

00562

✓
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"BIOQUIMICA DE LA NEUROTRANSMISION EN EL OIDO INTERNO DE LA RATA
PIGMENTADA".

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)
QUE PRESENTA LA QUIMICO BIOLOGO DORA ACUNA MONGE.

MEXICO, D.F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
EL OIDO INTERNO DE LOS VERTEBRADOS	4
SISTEMA VESTIBULAR Y AUDITIVO	5
MECANISMO DE TRANSDUCCION	9
VIAS VESTIBULARES	12
REFLEJO VESTIBULO-OCULAR	17
VIA AUDITIVA	19
POTENCIALES AUDITIVOS	20
TRANSMISION SINAPTICA EN EL SISTEMA ACUSTICO-LATERAL	21
NEUROTRANSMISORES	24
MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL	36
MATERIAL Y METODOS	46
RESULTADOS Y DISCUSION	56
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS	76
APENDICE: Copia del trabajo "Vestibular site of action of hypothyroidism in the pigmented rat"., actualmente aceptado en la revista Brain Research, base de la presente tesis.	101

RESUMEN

El oído interno consta de dos partes: una relacionada con la audición, que es la cóclea; y la porción vestibular que se encarga de proveer al sistema nervioso central (SNC) de una parte importante de la información sensorial necesaria para el mantenimiento del equilibrio y la postura. En el vestíbulo, esta función se lleva a cabo por las células pilosas sensoriales que envían la información que detectan al SNC a través de fibras aferentes que las inervan. A su vez, el SNC se comunica con ellas mediante conexiones eferentes. Existen evidencias de que la comunicación en ambos sentidos es de naturaleza química y se ha propuesto al ácido γ -aminobutírico (GABA) como un neurotransmisor aferente, y a la acetilcolina (ACh) como un neuromediador eferente. Para aportar evidencias al respecto, en el presente trabajo se midieron las actividades de la Glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima de síntesis del GABA, y de la Colinacetyltransferasa (CAT), enzima que sintetiza a la ACh, en homogenados vestibulares de ratas pigmentadas. Se encontró que existe actividad tanto de la GAD como de la CAT en el vestíbulo de la rata, lo que podría sugerir un papel del GABA y la ACh como posibles neurotransmisores, sin embargo faltaría por aclarar su localización celular. Con este objeto se produjeron ratas hipotiroideas por la administración de propiltiouracilo (PTU) a ratas preñadas. Al medir tanto la actividad de la GAD como de la CAT en el vestíbulo de los animales hipotiroideos, se encontró que la actividad de la GAD no se modificó, mientras que la de la CAT muestra un decremento gradual con el tiempo de tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la GAD se localiza en algunas células o compartimento del epitelio sensorial que no sufre ninguna alteración con el hipotiroidismo, mientras que la CAT podría localizarse en las terminales eferentes que se ven afectadas por el tratamiento con el PTU. El efecto del PTU sobre la tiroides se comprobó al determinar los niveles séricos de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) los que estaban totalmente disminuidos. Asimismo, tanto la disminución de la actividad de la CAT como la de las hormonas tiroideas se previno al administrar T_4 a animales hipotiroideos.

Los daños ocurridos en las funciones auditiva y vestibular se siguieron con pruebas clínicas (Registro de Potenciales Provocados Auditivos de Tallo Cerebral) para la auditiva y el reflejo vestibular. Los registros indicaron daño tanto en la parte vestibular como en la auditiva en los animales hipotiroideos. En los animales reemplazados con T_4 se observó una protección total de la función vestibular, aunque parcial de la auditiva, lo que sugiere la necesidad de un sistema eferente completo para las funciones normales del oído.

ABSTRACT

The vertebrate inner ear is divided into two parts: a portion related to audition (cochlea) and the vestibular part, which provides the major source of sensory information utilized by the central nervous system (CNS), in order to maintain balance. This function is carried out by specialized cells in mechanoreception (hair cells) through synaptic contacts with afferent fibers. The central impulses are received in the vestibule by means of efferent connections.

It is currently accepted that vestibular sensory cells have chemical synapses in which γ -aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine (ACh) function most probably as afferent and efferent neurotransmitters, respectively. To provide evidence in that respect, the enzymes of synthesis of both putative neuromediators (glutamate decarboxylase, GAD, for GABA and choline acetyltransferase, ChAT, for ACh) were measured in vestibular homogenates of Long-Evans rats. We found that GAD and ChAT activities were present in vestibular homogenates of normal Long-Evans rats, findings that provide evidence of GABA and ACh as neuromediators in the rat vestibule. To investigate GAD and ChAT localization, propylthiouracil (PTU) was administered to pregnant rats and GAD and ChAT were measured in the progeny's vestibule. PTU causes congenital hypothyroidism to offsprings of PTU-treated animals, preventing among others effects, the arrival of efferent connections to the vestibule. When we measured GAD and ChAT activities in hypothyroid animals, GAD activity was not modified whereas ChAT activity showed a gradual drop along time. These results provide evidence of the efferent bouton's localization of ChAT and that the sensory cells contains GAD being ACh and GABA their respective neurotransmitters.

Thyroid involvement in these effects was corroborated when thyroid hormones (T_3 and T_4) serum levels were determined, PTU caused decrease in both hormones in hypothyroid animals whereas in thyroxine-replaced hypothyroid rats, T_3 and T_4 were of the same magnitude as in control animals. These results resulted in a prevention of ChAT activity decrease.

Vestibular function was followed by vestibulo-ocular reflex (VOR) measurement. Auditory pathway integrity was searched by assessment of auditory evoked brainstem potentials. The hypothyroid animals showed vestibular and auditory damage; thyroxine-replaced hypothyroid rats showed a complete protection of vestibular function alteration although partial in the auditory one. These effects indicate a need of an integrity of the efferent connections for a correct vestibular and auditory function.

I N T R O D U C C I O N .

El mantenimiento del equilibrio y la orientación con respecto al centro gravitacional de la tierra, depende de los órganos vestibulares del oído interno: los canales semicirculares y los receptores otolíticos. El sistema es multimodal, pues utiliza también información procedente del sentido de la vista y de receptores somáticos situados en la piel y en las articulaciones.

Es probable que la fuerza de gravedad sirva para todos los animales como plano básico de referencia. Los órganos y los receptores sensibles a la fuerza gravitacional son muy antiguos dentro de la escala de la evolución ya que se encuentran en todos los seres vivos funcionando de la misma manera. Sin embargo, las características de los vertebrados superiores, empiezan a aparecer en los peces primitivos y evolucionan adquiriendo otros órganos, entre los que se distribuye la función (1).

La evolución del órgano para detectar información sobre la orientación probablemente ocurrió a partir de órganos primitivos que consistían en células cubiertas de cilios sensoriales (estructuras pilosas) ubicadas en cavidades de la piel de los animales acuáticos (la línea lateral); estas eran sensibles a los movimientos y vibraciones de los fluidos que llenaban la cavidad, las cuales posteriormente se especializaron y dieron lugar a las cavidades óseas del oído interno de los mamíferos.

EL OIDO INTERNO DE LOS VERTEBRADOS.

El oído interno se encuentra situado dentro del hueso temporal (o sus homólogos) en el cráneo de los vertebrados. Está formado por el laberinto óseo y el membranoso. El laberinto óseo se compone de una serie de cavidades en la porción petrosa del hueso temporal; dentro de esas cavidades se encuentra el laberinto membranoso, el cual está formado de finas membranas compuestas por un epitelio simple con porciones especializadas de epitelio sensorial. El laberinto membranoso a su vez se encuentra lleno de un líquido de composición química muy semejante al fluido intracelular, llamado endolinfa. Los espacios entre el laberinto óseo y el membranoso se encuentran llenos con perilinfa, la cual es similar en composición al fluido extracelular (1).

El laberinto membranoso está formado por dos partes: la cóclea, que desempeña la función auditiva; y los órganos vestibulares, que proporcionan al sistema nervioso la información necesaria para el mantenimiento del equilibrio y la orientación en el espacio. La porción vestibular consta de cinco órganos: tres canales semicirculares, el utrículo y el sáculo. Tanto la cóclea como los órganos vestibulares poseen regiones especializadas de epitelio sensorial. En la cóclea, éstas se encuentran en el órgano de Corti, mientras que en el utrículo y el sáculo se encuentran formando manchas, que se denominan máculas. En los canales semicirculares, se localizan en un ensanchamiento llamado ampolla, lo que constituye las crestas vestibulares (fig. 1)(1).

