

00341

1  
Lej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" LOCALIZACION CELULAR DEL ACIDO GAMMA AMINOBUTIRICO (GABA) POR  
INMUNOCITOQUIMICA A NIVEL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA EN EL OIDO  
INTERNO DEL CUY"

TRABAJO QUE PRESENTA

IVAN AXEL LOPEZ BAJONERO

PARA LA OBTENCION DEL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA  
ELECTRONICA APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLOGICAS

MEXICO, D.F.

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

# I N D I C E

RESUMEN .....	6
INTRODUCCION.....	8
MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL.....	14
MATERIALES.....	18
METODOS.....	23
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40

## RESUMEN

En el vestibulo de los mamiferos, la información sensorial necesaria para el mantenimiento del equilibrio y la postura es provista al sistema nervioso central (SNC) por células especializadas en al mecanorrecepción (células pilosas sensitivas) a través de fibras aferentes que las contactan. A su vez, éstas células reciben los impulsos centrales por medio de conexiones eferentes. Existen evidencias de que esta comunicación es de tipo químico, sin embargo, la investigación en relación a la identidad de los neurotransmisores en este sistema es muy escasa. Esto se debe probablemente a que el oído es un órgano poco accesible por su ubicación.

Existen numerosas evidencias, todas ellas indirectas, de que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) pudiera ser uno de los neurotransmisores con el que la célula pilosa vestibular se comunica al SNC, entre ellas se ha demostrado actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima de síntesis del GABA, en homogenados de vestibulo completo de cuy, lo que ha permitido postularlo como uno de los neurotransmisores aferentes vestibulares. Sin embargo, con ese tipo de experimentos no es posible determinar la localización celular de esta substancia.

Por este motivo, en el presente trabajo se trató de aportar evidencias más directas estudiando la ubicación del GABA por técnicas inmunocitoquímicas de post-inclusión a nivel de microscopía óptica y electrónica.

Con esta finalidad utilizando el oído interno del cuy se procesaron muestras de los órganos vestibulares de este mamífero con técnicas convencionales de microscopía electrónica y se realizaron cortes tanto semifinos como finos, los cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos policlonales anti-GABA.

Por microscopía óptica se encontró inmunoreactividad positiva de una sustancia parecida al GABA (GABA-LI) en las células pilosas tipo I y II, en algunas fibras nerviosas gruesas que inervan al epitelio, incluyendo el cáliz nervioso aferente que envuelve a las células pilosas tipo I. Tanto las células pilosas tipo I como sus cálices mostraron variaciones en la inmunotinción, indicando la existencia de al menos tres diferentes poblaciones celulares: células fuertemente inmunoreactivas, células moderadamente inmunoreactivas y células carentes de inmunoreactividad, estos patrones se repitieron para los cálices. Por otro lado, no se encontró inmunoreactividad en las células de soporte.

Por microscopía electrónica se encontró GABA-LI en las células pilosas tipo I y II, en algunas fibras nerviosas que llegan al epitelio y en los cálices nerviosos aferentes que envuelven a las células tipo I.

Al igual que por microscopía óptica, se encontró heterogeneidad en los patrones de inmunotinción en las células pilosas tipo I y sus cálices. No se encontró GABA-LI ni en las células de soporte ni en los botones eferentes que contactan a las células pilosas tipo II.

En conclusión, la inmunotinción positiva en las células pilosas tipo I y II sugiere un papel del GABA como posible neurotransmisor aferente en las células pilosas; GABA-LI en fibras y terminales caliciformes (cálices nerviosos) contactando a las células pilosas, o GABA-LI sólo en los cálices podrían indicar un sitio de degradación y/o un papel del GABA como modulador a través de un mecanismo todavía desconocido en la terminal aferente caliciforme.

## INTRODUCCION

La naturaleza ha provisto a todos los animales sobre la tierra de células mecanorreceptoras que detectan la fuerza de la gravedad. Estas se ubican en la parte interna del oído (órganos otolíticos del sistema vestibular).

El papel del sistema vestibular en la percepción de las aceleraciones y la integración de la información en relación a mantener la orientación, se ha conservado desde los organismos más antiguos sobre la tierra. El primer órgano vestibular (el receptor más primitivo: el estatocisto de los moluscos) apareció hace más de 600 millones de años(18).

Un incremento continuo en la complejidad de la anatomía ocurre con la evolución filogenética desde el primer estatocisto hasta el sofisticado laberinto de los vertebrados(18), en el que aparecen otros órganos, que detectan tanto aceleraciones angulares como lineales.

### EL OIDO INTERNO DE LOS VERTEBRADOS

El oído interno se divide en dos porciones ; un órgano encargado de percibir ondas sonoras(el órgano de Corti) y los que conforman el aparato vestibular. La delicadeza de estos órganos es sugerida por la impenetrabilidad de su alojamiento(fig 1) .

El aparato vestibular está constituido por una serie de sacos y conductos de tipo membranoso, llenos de un líquido de

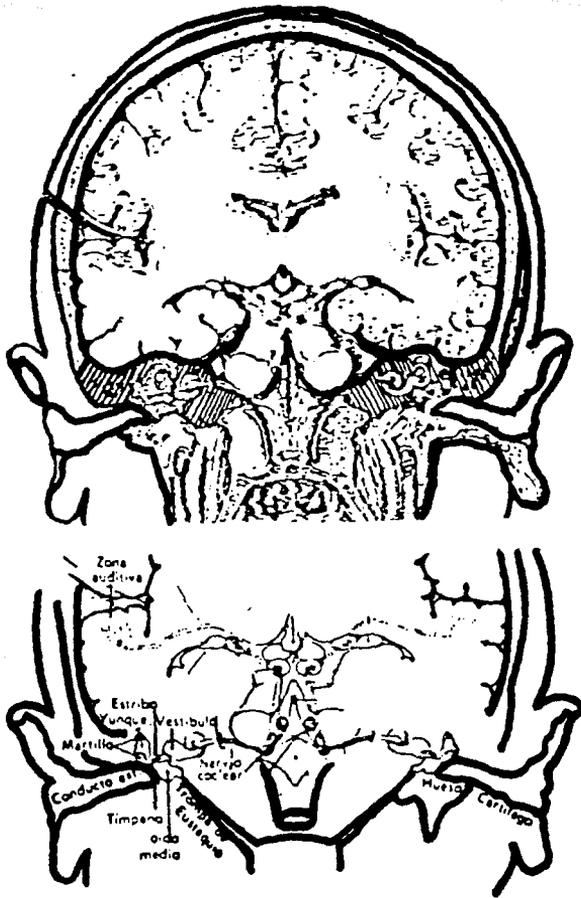


Figura 1. Localización de sistema vestibular en el hombre.  
 (la zona estriada muestra la región del hueso temporal).

composición química muy peculiar llamado endolinfa, al mismo tiempo este aparato membranoso está en suspensión en un líquido conocido como perilinfa.

El laberinto membranoso consta de cinco órganos: tres canales semicirculares, el utrículo y el sáculo. La cóclea está constituida por un sólo órgano (el órgano de Corti). En todos, existen especializaciones (epitelio sensorial) (fig 2).

#### EPITELIO SENSORIAL

En los vertebrados superiores la porción sensible del epitelio sensorial está formada por células especializadas en la mecanorrecepción (células pilosas sensitivas). Cada epitelio sensorial en los diferentes órganos contiene dos tipos de células pilosas: la I y la II. En el caso del vestibulo, en porciones definidas: la cresta de los canales semicirculares, el utrículo y el sáculo en las máculas y las células pilosas externas e internas en el órgano de Corti.

Además, el epitelio sensorial posee células de soporte y las fibras nerviosas (aférentes y eférentes) que inervan a las células pilosas. Las células de soporte se extienden por toda la superficie endolinfática hasta la porción basal de ésta excepto en el desarrollo.

Por encima del epitelio sensorial se encuentra un sistema de acoplamiento mecánico que casi siempre es una masa inerte (la cúpula y la membrana otolítica en el caso de los órganos vestibulares) y la membrana tectoria en el caso del órgano de Corti (fig 3).

Las células pilosas se originan en la superficie del

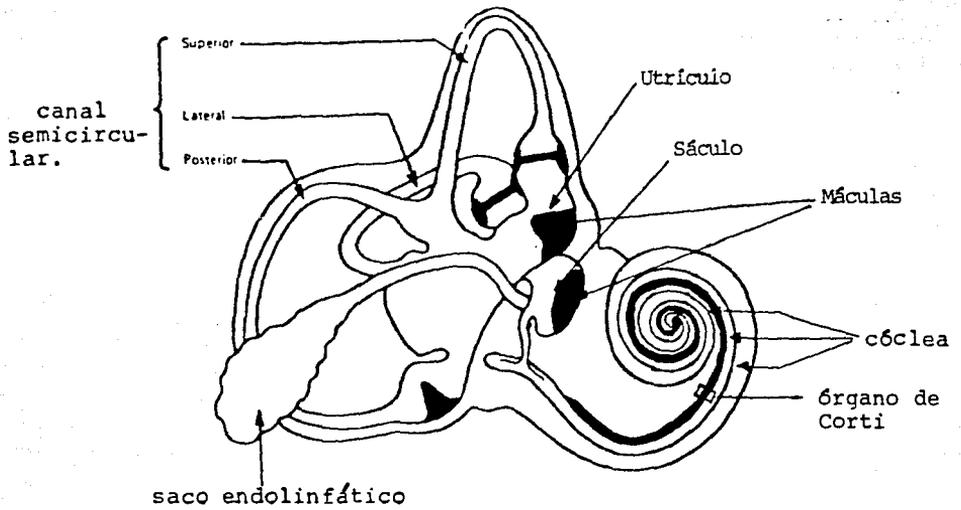


Figura 2. Porciones sensibles del oído interno.

