the exploration of space. NASA report SP-77 196 Washington U.S.G.P.O
- 40.-Stone, L.S. (1933) The development of the lateral line sense organs in amphibians, observed in living and vital-stained preparations. *J. Comp Neurol.* 57 507-540.
- 41.-Tapia, R. y Meza-Ruiz, G. (1981) Propiedades bioquímicas de las sinapsis GABAérgicas y colinérgicas, en Temas selectos de Fisiología Celular. (Peña, A. Drucker, R. y Tapia R. eds.) pp 223-240. UNAM, México, D.F.
- 42.-Werman, R. (1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. A review *Comp. Biochem Physiol.* 18: 745-766.
- 43.-Wersall, J. (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. *Acta otolaryngol Supp* 126: 1-85.
- 44.-Wersall, J. Flock, A. and Ludquist, R.G. (1965) Structural Basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Cold. Spring. Harb. Symp. quant. Biol* 30:115-145.
- 45.- Wersall, J. and Flock, A. (1965) Functional anatomy of the vestibular and lateral line organs. En W.D. Neff (ed) *Contributions to sensory physiology, vol I* Academic press New

York pp 39-61.

46.- Wersall, J. and Bagger-Sjoberg, D. (1974), Morphology of vestibular sense organ. En: Handbook of sensory physiology, H.H. Kornhuber, Ed Springer-Verlag, Heidelberg New York, vol 6 pp 120-70.

47.- Wayne- Brady (1959) The distribution of glutamic decarboxilase in the nervous system of the Rhesus Monkey. J. Biol. Chem 234 # 4 pp 926-928.

48.- Hinshaw, H.C. Feldman, W.H. (1945) Streptomycin in treatment of clinical tuberculosis: A preliminary report. Mayo Clin Proc 20: 313-318.