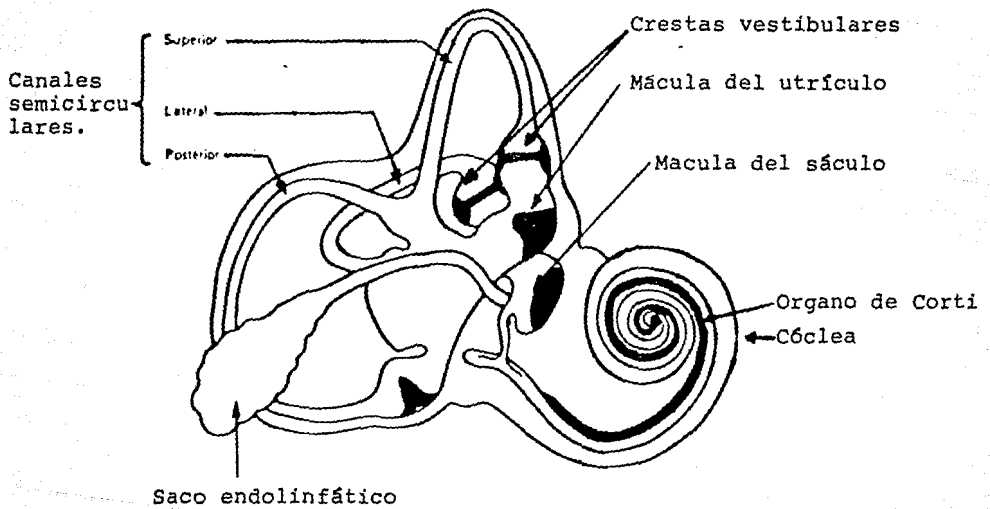


Fig. 1.- Porciones sensibles del oído interno.

SISTEMA VESTIBULAR Y AUDITIVO.

Las porciones sensitivas de los órganos otolíticos (utrículo y sáculo) responden a aceleraciones lineales, mientras que las de los canales semicirculares son sensibles a aceleraciones angulares. Las máculas de los órganos otolíticos se encuentran situadas en la pared horizontal (utrículo) y vertical (sáculo), en tanto que las crestas en los tres canales semicirculares se encuentran más o menos situadas en tres planos diferentes que son perpendiculares entre sí, y que dependiendo del plano de rotación de la cabeza resultarán afectadas las de un canal, las de dos o las de los tres canales (2).

El epitelio sensorial de los diferentes órganos vestibulares y el órgano auditivo contiene dos tipos de células pilosas, células de soporte, terminales nerviosas (aférentes y eférentes) que las inervan y un sistema de acoplamiento mecánico colocado por encima del epitelio; este sistema está formado por una masa de material amorfo, generalmente compuesto por carbohidratos, que en el caso de los órganos otolíticos constituye la membrana otolítica (por poseer embebidos cristales de carbonato de calcio u otoconias), y por la parte de las crestas, la masa cupular. Por encima de las células pilosas del órgano de Corti se encuentra la membrana tectoria (fig. 2)(2, 3).

En el vestíbulo, la célula pilosa tipo I presente sólo en los vertebrados superiores, está inervada por una terminal aférente en forma de cáliz, a su vez contactada por botones sinápticos eférentes (Fig. 3). La célula pilosa tipo II, común a

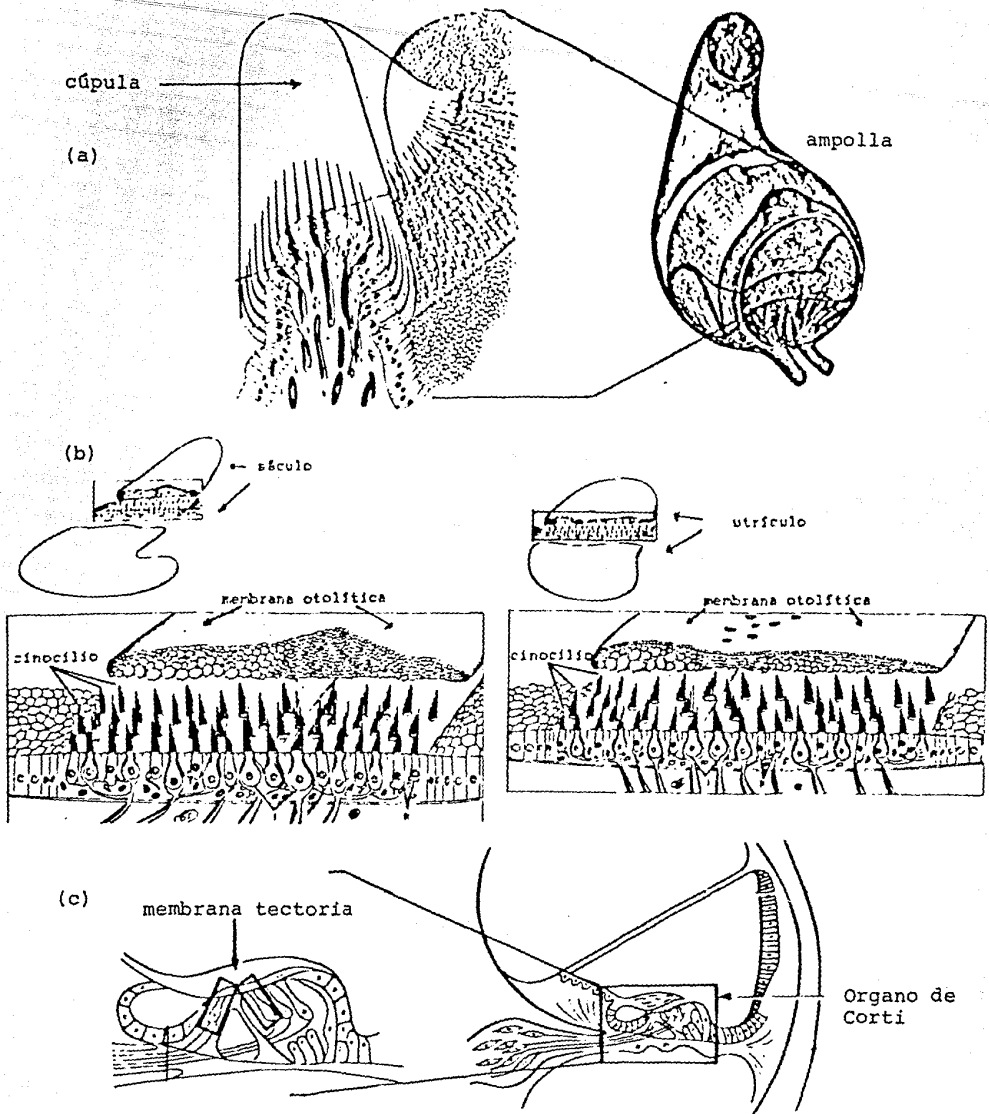


Fig. 2.- Esquema representativo de las áreas sensitivas ubicadas en: (a) las crestas vestibulares de los canales semicirculares; (b) las máculas de los órganos otolíticos del vestíbulo; (c) en el órgano de Corti coclear, mostrando los elementos fundamentales y los sistemas de acoplamiento mecánico (cúpula, membrana otolítica y membrana tectoria).

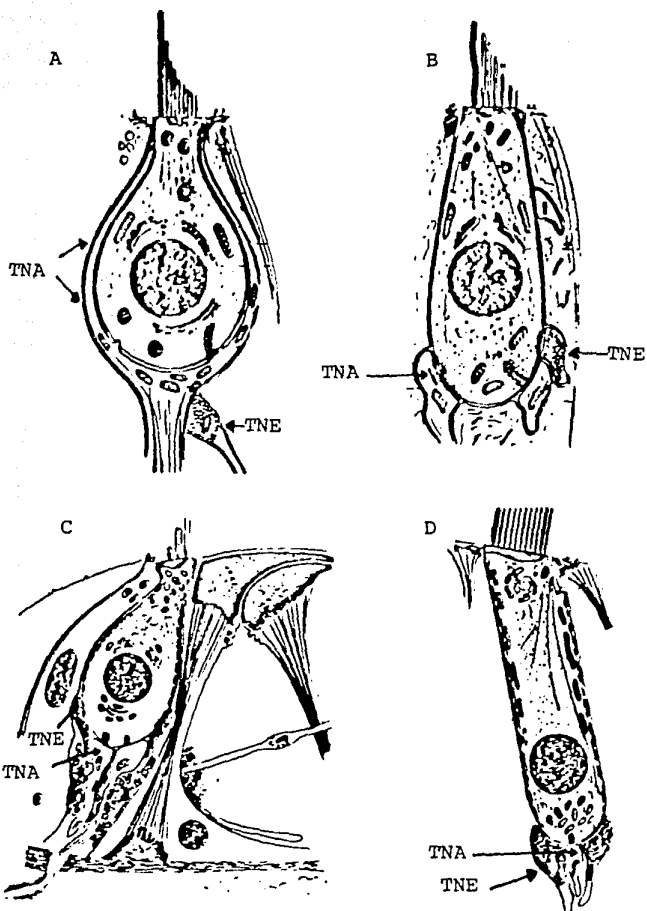


Fig. 3.- Esquema de los diferentes tipos de células pilosas -- que se encuentran en el epitelio sensorial vestibular y coclear y sus inervaciones.