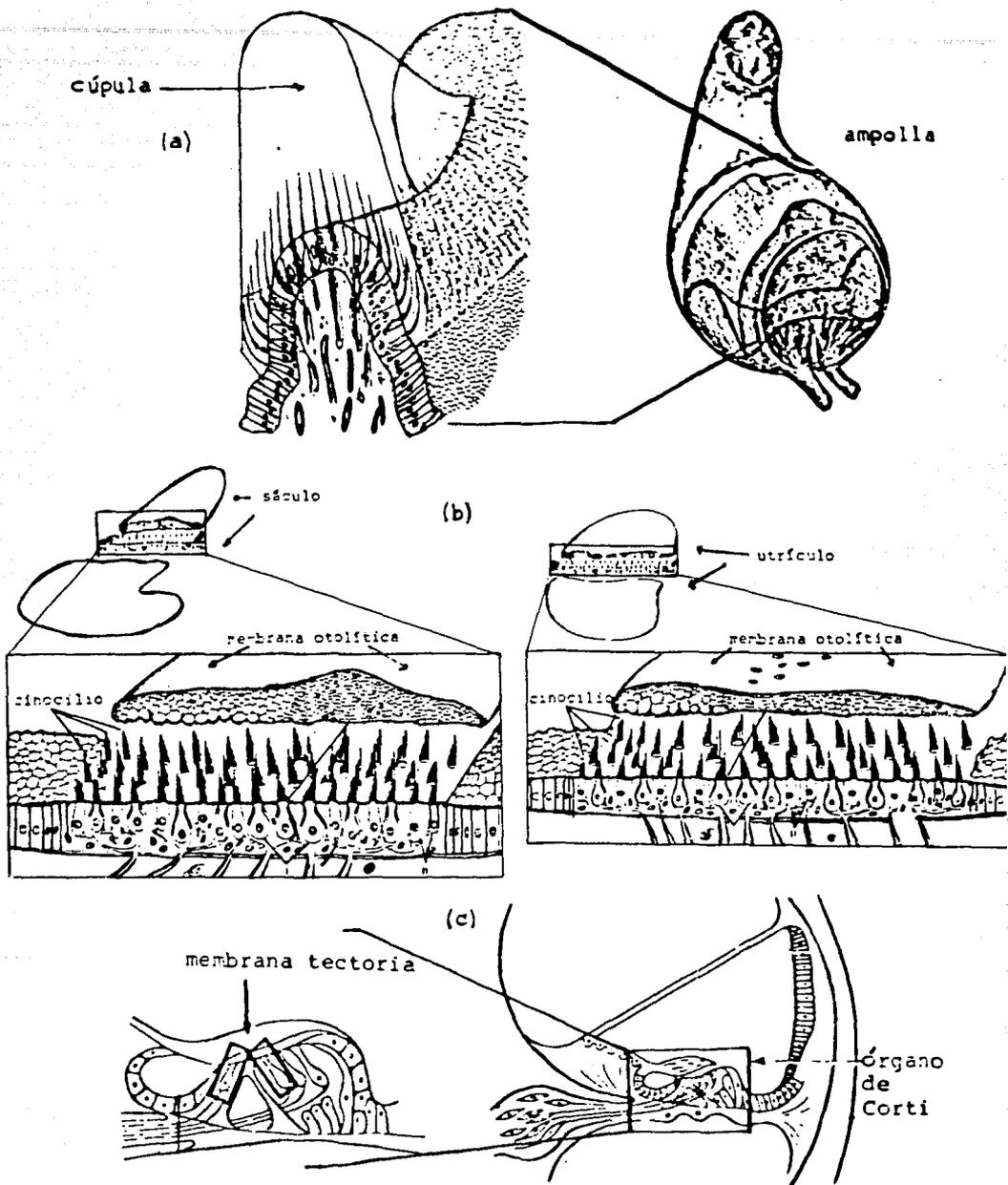


figura 3. Esquema representativo de las áreas sensitivas ubicadas en : (a) Las crestas ampulares de los canales semicirculares, (b) Las maculas de los órganos otolíticos del vestibulo, (c) En el órgano de Corti coclear. En todos los casos se muestran, los elementos fundamentales y los sistemas de acoplamiento mecánico (cúpula, membrana otolítica y membrana tectoria).

ectodermo y mantienen su carácter de epitelio en los órganos maduros del oído interno; aunque carecen de axones y dendritas hacen sinapsis con las fibras nerviosas aferentes que van al cerebro y reciben fibras eferentes provenientes del tallo cerebral(fig 4). Un rasgo estructural de estas células es el haz de prolongaciones citoplasmáticas en su porción apical, denominados pelos sensorios o esterocilios y poseen además un cilio verdadero o cinocilio(fig 4), salvo en las células del órgano de Corti que lo pierden al alcanzar su maduración.

#### TIPOS DE CELULAS PILOSAS

Wersäll describió dos tipos de células pilosas en el epitelio sensorial vestibular y demostró que poseen diferentes terminales nerviosas(41).

En el vestíbulo, la célula pilosa tipo I presente solo en los vertebrados superiores, está inervada por una terminal aferente en forma de cáliz(fig 4). A su vez, recibe información central en forma de botones sinápticos eferentes que contactan a la fibra aferente.

La célula pilosa tipo II, común a todos los vertebrados, recibe terminales nerviosas tanto aferentes como eferentes en su parte basal (fig 4).

#### MECANISMO DE TRANSMISION SINAPTICA EN EL SISTEMA VESTIBULAR

Existen numerosas evidencias tanto morfológicas como fisiológicas que indican que la transmisión sináptica entre las células pilosas y las fibras aferentes es de naturaleza química (6,8,9,15,42-44) .

Estudios ultraestructurales han revelado que el espacio

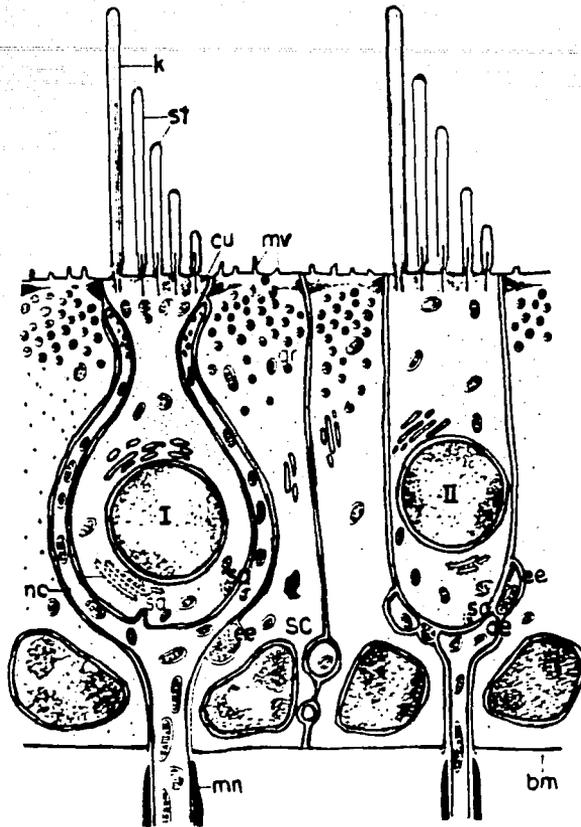


figura 4. Esquema que ilustra la estructura general de epitelio sensorial vestibular. I = célula pilosa tipo I ; II = célula pilosa tipo II ; nc = cáliz nervioso aferente ; sc = célula de soporte ; K = cinocilio ; st = estereocilio ; mv = microvellosidades ; cu = cutícula ; ee = terminal nerviosa eferente ; ae = nerviosa aferente ; sa = área sináptica ; mn = fibra mielínica ; bm = membrana basal .

sináptico entre la célula receptora y la fibra aferente es de aproximadamente 200 Å. La célula pilosa (presinapsis en este caso) contiene un cuerpo típicamente presináptico, mientras que la membrana de la terminal postsináptica (fibra aferente) muestra un engrosamiento (1,25,33,34,43).

Los cuerpos presinápticos fueron descritos por primera vez por Sjöstrand (33) en la retina y han sido encontrados en los receptores vestibulares por varios grupos (8,25,42-44) (fig 5).

Diversas investigaciones fisiológicas han demostrado potenciales postsinápticos excitatorios en las fibras primarias aferentes en el sáculo del pez dorado y en el canal semicircular de la rana (8,32). También se ha demostrado la existencia de un retraso en el potencial sináptico en la unión recepto-neural del octavo nervio del pez dorado después de la estimulación de la célula pilosa (9) y se ha comprobado la existencia de una neurotransmisión de tipo cuántico (15). Así mismo, los potenciales unitarios registrados en las fibras aferentes provenientes de las áreas sensoriales vestibulares de algunos elasmobranquios y anfibios se midifican por movimientos de la cabeza ó desaparecen por la supresión de calcio en el medio (31). Todas estas evidencias nos sugieren una transmisión de tipo químico.

En cuanto a la sinápsis eferente, ha sido descrita por estudios morfológicos con microscopía electrónica. Generalmente las terminales eferentes (botones) contiene muchas vesículas, algunas de ellas con centro denso, mientras que en las células pilosas que contactan se ha encontrado una cisterna subsináptica. Así mismo, la distancia que media entre las terminales

eferentes (presinápsis) y la célula pilosa mide cerca de 200 Å (4,10,25,34,35) por lo que parece tratarse de la estructura de una sinápsis química (fig 5).

Numerosos estudios han demostrado que existen en el laberinto de la rana potenciales postsinápticos inhibitorios, registrados en la fibras aferentes inducidos por estimulación de las fibras eferentes (11), y existen otras evidencias fisiológicas revisadas por Precht y col. (30) que sugieren que la comunicación entre la célula pilosa y la terminal eferente es de naturaleza química (30).

Estos hallazgos, aunque importantes, no nos explican nada acerca de la naturaleza química del transmisor involucrado tanto en las sinapsis aferentes como eferentes, por lo que se ha estudiado como posibles mediadores los ya descritos clásicamente para el SNC y periférico de vertebrados.

De entre los neurotransmisores aferentes estudiados en la periferia sensorial vestibular se encuentra el ácido gamma-aminobutírico (GABA) que ha cubierto algunos de los criterios que se piden llene un postulado neurotransmisor, a saber (40):

Se ha demostrado actividad de la glutamato descarboxilasa, GAD (enzima de síntesis del GABA) en homogenados de vestíbulo de la raya, la rana toro, la rana verde, el pollo, y el cuy (7, 16, 19-24), y se ha sugerido que esta actividad se encuentra en la célula pilosa, ya que prevalece en la periferia después de la escisión del octavo nervio en la rana, lo cual causa degeneración en la terminal nerviosa eferente pero no en las células (16). También, la GAD se ha detectado muy temprano en el desarrollo en la periferia sensorial vestibular a la cual no han