A y B células pilosas Tipo I y II.

C y D células pilosas externa e interna.

TNA = terminal nerviosa aferente.

TNE = terminal nerviosa eferente.

todos los vertebrados, recibe terminales nerviosas tanto aferentes como eferentes en su parte basal (Fig. 3). La superficie apical de ambas células pilosas (tipo I y tipo II) contiene pelos sensorios o estereocilios que son prolongaciones citoplasmáticas y poseen además un cilio verdadero ó cinocilio. Cada estereocilio está formado en su interior por un bastón rígido de filamentos de actina y rodeados por la prolongación de la membrana (Fig. 4) (2, 3, 4). El diámetro del estereocilio varía de 0.2 μm a 1.0 μm en diferentes células (4). Los estereocilios no son cilios verdaderos; un cilio verdadero posee una estructura central compleja altamente diferenciada llamada axonema. La mayoría de los cilios verdaderos poseen un movimiento independiente, el cual se origina en el axonema. El cinocilio sí es un cilio verdadero, su diámetro es de 0.25 μm aproximadamente (4). Al igual que el axonema de otros cilios verdaderos, el axonema del cinocilio consiste de dos túbulos centrales rodeados por nueve pares de pequeños microtúbulos; sin embargo, el cinocilio no posee movimiento independiente. El ordenamiento de los estereocilios es altamente regular, cada estereocilio está rodeado por seis estereocilios que se encuentran equidistantes de él. Los estereocilios no son de la misma longitud, su tamaño se va incrementando de una orilla del haz hacia el lado opuesto en donde se encuentra el cinocilio (4).

En el órgano de Corti hay dos tipos de células pilosas: células pilosas externas y las internas (fig. 3). El término externas e internas se refiere a la relativa proximidad de las células pilosas al modiol, pilar central de la cóclea. En la

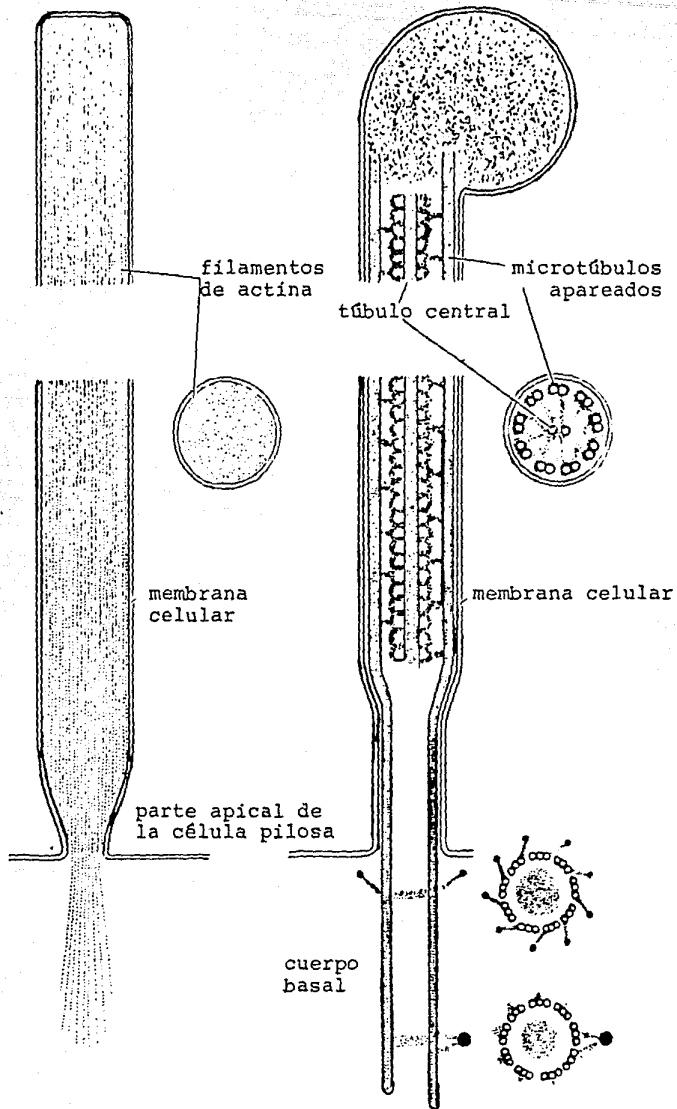


Fig. 4.- Esquema de un estereocilio (izq.) y de un cinocilio (der.) El diámetro del estereocilio varía de 0.2 μ m a 1 μ m en diferentes células. La raíz del estereocilio penetra en la superficie apical de la célula pilosa. Los filamentos paralelos en el centro del estereocilio consisten de actina, los cuales se encuentran entrecruzados, lo que le da rigidez al estereocilio. El axonema del cinocilio consta de dos túbulos centrales rodeados por nueve pares de microtubulos.

superficie apical de cada célula pilosa se encuentra, al igual que en las del vestíbulo, un haz de pelos sensorios o estereocilios, formados de filamentos entrecruzados de actina. Los estereocilios se proyectan dentro de la membrana tectoria, y no pueden moverse libremente como la base de la célula pilosa, la cual se encuentra en la membrana basilar. En su parte basal la célula pilosa se encuentra inervada por fibras nerviosas tanto aferentes como eferentes. Las células pilosas internas poseen el 95% de la inervación aferente mientras que las externas sólo el 5%. Exactamente lo opuesto ocurre con las terminales eferentes: mientras las células pilosas internas tienen sólo un 5% de inervación eferente, generalmente sobre las aferentes, las externas engloban el 95% restante.

Cada célula pilosa se encuentra morfológicamente polarizada. El cinocilio de varios receptores tiene la misma orientación con respecto a algún punto de referencia. Cuando el haz de pelos sensorios se dobla hacia el extremo en donde se encuentra el cinocilio se produce una despolarización, mientras que la inclinación en dirección opuesta ocasiona una hiperpolarización (5). Los estímulos aplicados en dirección ortogonal no producen respuesta (Fig. 5) (6, 7).

ESTIMULOS A LOS QUE RESPONDEN LOS ORGANOS DEL OIDO INTERNO.

En los órganos otolíticos, las otoconias actúan como una masa provista de inercia que resiste con vigor la aplicación de fuerzas externas. Cuando la cabeza se desplaza en respuesta a una aceleración lineal, los cristales del utrículo ó del sáculo

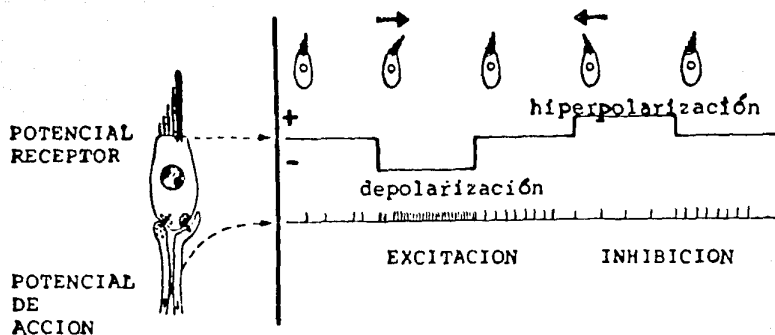


Fig. 5.- Ilustración diagramática de la función de la célula pilosa.
 Tomado de: Flock, A. (1965) Transducing mechanisms in-lateral line canal organ receptor. Cold Spring Harbor-Symp. Quant. Biol., 30, 133-146.

permanecen inmóviles al flexionarse hacia atrás los cilios situados debajo de la membrana gelatinosa. La flexión de los pelos sensorios desencadena los impulsos nerviosos que transmiten la información al cerebro (2).

Los canales semicirculares, como se ha dicho, son los órganos que detectan la aceleración angular. En ellos, los pelos sensorios se proyectan hacia una membrana gelatinosa denominada cúpula (fig. 2). En los canales semicirculares, la endolinfa proporciona la masa inercial; cuando la cabeza gira, el líquido tiende a permanecer en reposo, y la cúpula, junto con los pelos sensorios que se proyectan en ella, se desplazan en dirección opuesta (2).

En el caso del sistema auditivo, las ondas sonoras que pasan a través del meato auditivo externo y llegan a la membrana timpánica, la hacen vibrar. Esta vibración se transmite al martillo, al yunque y al estribo, que son tres huesecillos articulados entre sí y localizados en el oído medio. El martillo está adosado a la membrana timpánica y el estribo a la ventana oval que limita la parte basal de la cóclea. La membrana timpánica y los tres huesecillos localizados en el oído medio hacen más eficiente la transmisión del sonido desde el oído externo hasta la cóclea (fig. 6) (1, 3, 8). Cuando la vibración del estribo causa cambios en la presión del fluido dentro de la cóclea, se inicia el movimiento de la membrana basilar (fig. 7). Cuando la membrana basilar se mueve, provoca que los estereocilios se doblen y sufran un desplazamiento angular en relación a sus extremos fijos. Así, cuando un sonido produce un movimiento

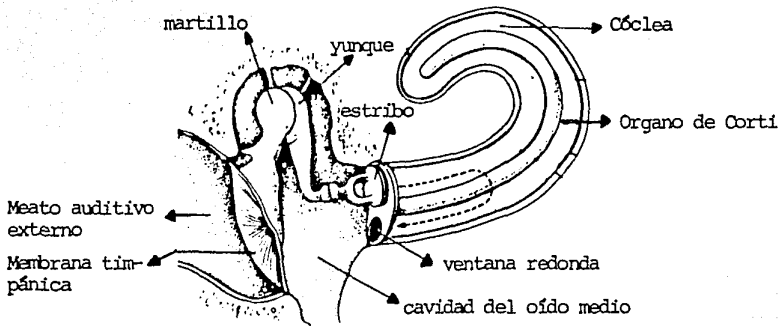


Fig. 6.- Esquema que muestra las partes del oído (a) externo que incluye la oreja ó aurícula, el meato auditivo externo y la membrana timpánica -- (sólo se muestra ésta); (b) el oído medio es una cavidad que contiene al martillo, el yunque y el estribo; y (c) el oído interno que está compuesto por el aparato vestibular y la cóclea (solo se muestra ésta).

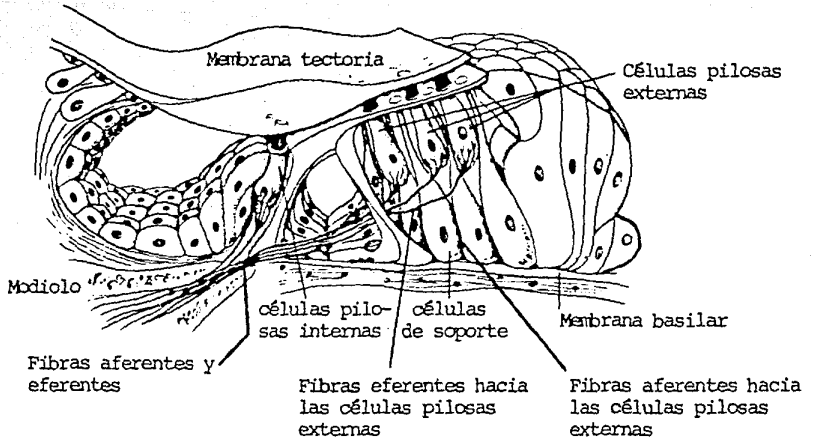


Fig. 7.- Esquema del Órgano de Corti donde se muestra a las células que lo componen.

oscilatorio de la membrana basilar, el desplazamiento angular de los estereocilios hacia atrás y hacia adelante, abre y cierra alternativamente los canales de transducción de la célula pilosa, resultando en cambios de potencial en la célula, que son de la misma frecuencia que el del estímulo del sonido.

MECANISMO DE TRANSDUCCION.

Las células receptoras sensoriales (fig. 8) llevan a cabo el paso crucial de transformar los estímulos mecánicos en respuestas eléctricas. La transducción mecano-eléctrica comienza cuando una fuerza derivada del sonido, la aceleración, ó movimientos del agua mueve los pelos sensorios. El estímulo afecta a las células pilosas del oído interno y a las que se encuentran en los órganos de la línea lateral de los peces y anfibios, aplicando fuerzas en el haz de estereocilios, y la energía mecánica del estímulo abre canales iónicos localizados en los pelos sensorios.

El potencial de membrana de la célula pilosa en estado de reposo es de -60mV , cuando el haz de estereocilios se mueve en la dirección del cinocilio la diferencia de potencial disminuye a -40mV , por lo que la célula se depolariza. Si el haz de pelos se mueve en la dirección opuesta, el potencial de membrana se incrementa de -60mV a -65mV , causando una hiperpolarización (4, 9).

Los canales de transducción localizados en la parte apical de la célula que son los responsables del cambio en el potencial de membrana no parecen ser altamente selectivos. Cuando se abren, son igualmente permeables a cationes monovalentes como Li^+ , Na^+ ,

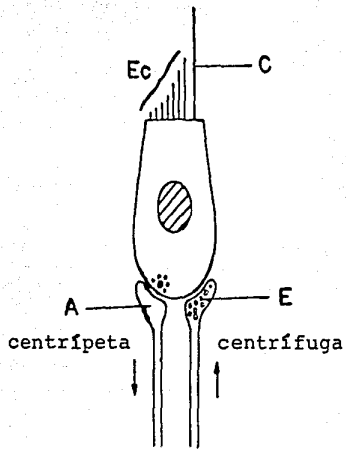


Fig. 8.- Esquema de las partes principales que constituyen a la célula pilosa y sus contactos neurales.

Ec = estereocilios

C = cinocilio

A = terminación nerviosa aferente

E = terminación nerviosa eferente

K^+ , Rb^+ y Cs^+ , y aún pueden pasar cationes orgánicos como la colina y el tetraetilamonio (10, 11). Los cationes divalentes como el Mg^{2+} , Ca^{2+} y Sr^{2+} tienen una afinidad más alta por el canal que los cationes monovalentes, pero presentan un flujo menor a través de él (10, 11).

Varios estudios demuestran la existencia de un sitio cargado negativamente dentro del poro hidratado que excluye a los aniones y determina su selectividad por los cationes (12). El canal es bloqueado por antibióticos aminoglicósidos policatiónicos como la estreptomina y la gentamicina. Aunque los canales de transducción no son intrínsecamente sensibles a voltaje, su bloqueo por antibióticos sí lo es (13, 14).

El principal ión cargado positivamente en la endolinfa es el potasio, y este elemento es el principal transportador de carga eléctrica a través de la membrana (4). La endolinfa contiene 150mM de K^+ , solamente 1mM de Na^+ , 10uM de Mg^{2+} y 10-300uM de Ca^{2+} libre (15).

Los registros eléctricos de las células pilosas demuestran que la respuesta inicial del receptor es muy rápida, ya que los canales conducen la corriente a los pocos microsegundos de la aplicación del estímulo; por lo tanto, es improbable que intervengan muchos procesos entre la aplicación del estímulo y la iniciación de la respuesta celular. Mecanismos menos directos que requieren enzimas ó segundos mensajeros se excluyen, por el corto tiempo transcurrido entre la flexión del haz de estereocilios y la apertura del canal (menos de 25 microsegundos a 25°C) (16, 17).

Cuando el haz de estereocilios se flexiona, los canales de

transducción se abren y los iones K^+ entran a la célula y la depolarizan. Esta reducción en la diferencia de potencial o depolarización se difunde a través de la célula. En el área basal de la célula se encuentran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que cuando ocurre la depolarización se abren y permiten el paso del calcio al interior de la célula. Una vez dentro el calcio ocasiona por un mecanismo todavía desconocido, la liberación del neurotransmisor a la región intersináptica. Cuando esta sustancia atraviesa este espacio y llega a la terminal nerviosa aferente se combina con receptores presentes en la membrana postsináptica causando un cambio de permeabilidad que resulta en la generación de un potencial que llega al axón provocando un potencial de acción que se transforma en una señal eléctrica que viaja al cerebro (fig. 9).

La alta concentración de calcio dentro de la célula activa los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} , y el K^+ se sale y se repolariza la membrana disminuyendo la activación de los canales de Ca^{2+} . El fluido en la superficie apical de la célula pilosa tiene una concentración de K^+ mucho más elevada que la superficie basolateral de ésta, como consecuencia, el K^+ puede entrar y salir de la célula. Con el tiempo el potencial de membrana se vuelve más negativo y regresa a su estado inicial y el contenido de Ca^{2+} intracelular se reduce por su captura dentro de los organelos de la célula y por la expulsión de este ión. Por último, cuando el canal de K^+ sensible a Ca^{2+} se cierra, la célula pilosa regresa a su condición inicial (4, 18).

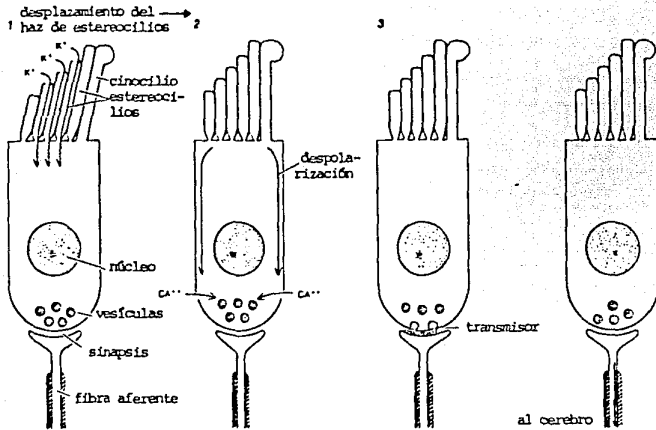


Fig. 9.- La respuesta de la célula pilosa culmina en la transmisión de una señal eléctrica hacia el cerebro, a través de las fibras aferentes de la célula.