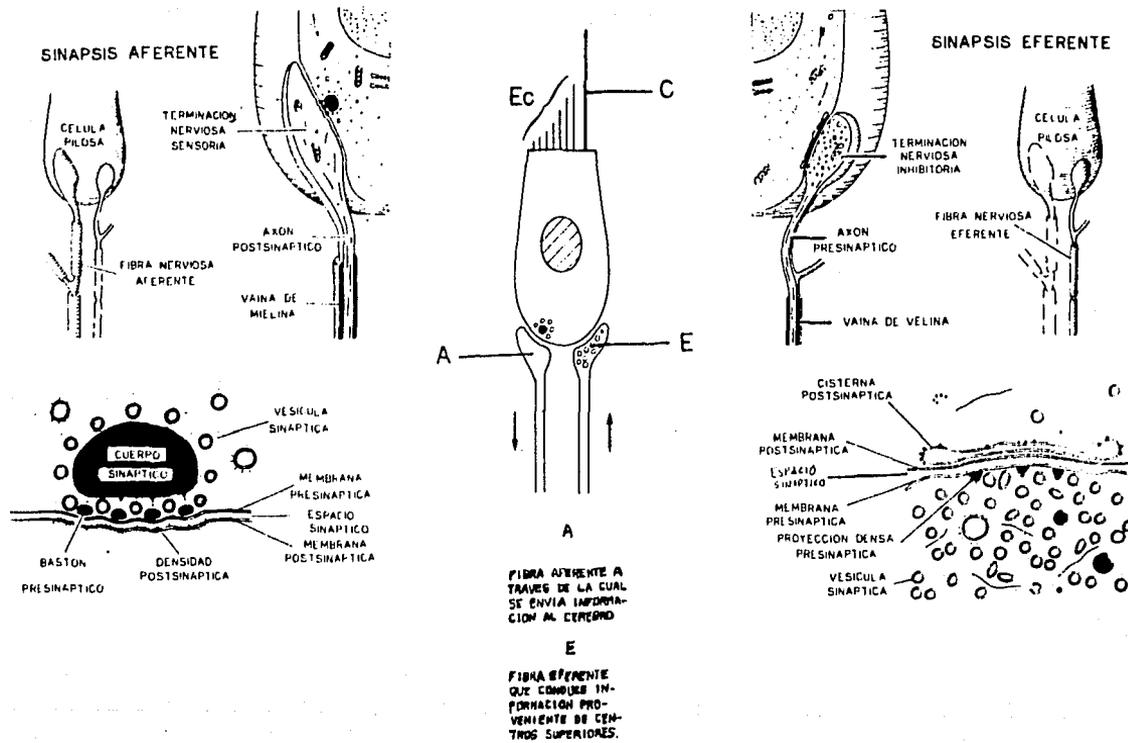


Figura 5. Representación esquemática de las partes que constituyen a la célula pilosa y sus contactos neurales. Ec= estereocilios ; C = cinocilio ; A = terminación nerviosa aferente; terminación nerviosa eferente (porción central). Las porciones laterales derecha e izquierda de esta figura, representan la estructura microscópica de las uniones sinápticas que contactan a la célula pilosa (modificado de Benshalon, G. y Flock, A. (1980) Ultrastructure of synapses in the lateral line canal organ. Acta Otolaryngol (Stockh). 90, 11).

llegado aún las terminales eferentes, pero en la que las células pilosas se encuentran ya maduras en el pollo (23) y en el cuy (14). Aun más, el tratamiento con estreptomycin en el cuy, que resulta en la degeneración de las células pilosas, causa un decremento en la actividad de la GAD en el vestíbulo, lo que indica que ésta reducción puede adscribirse a una disminución en el número de células pilosas. Esto sugiere una probable localización de la GAD en las células pilosas (13,24).

Por otro lado, por estudios recientes, un tanto controvertidos, se ha demostrado por inmunocitoquímica la presencia de GABA y de la GAD en las células pilosas del vestíbulo del pollo (37,38) y en las terminales nerviosas eferentes en el mono araña (39).

Se ha reportado, así mismo, la existencia de un sistema de captación de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  y energía posiblemente representando un sistema inactivador de GABA, en crestas ampulares de vestíbulo del pollo (21).

Por experimentos electrofisiológicos, se ha visto que la picrotoxina, un conocido bloqueador del receptor a GABA, inhibe la actividad tanto espontánea como evocada cuando ha sido aplicada en el nervio aferente en el canal semicircular de la raya (7). La aplicación iontoforética del GABA incrementa la actividad espontánea en la mácula del sáculo del gato (5); el bloqueo por bicuculina y picrotoxina de esta respuesta y el tratamiento exitoso con picrotoxina de pacientes que sufren crisis de vertigo de origen periférico (3) pueden correlacionarse con la existencia de un receptor a GABA en la periferia sensorial del laberinto. Experimentos bioquímicos han demostrado la unión

específica de GABA tritiado a una preparación membranal cruda en crestas ampulares aisladas del vestíbulo del pollo y esto tiende a confirmar la presencia de un receptor sináptico a GABA tipo A (22).

#### MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL

Las evidencias mencionadas anteriormente en relación al GABA como neurotransmisor en el aparato vestibular de los mamíferos aunque muy valiosas son indirectas. Por ello tomando como modelo el oído interno del cuy, se decidió estudiar la ubicación celular del GABA utilizando el enfoque inmunocitoquímico, técnica que permite la localización "in situ" de moléculas, las que pueden visualizarse tanto por microscopía óptica como electrónica.

La inmunocitoquímica se basa en la detección de antígenos mediante anticuerpos. Los antígenos, son generalmente moléculas de alto peso molecular como las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos, exógenos a un animal, que al ser administrados a este activan a los linfocitos y producen anticuerpos específicos. Ultimamente se han obtenido anticuerpos contra moléculas pequeñas (como los aminoácidos) acopladas a proteínas como la albúmina sérica bovina, mediante el uso de glutaraldehído (formando así una macromolécula), lo que permite su localización en tejidos como el nervioso (28).

En inmunocitoquímica, el anticuerpo se utiliza como un reactivo para localizar el antígeno contra el cual fue preparado y se aplica a una sección del tejido (rebana, o corte) en

el que interactúa con el antígeno tisular y se conoce como anticuerpo primario; al interactuar se forma un complejo antígeno-anticuerpo primario que puede ser revelado por medio de marcadores especiales tanto al microscopio óptico como electrónico.

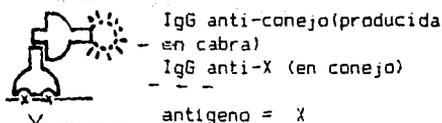
Existen dos tipos de métodos para localizar antígenos en inmunocitoquímica. El primero es el método directo y consiste en marcar al anticuerpo primario con un colorante o una enzima, este método tiene baja sensibilidad (36).

El segundo es el método indirecto: en este la interacción antígeno-anticuerpo se amplifica mediante la introducción de un segundo anticuerpo obtenido contra el primero en un animal distinto y marcado con colorantes fluorescentes o enzimas. Por ejemplo si la IgG primaria fue hecha en conejo, se emplea una IgG, anticonejo producida en cabra u oveja (fig 6) (26).

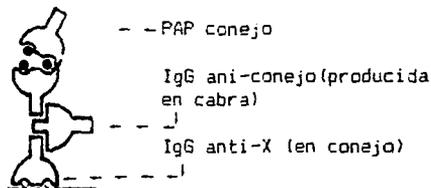
Por otro lado, existen dos formas de llevar a cabo estos métodos; una es incubando el anticuerpo en el tejido fijado y congelado (método preinclusión) y la otra incubando el anticuerpo en tejido que se ha fijado e incluido en resina (método de post-inclusión). El primero tiene las desventajas de que sólo se puede realizar en rebanadas gruesas de tejido (10 a 40 micras) sacrificando la resolución de la reacción inmunocitoquímica, y de que la preservación de la morfología es pobre, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica; independientemente de los problemas de penetración del anticuerpo y la formación de precipitados inespecíficos (27).

El segundo tiene la ventaja de que se puede hacer la

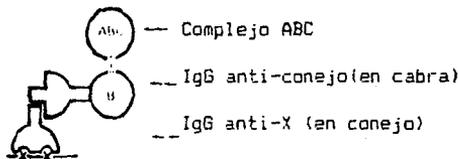
## INMUNOFLUORESCENCIA



## PAP (peroxidasa-antiperoxidasa)



## ABC (complejo avidina-biotina-peroxidasa)



## ORO COLOIDAL

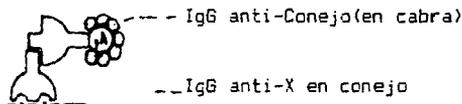


Figura 6. Técnicas utilizadas más frecuentemente en la inmunocitoquímica con el método indirecto:

(1) Inmunofluorescencia: se aplica un segundo anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente (como la fluoresceína o la rodamina).

(2) Peroxidasa-antiperoxidasa: se aplica un segundo anticuerpo, al cual se le une a su vez un tercer anticuerpo que lleva unido un complejo, formado por un anticuerpo antiperoxidasa unido a peroxidasa (peroxidasa-antiperoxidasa).

(3) Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC): se adiciona un segundo anticuerpo que lleva unido biotina, y a continuación se adiciona un complejo que tiene avidina-biotina-peroxidasa, este se unirá a la biotina del segundo anticuerpo.

(4) Oro coloidal: el anticuerpo secundario tiene unido partículas de oro coloidal en la porción Fc, las cuales son electrófilas, y por lo tanto visibles al microscopio electrónico.

En (2) y (3) la reacción de la peroxidasa se visualiza con diaminobenzidina (cromógeno).

inmuntinción en cortes de tejido menores de una micra, con lo que aumenta la resolución, y además la preservación morfológica es muy buena. Aunque tiene el inconveniente de que, para que pueda penetrar el anticuerpo se debe remover la resina con substancias agresivas como el etóxido de sodio, el cual se debe utilizar con cuidado para evitar la destrucción de sitios antigénicos del tejido.

#### Controles utilizados en inmunocitoquímica

Con ambos tipos de metodologías es natural que surjan dudas en cuanto a la especificidad de la reacción por lo que deben utilizarse el mayor número de controles posible y para evitar estos cuestionamientos, en cualquier estudio inmunocitoquímico se realizan controles negativos y positivos.

Controles negativos: en este tipo de controles se espera la abolición de la inmuntinción positiva, al omitir en la reacción inmunocitoquímica, al anticuerpo primario, ó al bloquearlo con su antígeno y adicionarlo a la preparación. En el caso de anticuerpos contra moléculas pequeñas como los aminoácidos, se acostumbra incubar al anticuerpo con análogos estructurales de la molécula en cuestión.

Controles positivos: consisten en correr una muestra paralela a la experimental, en la que se sepa que existen células con inmunoreactividad positiva al anticuerpo en estudio.

Finalmente es pertinente aclarar que es común referirse en inmunocitoquímica al término "inmunoreactividad positiva de una substancia parecida a", en virtud de que las reacciones son específicas en cierto sentido, esto se debe a que

substancias diferentes , pueden estar relacionadas unas con otras compartiendo epitopos comunes (determinantes antigenicos) que unan la misma especie de anticuerpo.

En el presente trabajo se utilizó el método inmunocitoquímico indirecto en tejido incluido en resina, para lo cual se aislaron los órganos del aparato vestibular de cuy (crestas ampulares y utrículo) y se procesaron para microscopía electrónica, realizando cortes semifinos de 0.5 a una micra, para microscopía óptica y cortes finos de 80-100 nm , para microscopía electrónica.

Se utilizó un antisuero anti-GABA, donado por el Dr. Robert Wenthold, que tiene las siguientes características: es un antisuero policlonal, purificado por cromatografía de afinidad al pasarse por columnas que contienen los conjugados de aminoácidos como glicina , ácido aspártico , ácido glutámico, glutámico, alanina, beta-alanina, taurina y glutamina (45), lo que permite suponer razonablemente, que el antisuero utilizado como reactivo, es GABA-específico.

El glutaraldehído utilizado en la preparación del antígeno fué escogido por su habilidad de unir aminoácidos marcados con tritio en tejido cerebral y preservar además la morfología. El razonamiento fué que los complejos de fijación formados en el tejido serían semejantes a los utilizados para la inmunización y por lo tanto ser reconocidos por anticuerpos específicos, lo que efectivamente se ha comprobado, ya que los patrones de inmunotinción que producen estos anticuerpos son consistentes con datos bioquímicos sobre la distribución de GABA en el sistema nervioso central (28).