- 1) cuando el haz de estereocilios es desplazado, los canales de transducción se abren y los iones K^+ entran a la célula y ésta se depolariza.
- 2) la depolarización se difunde a través de la célula, y esta ocasiona que los canales de calcio se abran y el calcio penetre a la célula.
- 3) los iones calcio ocasionan que las vesículas que se encuentran en la base de la célula y que contienen al neurotransmisor, se fusionen con la parte basal de la membrana celular y lo liberen.
- 4) el transmisor difunde a través del espacio sináptico entre la célula pilosa y la fibra aferente, la cual envía el mensaje al cerebro.

Tomado de: Hudspeth, A.J. (1983). The hair cells of the inner ear. Scientific American, 247, 42-52.

VÍAS VESTIBULARES.

Las células pilosas están inervadas por fibras nerviosas vestibulares aferentes, las cuales transmiten los impulsos nerviosos al núcleo vestibular, al tallo cerebral y al cerebelo. Estas estructuras se proyectan a centros motores del cerebro que controlan los movimientos de los ojos, de la cabeza y la tonicidad de los músculos del cuerpo. Los receptores vestibulares poseen también inervación eferente, la cual se origina en el tallo cerebral y que modula la actividad y función de los receptores.

Las vías nerviosas que conectan el aparato vestibular con el cerebro y la médula espinal son complejas y no se conocen tan bien como las de otros sistemas sensoriales. Se sabe, sin embargo, que todos los impulsos procedentes de los órganos vestibulares se dirigen inicialmente a uno de los dos destinos siguientes: el tallo cerebral y el cerebelo (2).

Las fibras del nervio vestibular que llegan al tallo cerebral terminan en uno de los cuatro centros nerviosos denominados núcleos vestibulares: el superior, el de Deiters o lateral, el medio y el descendente o inferior. Estos grupos celulares reciben también información de receptores visuales y somáticos, especialmente de los receptores de los músculos del cuello, que informan sobre el ángulo de inclinación de la cabeza. Esta información se coordina en los núcleos vestibulares, de donde parten impulsos que alcanzan los músculos oculares ó la médula espinal, lo que determina la contracción refleja del cuello, extremidades ó músculos corporales (Fig. 10) (8).

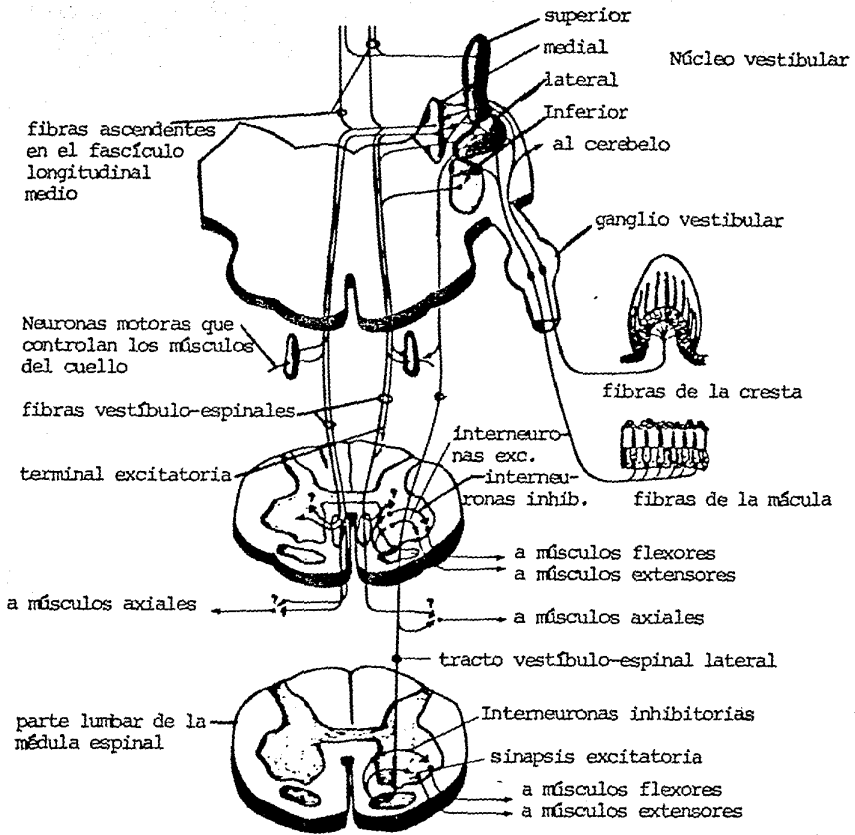


Fig. 10.- Esquema en donde se muestra las vías vestibulares.
 Tomado de: Netter, F.H. (1983). Nervous System, Part I.
 Anatomy and Physiology.

La porción rostroventral del núcleo vestibular lateral recibe a las fibras vestibulares primarias que inervan la mácula del utrículo. La porción dorsocaudal del núcleo recibe información del cerebelo y la médula espinal. Las células del núcleo vestibular lateral envían sus axones al tracto vestibulo-espinal, el cual termina ipsilateralmente a nivel cervical, torácico y lumbar de la médula espinal. Este tracto es de primordial importancia para regular el tono muscular que mantiene el cuerpo en una postura erecta (8).

El núcleo vestibular medial y el superior reciben a las fibras vestibulares que inervan a los canales semicirculares. El núcleo vestibular medial da origen al tracto vestibulo-espinal, el cual termina bilateralmente en la región cervical de la médula espinal. Los axones de este tracto hacen conexiones monosinápticas con neuronas motoras que inervan a los músculos del cuello. Este tracto participa en el control reflejo de los movimientos del cuello para mantener correctamente la posición de la cabeza.

Ambos núcleos, el medial y el superior participan en los reflejos vestibulo-oculomotores. Las células de ambos núcleos envían sus axones al fascículo longitudinal medio.

El núcleo vestibular inferior recibe a las fibras vestibulares primarias de los canales semicirculares, del utrículo y el sáculo. Este núcleo también recibe fibras aferentes provenientes del cerebelo, por lo que está estructurado para integrar la información que proviene del aparato vestibular y del cerebelo (8).

Algunas fibras vestibulares primarias llegan directamente al lóbulo floculonodular en el cerebelo; estas fibras son importantes para el control cerebelar de la postura. Algunas neuronas del complejo vestibular (el núcleo medial, superior e inferior) también envían sus axones al cerebelo y son importantes para el control de la postura.

En el cerebelo, los impulsos nerviosos originados en receptores visuales y somáticos alcanzan una región denominada cerebelo-vestibular. La formación reticular, un conjunto de células de tallo cerebral, recibe también información de los receptores visuales y somáticos (pero no de los vestibulares) y establece conexión con los núcleos vestibulares en otra región del tallo cerebral. Está por determinarse cuál es la función precisa del cerebelo y de la formación reticular en el mantenimiento del equilibrio y la orientación (2).

VIA OCULOMOTORA.

Los músculos extraoculares responsables del movimiento de los ojos están controlados por neuronas motoras localizadas en varios núcleos. Así, el rectus lateral se encuentra controlado por el núcleo abducens; el oblicuo superior, por el núcleo troclear; y el recto superior, inferior y medial, y el oblicuo inferior, por el núcleo oculomotor. El movimiento de los ojos depende de patrones de actividad producidas en esos músculos por proyecciones directas del núcleo vestibular y de la formación reticular, y por activación indirecta del colículo superior y la corteza cerebral (fig. 11) (3).