Con este tipo de metodología se pretendió corroborar los hallazgos bioquímicos y aportar evidencias más directas en favor del GABA como neurotransmisor aferente en la periferia sensorial del vestíbulo de los vertebrados.

## M A T E R I A L E S

### Reactivos:

A) Para el procesamiento de las muestras para microscopía óptica y electrónica :

1.-Paraformaldehído en polvo (Polysciences, Warrington, Filadelfia, USA: PWFUSA).

2.-Cacodilato de sodio (PFWUSA).

3.-Óxido de propileno (PFWUSA).

4.-Glutaraldehído, solución al 50% (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Filadelfia, USA: EMS).

5.-Tetróxido de osmio (EMS).

6.-Resina para inclusión, Embed-812 :el kit (juego) contiene cuatro sustancias; DDSA (anhídrido dodecenil succinico) resina, NMA (anhídrido metil nadílico) endurecedor, DMP-30 (2,4,6,-tri (dimetil aminometil)fenol)acelerador y EM bed-812 (resina).

7.-Azul de toluidina (EMS).

8.-Resina para montar cubreobjetos, Poly-Mount, mounting media (PWFUSA).

9.-Alcohol etílico absoluto (J.T.Baker, Xalostoc, México).

B) Reactivos para la inmunocitoquímica:

1.-Anticuerpo primario anti-GABA, policlonal, donado por el Dr. Robert Wenthold del NIH, Bethesda, Maryland, USA.

2.-Juego (kit) ABC, Vector-Vectastain. Este kit contiene:

2.1. Suero normal de cabra.

2.2. Anticuerpo secundario anti-conejo, producido en cabra.

2.3. Avidina (reactivo A).

2.4. Biotina-peroxidasa (reactivo B).

(Fuente: Vector Labs, Burlingame, California, USA).

3.- Anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra, marcado con particulas de oro coloidal de 15 nanometros de diámetro ( Janssen Life Sciences Products, Olen, Belgica).

4.-3,3, Diaminobenzidina (PWFUSA).

5.-Metaperiodato de sodio (Sigma, St.Louis Missouri, U S A : SSSLMUSA).

6.-Tritón X-100 (SSLMUSA).

7.-Acido gamma-aminobutírico (GABA) (SSLMUSA).

8.-Peróxido de hidrógeno al 30% (Merck, México).

C) Sales:

1.-Hidróxido de sodio (J.T.Baker, Xalostoc, México: JTMBXM).

2.-Cloruro de sodio (JTMBXM).

3.-Fosfato de sodio monobásico, monohidratado (JTMBXM).

4.-Fosfato de sodio dibásico, heptahidratado (JTMBXM).

Soluciones:

1.-Etóxido de sodio: solución saturada de hidróxido de sodio en alcohol etílico absoluto. Preparar 15 días antes, ó usar hasta que la solución tenga un color ámbar. Se utiliza diluida en alcohol etílico absoluto (1:1).

2.-Metaperiodato de sodio al 1% ( 1 g. diluido en 100 ml de agua destilada, desionizada).

3.-Solución salina isotónica (SSI) (0.9 g de NaCl en 100 ml de agua destilada, desionizada).

4.-Paraformaldehído al 8%(solución Stock) (80 g de

paraformaldehído en 1000 mililitros de agua destilada, desionizada).

Manera de prepararse: se adicionan 80 g de paraformaldehído a 900 ml de agua destilada desionizada, previamente calentada a ebullición y se agita, a continuación se adicionan aproximadamente 4 ml de una solución de hidróxido de sodio tres molar, hasta que la solución se aclara. Se deja enfriar y se filtra. Preparar el mismo día, o un día antes.

5.-Amortiguador de cacodilato de sodio, 0.2M, pH 7.4. (42.84g en 1000 ml de agua destilada desionizada. Ajustando el pH con una solución de ácido clorhídrico 0.1M).

6.-Solución fijadora: se prepara mezclando 500 ml de paraformaldehído al 8% con 500ml de amortiguador de cacodilatos (solución 5), y adicionando 4 ml de glutaraldehído al 50%. Quedará una solución fijadora, al 4% de paraformaldehído, 0.2 glutaraldehído en amortiguador de cacodilato 0.1M. Esta solución fijadora se ajusta a pH 7.2-7.3.

7.-Amortiguador de solución salina y fosfatos (PBS), 0.1M, pH 7.4. Se preparan dos litros (Cloruro de sodio 16g, Fosfato de sodio monobásico monohidratado 2.43g, y fosfato de sodio dibásico, heptahidratado 27g).

8.-PBS con Tritón X-100 al 0.3% (PBS-T): a 100 ml de PBS, se le adicionan 0.3 ml de Tritón X-100.

9.-Suero normal de cabra al 10% en PBS-T.

10.-Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC): a 5 mililitros de PBS-T se le adicionan 50 microlitros del reactivo A del Kit de Vector y 50 microlitros del reactivo B (se prepara

media hora antes de usarse).

11.-Diluciones del anticuerpo anti-GABA (para diluir este anticuerpo se utiliza PBS filtrado con filtro Millex-GS, con poro de 0.22 micras (Millipore, Bedford, MA, USA).

12.-Diluciones de los anticuerpos secundarios. Se realizan de la misma manera que con el anticuerpo primario sólo que se utiliza PBS-T.

13.-Azul de toluidina (solución acuosa al 0.5 % en borato de sodio al 1% ).

14.-Diaminobenzidina(DAB).Se prepara la DAB disolviendo 20 mg de esta sustancia en 20 ml de PBS (filtrandolo) y adicionando 5 microlitros de agua oxigenada al 30 % .

15.-Preparación de la resina EM bed-812:EM bed-812,13ml;DDSA,8ml;NMA,7 ml;DMP-30,1.6ml.Adicionar uno por uno en ese orden en agitación.

Animales:Se usaron cuyes machos sanos pigmentados(Cavia cobaya) de 200-250 g. de una colonia ubicada en el laboratorio de Otoneurobioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM,México, y del Instituto Kresge, para la Investigación Audiológica de la Universidad de Michigan,Ann Arbor Michigan,USA.

## M E T O D O S

### Perfusión y fijación del tejido:

a) Se anestesió al animal con una solución de hidrato de cloral (300 mg /kg de peso) por vía intraperitoneal.

b) Se realizó la perfusión cardíaca, primeramente con 100 ml de una solución de lavado (solución salina isotónica), seguido de la solución fijadora (4% paraformaldehído, 0.2% de glutaraldehído, en amortiguador de cacodilatos, pH 7.4, 0.1M).

Técnica de disección del tejido: terminada la perfusión se decapitó al animal, se abrió el cráneo sagitalmente y se removió el cerebro. Se separaron las bulas auditivas, las cuales se abrieron y se sumergieron en la misma solución fijadora, y bajo el microscopio estereoscópico, se extrajeron los tres canales semicirculares y el utrículo. Se dejó el tejido sumergido en la solución fijadora por tres horas a 4 ° C (segunda fijación).

Procesamiento de las muestras hasta su inclusión en resina (microscopía óptica y electrónica):

a) Terminada la segunda fijación, se lavó el tejido con amortiguador de cacodilatos, 0.1 M, pH 7.4 tres veces por 20 minutos (en adelante los lavados se indicaran X, es decir: 3X20 significa, que se lavó tres veces por 20 minutos).

b) Post-fijación: se realizó sumergiendo el tejido lavado en una solución de tetróxido de osmio al 0.1% (preparado en amortiguador de cacodilatos, 0.1 M, pH 7.4) durante una hora.

c) A continuación se lavó en amortiguador de cacodilatos (0.1

M, pH 7.4) .

d) Deshidratación: se deshidrató el tejido con alcohol etílico, en concentraciones ascendentes (35%, 50%, 70%, 80%, 95%) por 10 minutos cada uno a 4<sup>o</sup> C. Finalizando con alcohol al 100% (3 X 10 minutos) y se transfirió finalmente a óxido de propileno al 100% (2 X 5 minutos).

e) Preinclusión del tejido en resina : el tejido se transfirió cuidadosamente a una mezcla de resina : óxido de propileno 1 : 1 por tres horas . Posteriormente a resina : óxido de propileno 3 : 1 durante toda la noche; al final a resina pura por cuatro horas.

f) Inclusión del tejido en resina : en estas condiciones se incubó durante 48 horas a 60<sup>o</sup> C, para su polimerización.

Obtención de cortes semifinos: Se realizaron cortes semifinos de 0.5 a 1 micras de espesor de los bloques de resina con el tejido obtenido por el procedimiento anterior. Dichos cortes fueron realizados con un ultramicrotomo marca LKB, ó Sorval MT-2 semiautomático, utilizando cuchillas de vidrio.

Los cortes se recibieron en sendos porta-objetos de vidrio con una parte esmerilada y se permitió su adhesión a estos, incubando a 40<sup>o</sup> C por dos horas.

Para saber si el tejido estaba orientado en la posición deseada (corte transversal de la cresta ampular, o el utrículo), se tiñeron los cortes con azul de toluidina, adicionando una gota de la solución de azul de toluidina y calentando a 120<sup>o</sup> C por dos minutos, dejando enfriar el porta-objetos , lavando con agua destilada, desionizada (2 X 2 minutos) y se observó al microscopio

óptico. Una vez obtenidos los cortes con la orientación deseada se procedió a realizar la inmunocitoquímica.

Para permitir la penetración de los anticuerpos al tejido era necesario remover la resina, y además eliminar el tetróxido de osmio, que enmascara la reacción inmunocitoquímica, lo cual se realizó de la siguiente manera.

a) Procedimiento de remoción de la resina(Etching):

Se sumergieron los porta-objetos con los cortes adheridos perfectamente, en una solución de etóxido de sodio:alcohol etílico absoluto 1 : 1, por 10 minutos. A continuación se realizaron tres lavados con agua destilada, desionizada por 5 minutos(3 X 5).

A partir de este paso, se tuvo cuidado de no permitir la deshidratación del tejido.

b) Eliminación del tetróxido de osmio(Bleaching):

Después del procedimiento de lavado del paso anterior, se transfirieron los porta-objetos a una solución acuosa de metaperiodato de sodio al 1 %, por 5 minutos, seguido de un lavado con agua destilada, desionizada, por un minuto, y 5 minutos más en la solución acuosa de metaperiodato de sodio al 1% (en este paso cabe aclarar , que es necesario utilizar tetróxido de osmio, para tener el tejido perfectamente fijado, ya que de lo contrario, las células del epitelio sensorial se observarían colapsadas).A continuación se realizaron tres lavados con agua destilada desionizada por 5 minutos.

Inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica

a) Los cortes tratados con los procedimientos anteriores, se incubaron en suero normal de cabra al 3% en

PBS-T, por una hora a temperatura ambiente y en agitación .

b) Se lavaron brevemente por dos minutos en agua destilada, desionizada.

c) Se aplicó el anticuerpo anti-GABA (diluido 1:200,1:500,1:1000) y se dejó incubando por 48 horas, a 4 ° C , en una cámara húmeda.

d) Al final de la incubación se efectuaron tres lavados con PBS(30 X 20 minutos).

e) Se aplicó el segundo anticuerpo(anti-conejo producido en cabra),diluido 1:50 en PBS-T, y se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación .

f) Se lavó con PBS (3 X 10 minutos).

g) Se aplicó el complejo ABC(Avidina-Biotina-Peroxidasa) por una hora y se incubó a temperatura ambiente, con agitación (este complejo se preparo una hora antes de usarse , adicionando 50 microlitros del reactivo A a 5 ml de PBS-T y 50 microlitros del reactivo B)(12).

h) Se lavó con PBS, 3 X 20 minutos.

i) Se adiciona la DAB, recientemente preparada (50 a 100 microlitros por porta-objeto y se observó el desarrollo del precipitado bajo el microscopio óptico a 10 aumentos(10X)(durante 2-4 minutos).

j) Se detuvo la reacción por dilución de la DAB, sumergiendo los porta-objetos en agua destilada,desionizada, por 10 minutos dos veces.

k) Se dejaron secar los porta-objetos a temperatura ambiente, toda la noche, guardándolos en una caja, para protegerlos del

polvo.

l) Se cubrió el tejido con Poly-Mount y un cubre-objetos.

m) Se realizó la observación en un microscopio óptico marca Polybar Reichert, a diferentes aumentos: 10X, 40X y 100X, en campo claro, en ausencia de filtros y también, bajo iluminación tipo Nomarski.

n) Se realizó el registro fotográfico, utilizando una película Kodak, Plus Pan, ASA 125, para blanco y negro o una Kodacolor ASA 400, para color a 10X, 40X y 100X.

Controles utilizados en el procedimiento inmunocitoquímico:

Controles negativos: Incubación del tejido sin el anticuerpo primario (reemplazado por PBS) ó con el anticuerpo anti-GABA absorbido con su antígeno ( anticuerpo anti-GABA, más el conjugado GABA - glutaraldehído - albumina sérica bovina ) en sustitución del anticuerpo anti-GABA.

Controles positivos : realización del procedimiento inmunocitoquímico en cortes transversales de cerebelo del mismo animal fijado, en donde se sabe hay células, que son inmunorreactivas a los anticuerpos anti-GABA.

Inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica, utilizando un anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal de 15 nanómetros de diámetro.

a) Perfusión / Fijación / Inclusión: se realizó el mismo procedimiento que se utilizó para microscopía óptica.

b) Obtención de los cortes ultrafinos: Se realizaron cortes ultrafinos de 80-100 nm de los mismos bloques de resina de donde se obtuvieron los cortes semifinos, utilizando una cuchilla de

diamante (Diatome, Reichert), en un ultramicrotomo marca Reichert Ultracut E.

c) Los cortes se recogieron en rejillas de níquel de 400 mesh, y se dejaron secar por 24 hrs, en una caja de Petri a temperatura ambiente.

Al día siguiente:

1) Se incubaron los cortes en metaperiodato de sodio al 1%, por 20 minutos.

2) Se lavaron las rejillas cada una con 50 gotas de PBS, contenido en una jeringa de 10 ml, la cual tiene un filtro Millipore de 0.22 micras (Todos los lavados de los pasos que se describen a continuación se realizaron de esta manera).

3) Se adicionaron 50 microlitros de suero normal de cabra al 30% en PBS-T, y se incubó una hora a temperatura ambiente y con agitación.

4) Se eliminó el exceso de suero normal de cabra, sin dejar secar la rejilla. Se adicionó el anticuerpo anti-GABA (diluido en PBS-T) y se incubó por 24 horas en agitación y a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

5) Se lavó el exceso de anticuerpo con PBS dos veces y se adicionó el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo en cabra) diluido en PBS-T.

6) Se lavó con agua destilada desionizada dos veces y se dejó secar las rejillas, a temperatura ambiente por dos horas en una caja Petri.

7) Se tiñó con acetato de uranilo (solución acuosa al 1%) por tres minutos y con citrato de plomo (solución acuosa al 1%)

por tres minutos . Se lavaron los cortes y se dejaron secar a temperatura ambiente, por dos horas.

8) Se observó al microscopio electrónico, utilizando un microscopio marca Jeol 140 ó Jeol 1400.

Optimización de las condiciones a seguir para la inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica : Para ello se experimento con los siguientes parámetros:

- a) La concentración del anticuerpo anti-GABA.
- b) La concentración del anticuerpo secundario.
- c) El nivel de tinción de fondo(background).

Para (a) se probaron diferentes concentraciones de anticuerpo anti-GABA, de 1:100,1:200,1:300,1:400,1:500,1:750 ,1:1000 y 1:2000 manteniendo la concentración de anticuerpo secundario constante.

Para (b) se utilizaron concentraciones de anticuerpo secundario desde 1:10,1:20,1:30 y 1:40, manteniendo la concentración de anticuerpo primario constante .

Para (c) se utilizaron los siguientes controles:

Control positivo, núcleos cocleares.

Control negativo, adición del anticuerpo anti-GABA, absorbido con su antígeno, y la omisión del anticuerpo primario en el procedimiento inmunocitoquímico reemplazandolo por PBS.

Además se consideró como un nivel de background aceptable(no significativo) la aparición de menos de 10 partículas de oro coloidal en una area en donde no haya tejido(solo resina), como la porción apical de un corte transversal de la cresta ampular ó la porción luminal de los vasos sanguíneos(es decir se compara un area en donde se presume hay inmunorreactividad, con

respecto a un área en donde no haya tejido, o tejido no inmunoreactivo). Además se compara la densidad de partículas entre una célula pilosa y una célula de soporte, en donde a nivel de microscopía óptica no aparece inmunorreactividad.

De 32 experimentos que se realizaron, cada uno por triplicado (entre (a) y (b)) se obtuvo, que a concentraciones altas de anticuerpo anti-GABA, 1:100 y 1:200, apareció un elevado nivel de background, al igual que a altas concentraciones de anticuerpo secundario 1:1. Por otro lado a altas diluciones de anticuerpo primario (1:750 en adelante) ó anticuerpo secundario (1:30, 1:40), se obtuvo una inmunotinción muy pobre, por lo que las condiciones óptimas fueron: anticuerpo anti-GABA, dilución 1:300, 1:400 y 1:500; anticuerpo secundario 1:20, con las cuales se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

## RESULTADOS

Los resultados de los que se informa en este trabajo, son representativos de experimentos realizados en cinco cuyes para microscopía óptica y cuatro para microscopía electrónica.

Las fotografías nos muestran cortes de una micra para microscopía óptica ó cortes finos de 80-100 nm de espesor para microscopía electrónica, realizados en las ampollas de los canales semicirculares del oído interno del cuy.

### Microscopía Óptica

La figura 1a y 1b nos muestran cortes controles semifinos del canal semicircular posterior, de una micra a dos aumentos (100X y 250X), teñidos con azul de toluidina, en los cuales podemos distinguir los siguientes elementos : el epitelio sensorial vestibular (ES), formado por las células pilosas tipo I y II, y las células de soporte. Además se observa el epitelio de transición (Et) en el arranque de la cresta ampular, y fibras nerviosas que atraviesan el estroma y que inervan al epitelio sensorial.

Con la técnica de inmunocitoquímica utilizando el método de la Avidina-Biotina-Peroxidasa y el método de postinclusión a nivel de microscopía óptica encontramos los siguientes resultados: Se observó GABA-LI en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II (figura 2), en algunas fibras nerviosas gruesas que atraviesan el estroma y llegan al epitelio sensorial.

Al probar diferentes concentraciones de anticuerpo

anti-GABA , se observó mismo patrón de inmunorreactividad (1:200,1:500,1:1000).La figura 2 nos muestra GABA-LI a una dilución de 1:1000, mientras que la figura 3 nos muestra GABA-LI a una dilución de 1:200 , en la cual se observa tinción de fondo.Los resultados que se muestran en las siguientes figuras son utilizando una dilución de anticuerpo anti-GABA 1:1000, con la cual disminuyó la tinción de fondo y se economizó anticuerpo.

No se encontró inmunorreactividad cuando (a) la técnica fué seguida utilizando el anticuerpo anti-GABA,preabsorbido con su antígeno(figura 4),o (b)al sustituir el anticuerpo anti-GABA,por PBS (figura 5) . Al preincubar el anticuerpo anti-GABA con GABA libre ( a una concentración de 10 mM ) no se observó ningún decremento en la inmunotinción (resultados no mostrados) .

A mayor aumento se observó que no todas las células se teñían igualmente, es decir, mientras que la tinción en las células pilosas tipo II era intensa y constante, en toda la cresta ampular , las células pilosas tipo I mostraron diferentes grados de inmunorreactividad : algunas aparecieron intensamente teñidas, otras moderadamente teñidas y algunas otras no se teñieron (figura 6).Esta distribución se observó principalmente en la porción superior de la cresta ampular.

Algunas fibras que llegan al epitelio sensorial también presentaron inmunorreactividad( figura 1).A mayor aumento se observa, que estas fibras corresponden a los cálices aferentes , que hacen contacto con las células pilosas tipo

I. Además también se observó, que como la célula tipo I los calices aferentes también presentaron diferentes patrones de inmunreactividad, desde intensos a ausentes (figura 6, y figura 7). En la porción basolateral (derecha e izquierda) de la cresta ampular, la inmunotinción en las células pilosas tipo I y II, las fibras nerviosas y los calices aferentes, fue constante, e intensa.

Al realizar la inmunocitoquímica en cortes de una micra de la mácula de utrículo, se observó, el mismo patrón de inmunotinción que presentó la cresta ampular (figura 8). Finalmente, cabe señalar, que en ningún caso se observó inmunoreactividad en las células de soporte.

#### Microscopía Electrónica

Al realizar experimentos controles únicamente, para familiarizarse con la morfología de las células pilosas I y II, se encontró con la típicamente descrita en la literatura (41,44): La célula pilosa tipo I tiene forma de botella, y esta envuelta por una fibra nerviosa aferente en forma de caliz (CA), las células de soporte flanquean a está a toda su longitud (figura 9).

La figura 10, nos muestra una célula pilosa tipo II, la cual tiene forma alargada, y no esta envuelta por el cáliz nervioso aferente, además se observa, que la rodean varias células de soporte (cs), y en la porción inferior izquierda, se observa la parte basal de una célula pilosa tipo I, envuelta por su cáliz aferente.

Con la técnica inmunocitoquímica indirecta, utilizando el anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal de 15

nanómetros de diámetro encontramos los siguientes resultados:

Se observó GABA-LI en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II ( figura 11 y figura 12 ) en algunas fibras nerviosas gruesas que atraviesan el estroma (figura 14, y figura 15) , que llegan al apitelio sensorial, y en los calices nerviosos aferentes ( figura 12 ).

No se encontró GABA-LI en las células de soporte (figura 16), ni en los botones eferentes (figura 17) .

Al igual que por microscopia óptica, tampoco se encontró GABA-LI, cuando se preincubó el anticuerpo con su antígeno y cuando el anticuerpo anti-GABA, se sustituyó por PBS la reacción inmunocitoquímica (resultados no mostrados).