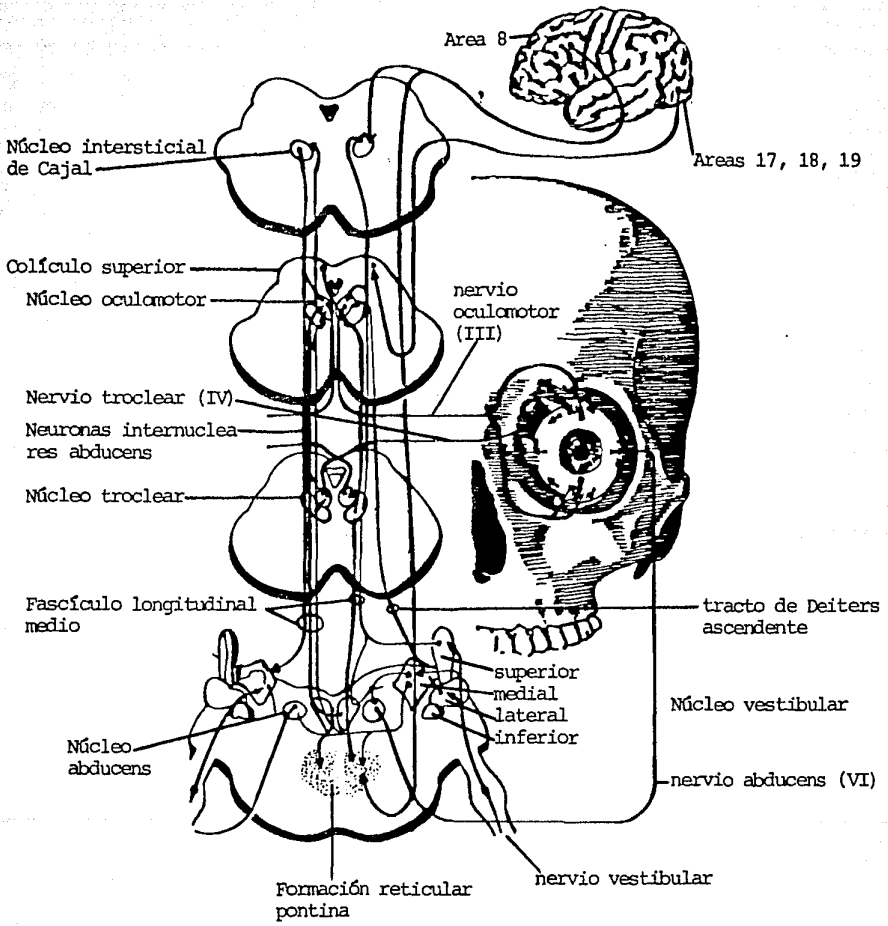


Fig. 11.- Esquema que representa la vía oculomotora.
 Tomado de: Netter, F.H. (1983). Nervous System, Part I.
 Anatomy and Physiology.

La proyección vestibular es importante para el mantenimiento de la fijación visual durante los movimientos de la cabeza. Para efectuar el movimiento lento de los ojos, la contracción del músculo de un ojo debe acompañarse por la relajación de su antagonista. La acción de girar la cabeza excita a las fibras aferentes vestibulares de los receptores del canal semicircular. Las fibras de un solo canal semicircular excitan a dos grupos específicos de neuronas del núcleo vestibular. Un grupo de estas neuronas excita a las neuronas motoras extraoculares lo que causa que los ojos se muevan en la dirección opuesta al movimiento de la cabeza, y el otro grupo de neuronas inhibe a las neuronas motoras que activan el movimiento de los ojos en la misma dirección del movimiento de la cabeza. Si se gira la cabeza a la derecha excitará a las fibras del canal semicircular horizontal derecho, el cual activará a las neuronas del núcleo vestibular medial y lateral derecho. Algunas de esas neuronas excitarán a las neuronas motoras que controlan los músculos rectus medial derecho y rectus lateral izquierdo. Otras neuronas vestibulares van a inhibir a las neuronas motoras que controlan el rectus lateral derecho y a las neuronas internucleares que controlan el rectus medial izquierdo. El resultado será un movimiento compensatorio de ambos ojos hacia la izquierda (3).

El vestibulocerebelo modula el reflejo vestibulo-extraocular de tal manera que el movimiento de los ojos resultante compensa el movimiento de la cabeza y mantiene la mirada fija en el mismo punto.

Las conexiones del núcleo vestibular derecho con el núcleo

abducens, troclear y oculomotor se dividen en dos partes: la primera parte comprende a las proyecciones vestibulares hacia las neuronas motoras que controlan el rectus inferior y el rectus superior, el oblicuo superior y el oblicuo inferior. Todas esas neuronas motoras reciben impulsos excitatorios del núcleo medial contralateral, y también reciben impulsos inhibitorios del núcleo superior ipsilateral.

La inervación de las neuronas motoras del rectus medial y del rectus lateral, las cuales participan en el movimiento horizontal de los ojos, está organizada de manera diferente. El núcleo vestibular medial envía fibras excitatorias al núcleo abducens contralateral y fibras inhibitorias al núcleo abducens ipsilateral. Esas fibras excitan ó inhiben a las neuronas motoras del rectus lateral y a otro grupo de neuronas dentro del núcleo abducens (las neuronas internucleares) las cuales se proyectan hacia el núcleo oculomotor opuesto para excitar a las neuronas motoras del rectus medial. Estas últimas neuronas también son excitadas por fibras que se originan en el núcleo vestibular lateral y pasan hacia el tracto de Deiters (fig. 11)(3).

Además de estas vías directas, cada núcleo recibe impulsos por medio de vías más complejas que involucran a la formación reticular. Esas vías también están moduladas por la actividad del canal semicircular. La formación reticular, sin embargo, parece ser especialmente importante en la organización del movimiento rápido de los ojos (sacadas), los cuales pueden iniciarse por señales de la región cortical frontal ó del colículo superior (Fig. 11)(3).

Otras dos estructuras están involucradas en el control de los movimientos oculares: el núcleo intersticial de Cajal y el colículo superior. El núcleo intersticial de Cajal recibe impulsos de la corteza frontal y del núcleo vestibular, y excita a las neuronas motoras del núcleo oculomotor y del núcleo troclear lo cual produce el movimiento vertical y oblicuo de los ojos. También activa a las interneuronas inhibitorias en el núcleo vestibular, disminuyendo la actividad de las neuronas que controlan el reflejo vestibulo-extraocular. El colículo superior recibe impulsos de la retina y de la corteza visual, y envía fibras excitatorias a neuronas en la formación reticular pontina que produce el movimiento rápido de los ojos (fig. 11)(3).

REFLEJO VESTIBULO OCULAR (NISTAGMUS).

El Nistagmus consiste en un movimiento ocular sincrónico que consta de dos fases sucesivas: la fase lenta, en la que los ojos se mueven en forma progresiva semejante al movimiento de los ojos para localizar un objeto (fig. 12a), mientras que el movimiento en la dirección opuesta consiste en un movimiento brusco (fase rápida)(fig. 12b). La dirección del movimiento rápido es usado para especificar la dirección del Nistagmus (Fig. 12 a y b)(3, 8).

En la mayoría de los casos el Nistagmus puede clasificarse en dos categorías: Nistagmus optocinético y Nistagmus vestibular. El Nistagmus optocinético se produce por una estimulación prolongada y recurrente de la vía visual sensible a imágenes en movimiento. Esta forma de Nistagmus puede inducirse clínicamente colocando al

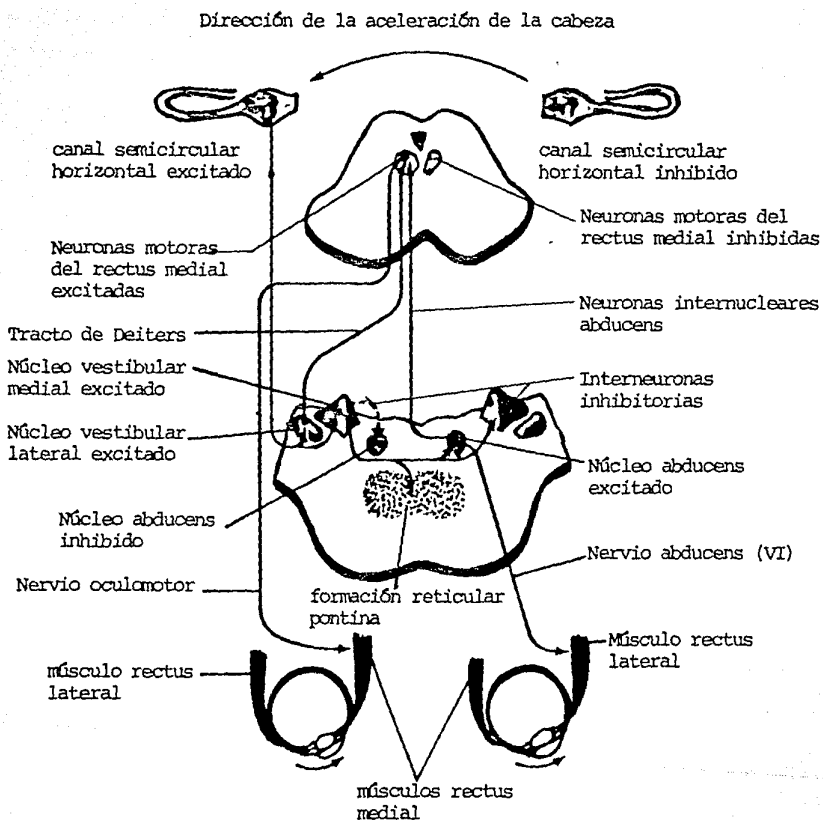


Fig. 12 (a) NISTAGMUS (fase lenta). Los ojos se mueven en dirección opuesta al movimiento de la cabeza, tendiendo a preservar la fijación visual.

Tomado de: Netter, F.H.(1983). Nervous System, Part I. Anatomy and Physiology.