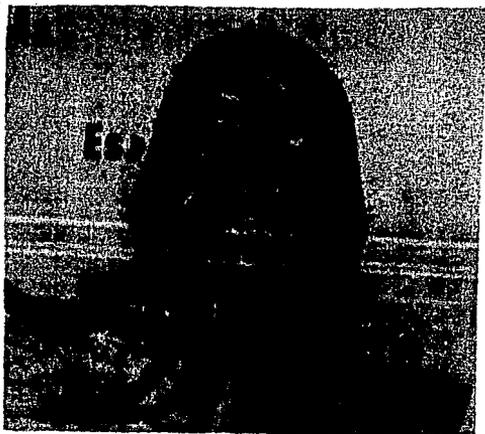


Figura 1A. Corte transversal de una micra de la cresta ampular del canal semicircular posterior (control) de cuy, teñida con azul de toluidina. Es= Epitelio sensorial, Et = Epitelio de transición. Las fibras nerviosas se señalan con flechas. Campo claro, 100X.

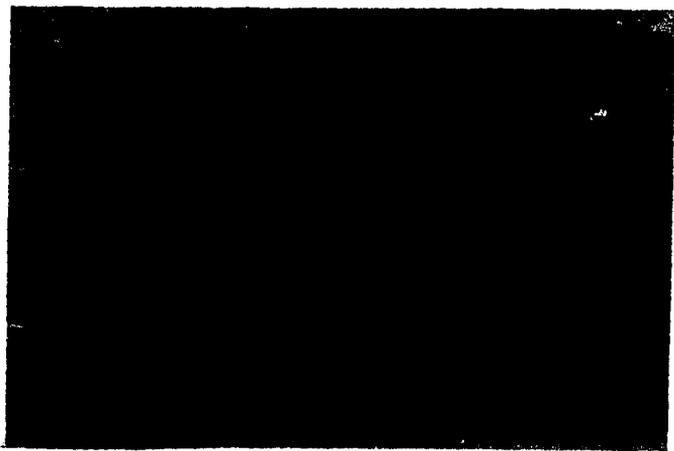


Figura 1B. Corte transversal de una micra de la parte superior de la cresta ampular (control), mostrando las células pilosas tipo I y II (cabeza de flecha), las células de soporte (flechas) y el estroma (e).

2

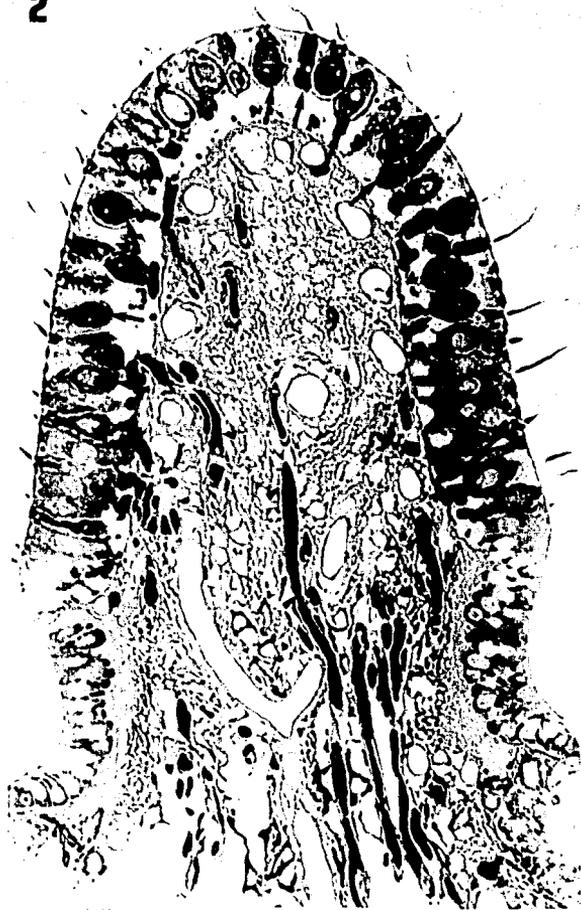


Figura 2. Corte transversal de una micra de la cresta ampular del canal semicircular posterior, mostrando GABA-LI en las células pilosas I y II (flechas) y en las fibras nerviosas, que atraviesan el estroma (cabezas de flecha). Se utilizó una dilución del anticuerpo primario de 1:1000. X 100, campo claro.

3



Figura 3 . Corte transversal de la misma cresta ampular, mostrando GABA-LI, en las células pilosas I y II (flechas) y en las fibras nerviosas ( cabezas de flecha ). Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:200 . X 100, campo claro .

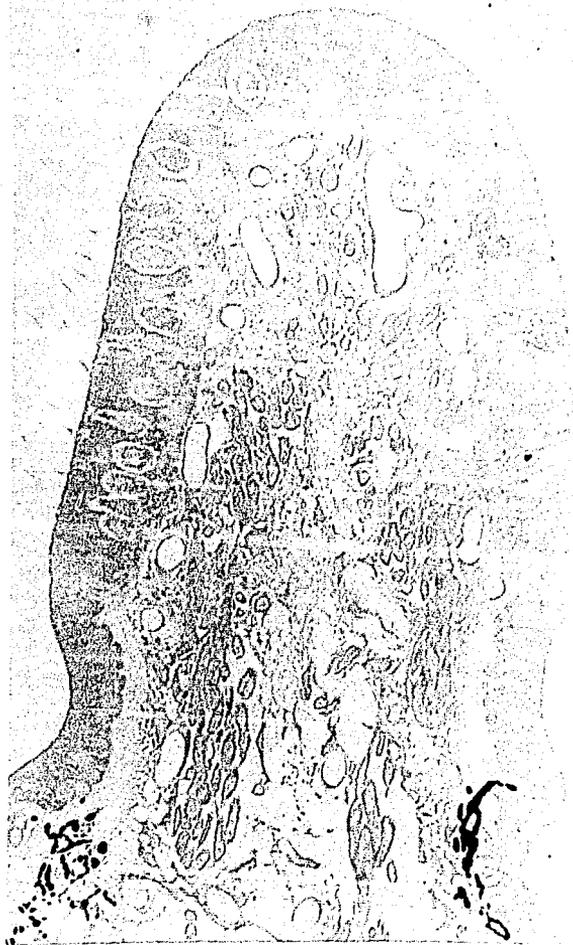


Figura 4 . Corte transversal de la cresta ampular del canal semicircular posterior, en el cual se llevó a cabo la inmunorreacción con el anticuerpo anti-GABA, pre-absorbido con su antígeno (control negativo), no se observa GABA-LI en ninguna zona de la cresta ampular . En la base se observan células que contienen melanina. X 100, campo claro.

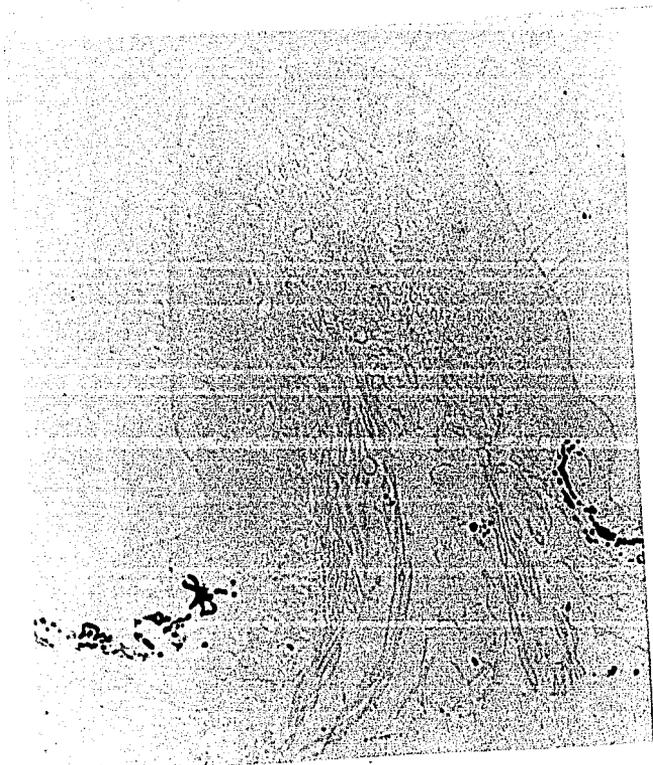


Figura 5. Corte transversal de una micra de la cresta ampular del canal semicircular posterior, en el cual se reemplazó el anticuerpo anti-GABA por PBS(control negativo) y se llevó a cabo la inmunotinción. En la base se observan células que contienen melanina. X 100, campo claro.

6



Figura 6. Corte transversal de una micra de la cresta ampular del canal semicircular posterior. Se muestran diferentes patrones de GABA-LI en las células pilosas y en sus cálices, señalados de la siguiente manera: fuertemente inmunorreactivos (Fr), moderadamente inmunorreactivos (Mr), y no reactivos (Nr). X 400, Iluminación con la técnica de Nomarski. Dilución del anticuerpo anti-GABA, 1:1000.

7



Figura 7. Porción superior de la cresta ampular del canal semicircular posterior, mostrando GABA-LI, con la técnica de Nomarski, ejemplificando: una célula pilosa tipo I y II, fuertemente téñida (cabeza de flecha), un cáliz aferente sin téñir (flecha pequeña) y un cáliz fuertemente inmunorreactivo, que contiene a dos células pilosas (doble cabeza de flecha).  
X 1000. Dilución del anticuerpo anti-GABA ,1:1000.

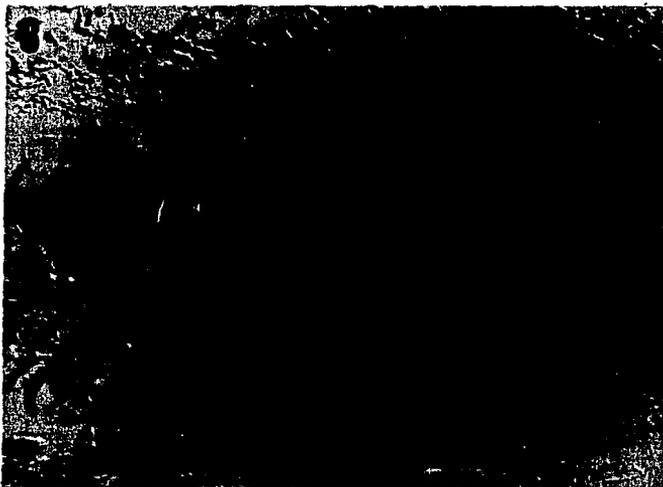


Figura 8 . Corte transversal de la mácula del utrículo del vestibulo del cuy, mostrando GABA-LI, en las células pilosas I y II (flechas) y en las fibras nerviosas (cabeceras de flecha). Se observa ausencia de GABA-LI (flechas cruzadas) en las células de soporte. Iluminación con la técnica de Nomarski.

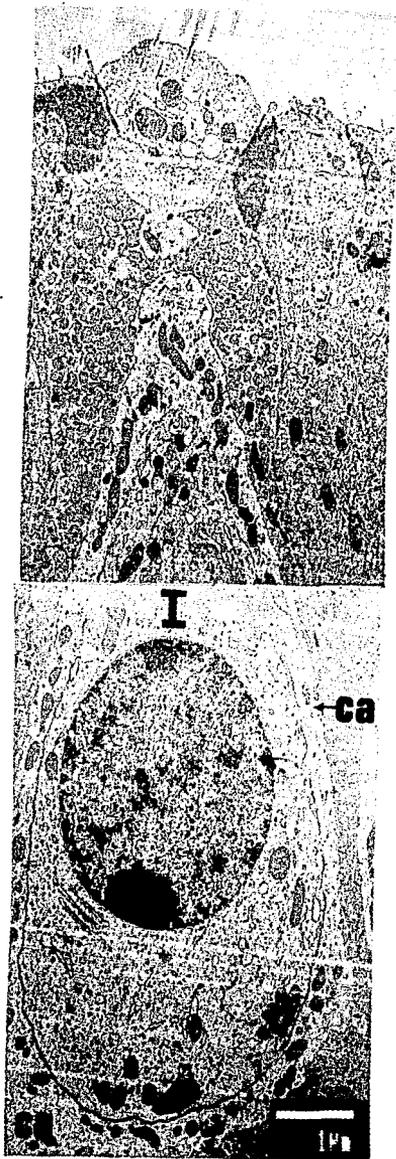


Figura 9 . Corte fino (80-90 nanometros) transversal de la la cresta ampular (en la porción superior) del canal semicircular posterior de cuy(control), mostrando una célula pilosa tipo I(I) y su cáliz nervioso aferente (ca). Teñido con acetato de uranilo ( 3 minutos) y citrato de plomo ( 5 minutos) . X6000.



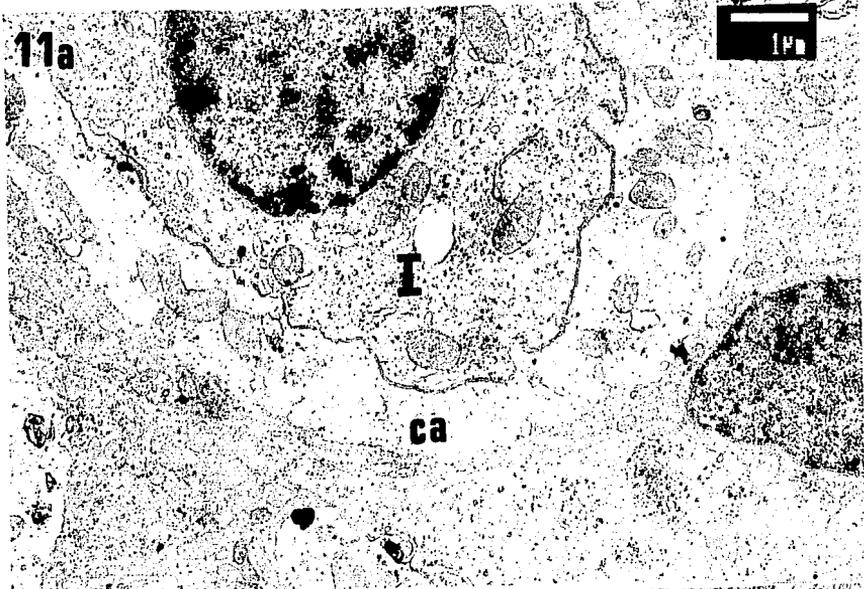




Figura 12 . Corte transversal de la cresta ampular del canal semicircular posterior de cuy, mostrando GABA-LI en la porción basal de una célula pilosa tipo II (II), se observan también dos botones aferentes (ba) haciendo sinapsis con ella (las flechas señalan las partículas de oro ) En la parte inferior de la fotografía se observa una célula de soporte (cs) . Barra sináptica (bs) .Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:500, dilución del anticuerpo secundario 1:20.



Figura 13 .Porción basal de una célula pilosa tipo I con su cáliz aferente, en la cual muestra una alta densidad de partículas de oro (GABA-LI fuertemente inmunorreactiva).Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:400, dilución del anticuerpo secundario 1:20 .

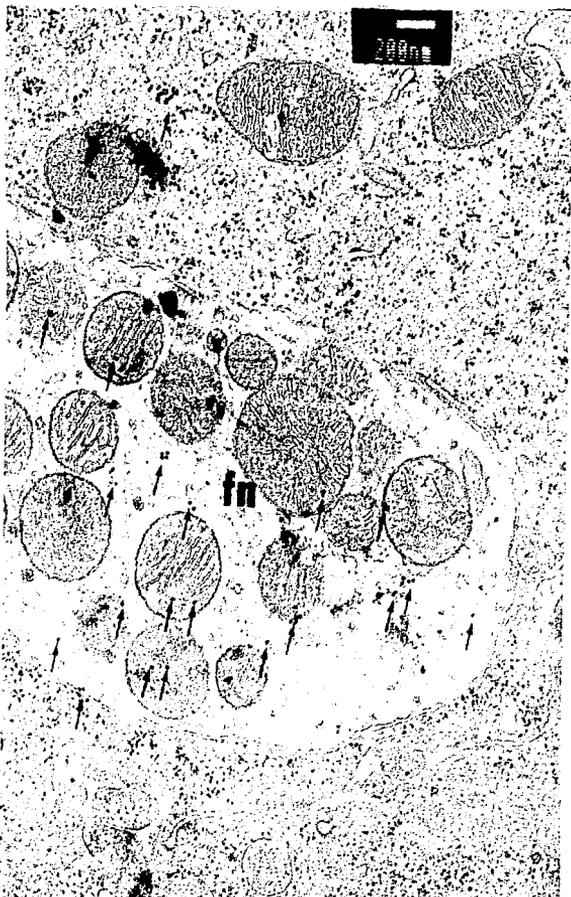


Figura 14. Fibra nerviosa (fn) que va hacia el epitelio en el cual se puede observar una alta densidad de partículas de coloidal. Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:500, dilución del anticuerpo secundario 1:20.



Figura 15. Fibra nerviosa (fn) que va hacia el epitelio, y que se encuentra flanqueada por una célula de soporte, y una célula pilosa tipo II (II) . Tanto en la fibra como en la célula II, se observa una alta densidad de partículas de oro (GABA-LI) oro (GABA-LI) (flechas). Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:500, dilución del anticuerpo secundario 1:20 .



Figura 16 GABA-LI en la porción basal de una célula pilosa I (I) y en su cáliz aferente(ca). En la parte inferior se observa una célula de soporte (cs) y su núcleo(n), en esta célula se observa la ausencia de GABA-LI. GABA-LI esta representada por flechas. Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:400, anticuerpo secundario 1:20.

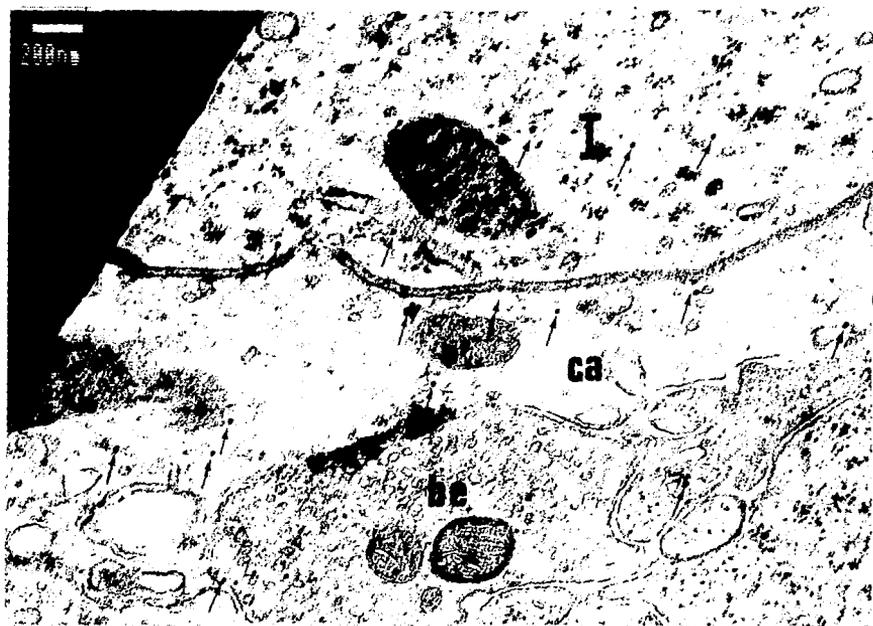


Figura 17. Porción basal de una célula pilosa tipo I (I), con su cáliz aferente (ca), mostrando GABA-LI, y un botón eferente (be), sin inmunorreactividad. Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:400, anticuerpo secundario 1:20.

## D I S C U S I O N

En este trabajo se investigó la presencia de GABA en la periferia sensorial vestibular del oído interno del cuy, por la técnica de inmunocitoquímica en tejido incluido en resina(post-inclusión) a nivel de microscopía óptica y electrónica,utilizando anticuerpos anti-GABA, amablemente donados por el Dr Robert Wenthold. Las pruebas que él realizó para determinar su especificidad (45) hacen suponer , que el precipitado que indica GABA-LI pone en evidencia, razonablemente , la presencia de GABA , por lo que puede descartarse cualquier tipo de reactividad cruzada. Por otro lado se utilizaron bajas concentraciones de glutaraldehído(0.2%) y se llevaron a cabo controles negativos, como la preincubación del anticuerpo con su antígeno, lo cual eliminó la tinción específica en la cresta ampular(fig 4 ) mientras que la preincubación con GABA 10 mM no tuvo efecto sobre la especificidad de la inmunotinción (resultados no mostrados). Aunque estas pruebas sugieren que otros aminoácidos relacionados estructuralmente no son reconocidos por el anticuerpo, no se podría descartar una reacción cruzada con otros componentes similares en estructura con el GABA (28,45).

Se encontró GABA-LI en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II, en las fibras nerviosas, que atraviesan el estroma y en los cálices aferentes que envuelven a las células

pilosas I .Sin embargo se encontraron diferentes patrones de inmunotinción: en las células pilosas II, ésta fue homogénea, mientras que las células pilosas I mostraron variaciones en la intensidad del material inmunoreactivo, lo que permitió clasificarlas tentativamente en tres grupos: a) fuertemente inmunoreactivas, b) moderadamente inmunoreactivas y c) no inmunoreactivas. En el caso de las fibras nerviosas, aunque a bajo aumento el patrón fue homogéneo, a mayor amplificación se aplica la misma clasificación: a) cálices fuertemente inmunoreactivos, b) moderadamente inmunoreactivos ó C) ausencia de inmunoreactividad. De acuerdo a esto existen tres tipo de situaciones: GABA-LI en las células pilosas tipo I y II, pero no en el cáliz; GABA-LI en las células pilosas I y sus cálices y GABA-LI en el cáliz pero no en la célula.