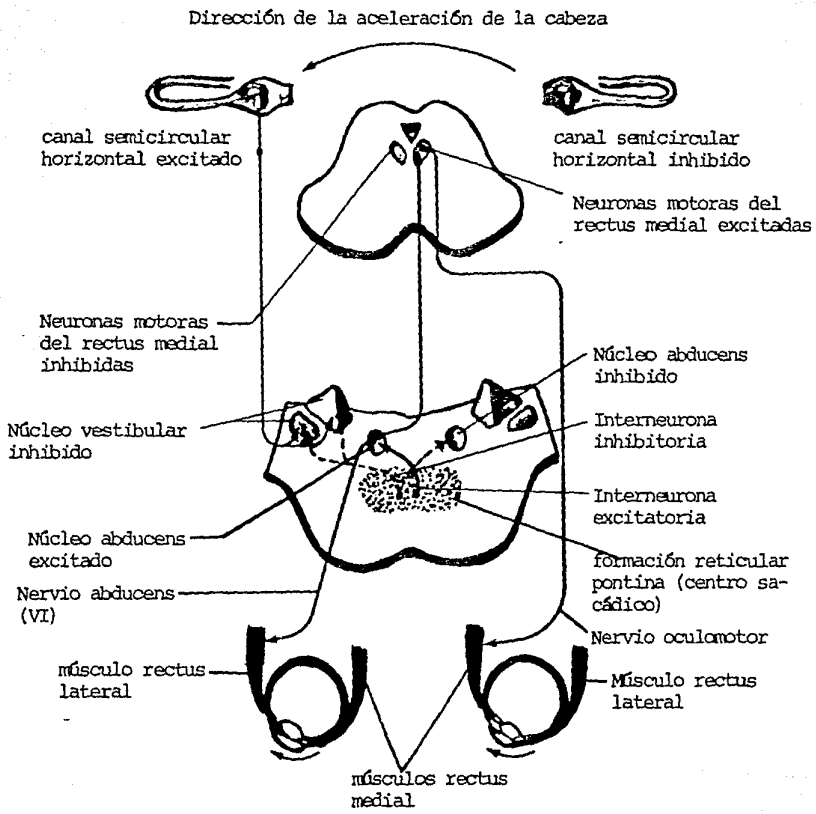


Fig. 12 (b) NISTAGMUS (fase rápida). Los ojos se mueven en la misma dirección de la cabeza.

Tomado de: Netter, F.H. (1983). Nervous System, Part I. Anatomy and Physiology.

paciente con la mirada fija en un cilindro rotatorio marcado con franjas luminosas y oscuras alternadas.

El Nistagmus vestibular se origina por un estímulo prolongado y asimétrico de los receptores del canal semicircular del laberinto vestibular, ó por desórdenes neurológicos que inducen una estimulación asimétrica en el núcleo vestibular o en el vestibulocerebelo, en ambos lados del cerebro. El Nistagmus vestibular puede inducirse clínicamente, y se le conoce como Nistagmus calórico. Se inyecta agua fría ó tibia en un oído y, dependiendo de la orientación de la cabeza del paciente, el frío o el calor producen una excitación prolongada de uno o más canales semicirculares, causando así el Nistagmus (Fig. 13).

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. Así, durante la fase lenta, los impulsos del canal horizontal izquierdo excitan a las neuronas en los núcleos vestibulares medial y lateral del lado izquierdo, mientras que el núcleo vestibular derecho recibe menos impulsos que lo normal del canal semicircular horizontal derecho. Las neuronas en el núcleo vestibular izquierdo excitan a las neuronas motoras que controlan los músculos rectus lateral derecho y rectus medial izquierdo y activan a las neuronas internucleares del núcleo abducens que amplifican la excitación del rectus medial izquierdo. Simultáneamente, son inhibidas las neuronas motoras que controlan los antagonistas de esos músculos. Como los estímulos al canal semicircular continúan, el circuito en el núcleo vestibular y la

a) rotación de la cabeza

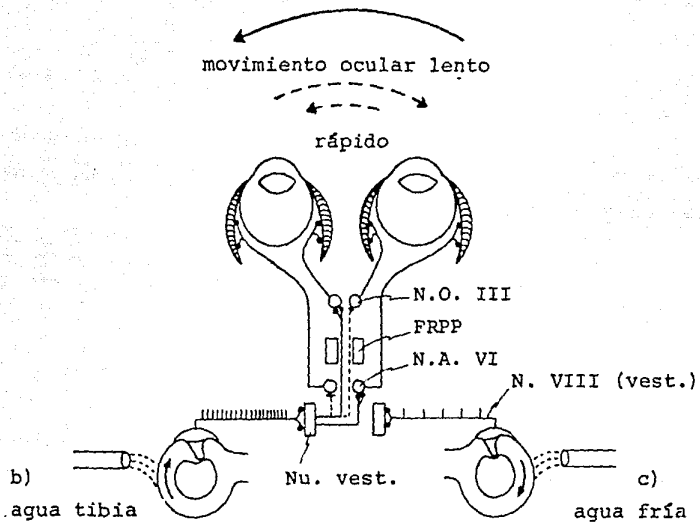


Fig. 13.- a) Reflejo vestibulo-ocular.

b) y c) Nistagmus calórico.

N.O. III (Núcleo oculomotor)

FRPP (Formación reticular parapontina)

N.A. VI (Núcleo abducens)

N. VIII (octavo nervio craneal)

Nu. vest. (Núcleo vestibular)

Tomado de: George Somjen M.D. Neurophysiology (1983).

formación reticular actúan como un integrador para producir un incremento en la señal excitatoria e inhibitoria que llegan a las neuronas motoras extraoculares, y 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 (Fig. 12) (3, 8).

VIA AUDITIVA.

Las fibras aferentes auditivas terminan en el núcleo coclear, el cual se divide en: núcleo coclear dorsal y núcleo coclear ventral. Las neuronas en esos núcleos tienen propiedades similares: cada una es excitada por un rango relativamente limitado de frecuencias de sonido y puede inhibirse por tonos fuera de ese rango. Dentro de cada núcleo, las neuronas sensibles a diferentes frecuencias se encuentran colocadas de una manera ordenada, lo cual da origen a una distribución tonotópica dentro del núcleo (fig. 14) (3, 8).

El resto de la vía se constituye por una serie de relevos en forma ascendente que son: el complejo olivar superior, el núcleo del lemnisco lateral, el colículo inferior y el cuerpo geniculado medial. En esos núcleos, las señales de ambos oídos interactúan entre sí durante su trayecto hacia la corteza cerebral. Conforme las señales van ascendiendo por la vía auditiva, no necesariamente llegan a cada núcleo de una manera continua. Así, fibras del núcleo coclear se proyectan directamente al núcleo del lemnisco

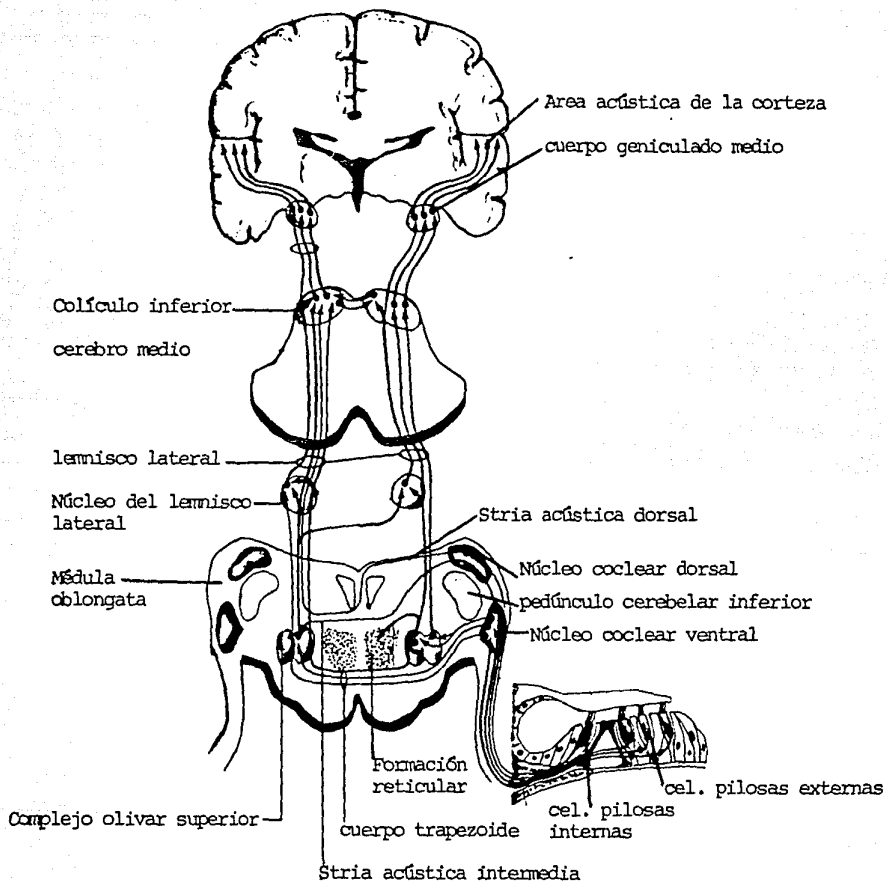


Fig. 14.- Esquema en donde se muestra la vía auditiva aferente.