La presencia de GABA-LI en las células pilosas I y II excepto por algunas tipo I en la porción superior de la cresta ampular y algunos cálices confirman los hallazgos recientes por inmunocitoquímica de GABA y de la GAD (la enzima que sintetiza al GABA) en las células pilosas I y II, en las crestas ampulares del pollo(37,38) .

El hallazgo GABA-LI en algunos cálices, concuerda con un artículo reciente en el oído interno del cuy en el cual sólo se encuentra inmunoreactividad en los cálices de la cresta ampular (2).

Aunque estos resultados sugieren un papel importante del GABA en el vestíbulo, no proporcionan una evidencia directa del significado fisiológico y por lo tanto sólo se puede

especular. GABA-LI moderada a intensamente positivo en la célula pilosa I y II como se ha demostrado en el pollo (37,38), concuerda perfectamente con interpretaciones indirectas que sugieren que el GABA es el neurotransmisor aferente en el vestíbulo de los vertebrados (3, 5, 7, 13, 14, 16, 19-24). En este respecto, se ha demostrado que existen diferencias en los patrones de GABA-LI en la retina del gato a nivel de la capa de células amácrinas, en las cuales existen diferentes intensidades de inmunotinción, que van de moderada a fuertemente inmunoreactivas, sugiriendo variaciones en la cantidad de material inmunopositivo al GABA (29).

La presencia de GABA-LI en los cálices aferentes haciendo contacto con una célula pilosa positiva a GABA puede sugerir que, como en el pollo, el GABA es sintetizado en la célula pilosa, liberado de ella y degradado en el caliz por la GABA-transaminasa (GABA-T), para terminar su acción (37). Experimentos evidenciando GAD-LIR y GABA-T-LIR en progreso en nuestro laboratorio podrían confirmar esta suposición.

En el caso de GABA-LI solo en los cálices aferentes, existe un artículo reciente que demuestra inmunotinción en todos los calices pero no en las células pilosas (2). Aunque los autores de este trabajo postulan un papel metabólico o modulador del GABA, que faltaría por demostrar, se podrían atribuir estas diferencias en los resultados, a que se utilizaron diferentes técnicas y diferente fuente de anticuerpos. A este respecto sería útil que todos los estudios se hicieran con la misma técnica y la misma especie de animales.

Por los resultados obtenidos en microscopía electrónica, se puede decir que los resultados de GABA-LI fueron similares a los obtenidos a nivel de microscopía óptica, aunque se debe hacer la siguiente consideración: si bien los dos métodos fueron realizados por la técnica de tejido incluido en resina, la reacción inmunocitoquímica fue diferente, ya que para microscopía óptica se utilizó la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa y para microscopía electrónica se utilizó el método indirecto del anticuerpo secundario marcado con oro coloidal, el cual se ha visto que permite detectar zonas de inmunorreactividad, que no se observan con el método de la peroxidasa. Esto podría explicar, la presencia de partículas en las células de soporte. Así mismo, la inmunorreactividad apareció al parecer constante en las células pilosas I y II, en las fibras nerviosas y en los cálices aferentes. Una cuantificación del material inmunoreactivo nos permitiría su clasificación en las diferentes poblaciones celulares.

## CONCLUSIONES

En conclusión, la inmunotinción positiva en las células pilosas I y II sugiere un papel del GABA como posible neurotransmisor aferente en las células pilosas; GABA-LI en fibras y terminales caliciformes (aferentes) contactando a las células pilosas, o GABA-LI sólo en los cálices podría indicar un sitio de degradación y/o un papel del GABA como modulador a través de un mecanismo todavía desconocido en la terminal aferente caliciforme.

## REFERENCIAS

1.-Bagger-Sjoberg, D., and Gulley, R. L. (1979) Synaptic structures in the type II hair cell in the vestibular system of the guinea pig. *Acta Otolaryngol. Stockh* 88, 401-411.

2.-Didier, A., Dupont C., and Cazals, Y. (1990) GABA immunoreactivity of chalyceal nerve endings in the guinea pig vestibule. *Cell and Tissue Research*. En prensa.

3.-Ehrenberger, K., Benkoe, E., and Felix, D. (1982) Suppressive action of picrotoxin, a GABA antagonist on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 93, 269-273.

4.-Engstrom, H. (1958) On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 49, 100-118.

5.-Felix, D., and Ehrenberger, K. (1982) The action of putative neurotransmitter substance in the cat labyrinth. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 93, 101-105.

6.-Flock, A. (1967) Ultrastructure and function in the lateral line organs. In *lateral line receptors*. P. Coch (Ed.) Indiana University Press. Bloomington, IN, USA, pp 163-197.

7.-Flock, A., and Lam, D. (1974) Neurotransmitters in inner ear and lateral line sense organs. *Nature (London)* 249, 142-144.

8.-Furukawa, T., and Ishii, Y. (1967) Neurophysiological studies on hearing in goldfish. *J. Neurophysiol*, 30, 1377-1388.

9.-Furukawa, T., Ishii, Y., and Matsura, S. (1972) Synaptic delay and time course of the postsynaptic potential at the junction

between hair cells and eight nerve fibers in the goldfish. *Jap. J. Physiol.* 22, 617-635.

10.-Gacek, R. (1974) Morphological aspects of the efferent vestibular system. In *Handbook of Sensory Physiology*. H. Kornhuber (ed.). Springer-Verlag. New York. Vol 16, pp 213-220.

11.-Gleissner, L. , and Henrikson, N. (1963) Efferent and afferent activity pattern in the vestibular nerve of the frog. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. Supp 2, 90-103.

12.-Usu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981) The use of avidin biotin complex (ABC) peroxidase technique. A comparison between ABC and labelled antibody PAP procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580.

13.-Iturbe, A.G. and Meza, G. (1985) Probable localization of GABA and Ach synthesis in the vestibule of streptomycin-treated guinea pig. *Soc. Neurosc. Abstr.* 11, 696.

14.-Iturbe, A.G. and Meza, G. (1986) Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. *Int. J. Dev. Neurosci.* 4 (Supp. 14) 532.

15.-Ishii, Y., Matura, S., and Furukawa, T. (1971) Quantal nature of transmission at the synapse between hair cells at the eight nerve fibers. *Jap. J. Physiol.* 19-79.

16.-López, I. and Meza, G. (1988) Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *Neuroscience* 25, 13-18.

17.-López, I. and Meza, G. (1990) Comparative studies on glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activities in the vertebrate vestibule. *Comparative Biochem. Physiol, Part*

B, 95B(2)375-379.

18.-Lowenstein, O., and Wersäll, J. (1959) A functional interpretation of electron microscopic structure of the sensory hairs in the cristae sensitivity. *Nature*, 184, 1807-1809.

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

20.-Meza, G. (1984) Some characteristics of glutamic acid decarboxylase, of chick ampullary cristae. *J. Neurochem.* 43, 634-639.

21.-Meza, G. (1985) Characterization of GABAergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. In D.G. Drescher (Ed.) *Auditory Biochemistry*. Charles, C. Thomas, Springfield, Ill. pp 80-101.

22.-Meza, G., Gonzalez, V., and Ruiz, M. (1985) Specific 3H-gamma aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Res.* 337, 179-183.

23.-Meza, G., and Hinojosa, R. (1987) Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. *hearing Res.* 28, 73-85.

24.-Meza, G., Lopez, I., Paredes, M.A., Peñaloza, y., and Poblano, A. (1989) Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta Otolaryngol (stockh)* 107, 406-411.

25.-Nakajima, Y., and Wong, D.W. (1974) Morphology of afferent synapse in the hearing goldfish. *J. Comp. Neurol.* 156, 403-416.

26.-Nakane, p., and Pierce, G.B. (1966) Enzyme-labelled antibodies. Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 929-931.

27.-Newman, G. R. and Jassani, B. (1984) Post-embedding immunoenzyme techniques. En immunolabelling for electron Microscopy (Polak/Vardell, Eds.) Capítulo 5, pp, 53-70.

28.-Ottersen, O.P., and Storm-Mathisen J (1987) Localization of amino acid neurotransmitters by immunocytochemistry. Trends in Neurosciences. 10, 250-255.

29.-Pourcho, R.G. and Owczarkak, T. (1989) Distribution of GABA immunoreactivity in the cat retina : a light and electron microscopic study. Visual Neuroscience 2, 425-435.

30.-Precht, W. (1984) Physiological aspects of the efferent vestibular system. En Kornhuber, H. (Ed) Handbook of sensory physiology. Vol VI \ Berlin, New York, Springer/Verlag, pp 221-236.

31.-Rossi, M.L., Valli, P., Cassela, C. (1977) Postsynaptic potential recorded from efferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. Brain Res. 135, 67-75.

32.-Rossi, M.L., Prigioni, I., Valli, P., and Cassela, C. (1980) Cassela, C. (1980) Activation of the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibers of the posterior semicircular canal. Brain res. 185, 127-137.

33.-Sjöstrand, J.S. (1958) Ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three dimensional reconstruction from serial sections. J. Ultrastruc. res. 2, 122-124.

34.-Smith, C.A. and Sjostrand, F.S. (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. J. Ultrastruc. Res. 5, 184-192.

35.-Spoendling, U. (1965) Ultrastructural studies of the role of the vestibular organs in the exploration of space. NASA

report, Sp, 77-196. Washintong, D. C. USA.

36.-Sternberger, L., Hardy, P., Cucculis, j., and Meyer, H. G. (1970) The unlabelled antibody-enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 315-333.

37.-Usami, S., Hozawa, J., Tazawa, M., Igarashi, M., Thompson, G., Wu, J. Y. and Wenthold, R. J. (1989) Immunocytochemical study of the GABA system in chicken vestibular endorgans and the vestibular ganglion. *Brain Res.* 503, 214-218.

38.-Usami, S., Igarashi, M., and Thompson, G. (1987) GABA-like immunoreactivity un the chick vestibular endorgans. *Brain Res.* 418, 383-387.

39.-Usami, S., Igarashi, M., and Thompson, G. (1987) GABA-like immunoreactivty in the squirrel monkey vestibular endorgans. *Brain Res.* 417, 367-370.

40.-Werman, R. (1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. A review. *Comp. Biochem Physiol.* 18, 745-766.

41.-Wersäll, J. (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Supp.* 126, 1-85.

42.-Wersäll, J., Flock, A., Lundquist, R. G. (1965) Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Cold. Spring Harbor. Simp. Quant. Biol.* 30, 115-145.

43.-Wersäll., and Flock, A. (1965) Functional anatomy of the

vestibular and lateral line organs. In W.D.Neff(Ed.)Contributions to Sensory Physiology.Vol 1.N.Y.Ac.Press,pp 39-61.

44.-Wersäll,J., and Bagger-Sjoberg,D.(1974) Morphology of the vestibular sense organs. In Handbook of Sensory physiology,H.Kornhuber(Ed.).Springer-Verlag, Heidelberg, New York Vol 6,p.p. 123-170.

45.-Wenthold,R.J.,Zempel,J.M.,Parakkal,K.A., Reeks, K.A., and Altschuler,R.A.(1986) Immunocytochemical localization of GABA in the cochlear nucleus of the guinea pig.Brain Res.,380,7-18.