Tomado de: Netter, F.H. (1983). Nervous System, Part I. Anatomy and Physiology.

lateral, y fibras del complejo olivar superior llegan sin interrupción al colículo inferior. Finalmente, la señal auditiva llega al cuerpo geniculado medial de donde se proyecta a la corteza auditiva primaria. A pesar del entrecruzamiento de las fibras aferentes, la actividad neural que alcanza la corteza auditiva proviene del oído contralateral (Fig. 14).

El ordenamiento tonotópico se conserva a través de toda la vía auditiva, de tal manera que regiones corticales individuales son sensibles a frecuencias específicas (3, 8). Algunas células de la corteza auditiva envían sus axones al núcleo geniculado medial y al colículo inferior. El colículo inferior envía fibras al núcleo coclear. Un grupo de células localizadas cerca del núcleo olivar superior da origen a las fibras olivococleares eferentes, las cuales terminan en las células pilosas de la cóclea o en las fibras aferentes que las inervan. Aunque aún no se conoce bien la función de estas fibras eferentes, se piensa que son importantes para regular la respuesta selectiva a sonidos particulares (Fig. 14) (3, 8).

POTENCIALES AUDITIVOS.

La respuesta auditiva del tallo cerebral puede hacerse evidente mediante el registro electrofisiológico de los potenciales evocados de campo libre que ocurren dentro de los primeros 10 milisegundos después de la presentación de un estímulo.

En la Fig. 15 se muestran las estructuras generadoras de los potenciales auditivos en el humano. La duración de estos

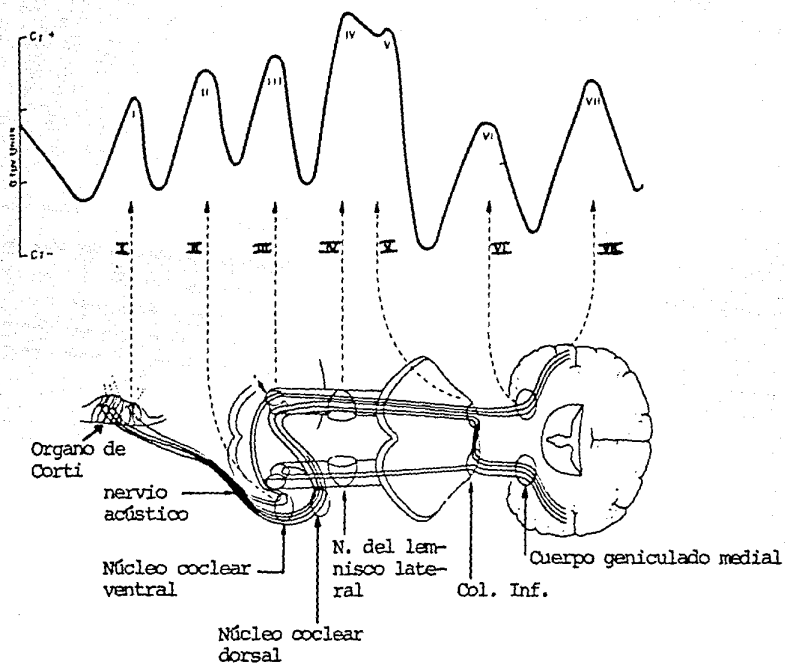


Fig. 15.- Estructuras generadoras de los potenciales auditivos en el humano. La duración de estos potenciales desde la onda I a la VII es de 10 milisegundos.

- I (Nervio acústico)
- II (Núcleo coclear)
- III (complejo olivar superior)
- IV (lemnisco lateral)
- V (colículo inferior)
- VI (geniculado medial)
- VII (radiaciones auditivas tálamo-cortical)

Tomado de: George, Somjen M.D. Neurophysiology (1983).

potenciales desde la onda I a la VII es de 10 milisegundos.

En la rata adulta, la estimulación con clicks de corta duración ó tonos puros origina una serie de 4-5 ondas que representan la activación secuencial de varios núcleos subcorticales. La onda I es producida por el VIII nervio, la onda II por el núcleo coclear, la onda III por el complejo olivar superior, la onda IV por el núcleo del lemnisco lateral y la onda V por el colículo inferior (19, 20).

TRANSMISION SINAPTICA EN EL SISTEMA ACUSTICO-LATERAL.

Como se ha visto, los órganos sensoriales poseen un tipo celular común a todos ellos: las células pilosas, y aunque existen diferencias morfológicas y funcionales entre ellas, se reconoce como una estirpe celular única, en la cual se agrupan la cóclea, el vestíbulo y la línea lateral bajo la denominación común de Sistema Acústico-lateral.

Desde el punto de vista embriológico, tanto la parte auditiva como la vestibular, y las células que lo componen, tienen un origen común, por lo que se han usado indistintamente como modelos experimentales, y los hallazgos se han extrapolado haciéndolos extensivos.

Evidencias tanto morfológicas como fisiológicas indican que la transmisión sináptica entre las células pilosas y las terminales nerviosas tanto aferentes como eferentes es de naturaleza química (6, 21, 22, 23, 24).

Estudios ultraestructurales muestran que el espacio sináptico entre la célula pilosa y la fibra aferente es de 200 Å, y la

célula presináptica contiene un cuerpo presináptico, mientras que la membrana de la terminal postsináptica (fibra aferente) muestra un engrosamiento (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

Los cuerpos presinápticos fueron descritos por primera vez por Sjöstrand (31). en la retina, y dichos cuerpos se encontraron después en los receptores vestibulares (6, 24, 26, 28, 30).

Investigaciones fisiológicas han demostrado potenciales postsinápticos excitatorios en las fibras aferentes primarias del sáculo del pez dorado (21) y en el canal semicircular de la rana (32). Se ha demostrado que existe un retraso en el potencial sináptico en la unión recepto-neural del octavo nervio del pez dorado después de la estimulación de la célula receptora (22).

Por su parte, en las terminales eferentes, por medio de estudios morfológicos a nivel de microscopía electrónica se ha demostrado que contienen muchas vesículas, algunas de ellas con centro denso, y a nivel del contacto con la célula pilosa se ha encontrado una cisterna subsináptica. La distancia entre la célula pilosa y la terminal eferente es también de 200 A (26, 27, 29, 33, 34, 35)

Las evidencias fisiológicas han demostrado potenciales postsinápticos inhibitorios en el laberinto de la rana inducidos por estimulación de las fibras eferentes (36).

A pesar de todas estas evidencias, no se ha demostrado claramente la identidad de los neurotransmisores que actúan entre las células pilosas y las terminales nerviosas aferentes y eferentes.

Para aproximarse a una identificación lo más correcta

posible de una sustancia como un neurotransmisor específico de una sinapsis particular, se deben cumplir una serie de criterios (37) que pueden dividirse en: pre-sinápticos y post-sinápticos.

Los pre-sinápticos son:

- a) Localización presináptica: Debe demostrarse que el transmisor candidato existe presinápticamente asociado con estructuras capaces de liberarlo.
- b) Enzimas de Síntesis: Las enzimas responsables de la síntesis del presunto transmisor deben estar presentes en el elemento presináptico de la sinapsis.
- c) Liberación inducida por el estímulo: La estimulación del elemento presináptico deberá liberar al transmisor candidato, y esta liberación debe ser dependiente de un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.
- d) Mecanismo de Inactivación: Debe demostrarse que existe un mecanismo de inactivación, para remover al transmisor del espacio sináptico ó para inactivar su influencia fisiológica sobre los receptores post-sinápticos.

Los criterios post-sinápticos son los siguientes:

- a) Acción idéntica: El transmisor que se postula debe provocar una respuesta post-sináptica que imite la respuesta producida por la estimulación natural del elemento presináptico.
- b) Identidad Farmacológica: Sustancias que afectan la respuesta post-sináptica natural deberán tener el mismo efecto sobre la respuesta provocada por el transmisor que se postula.

Solamente unas pocas sinapsis periféricas han cumplido con todos los criterios y se ha identificado al neurotransmisor, por

ejemplo, la acetilcolina en la placa neuromuscular de los vertebrados y el ganglio cervical superior, y la norepinefrina en los nervios simpáticos postgangliónicos (38).

En el oído interno, como se mencionó anteriormente, la identidad de los neurotransmisores no se conoce con certeza, aunque se han postulado algunas sustancias que clásicamente se han descrito como tales en el sistema nervioso, las que se han investigado tratando de cumplir con los criterios antes mencionados. Entre las sustancias que han sido estudiadas en el sistema Acústico-lateral y se han postulado como neurotransmisores se encuentran: los aminoácidos excitadores (el ácido glutámico y el ácido aspártico), algunos neuropéptidos, las catecolaminas, una sustancia activadora del nervio auditivo (ANAS), la acetilcolina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA).

AMINOACIDOS EXCITADORES.

El glutamato y el aspartato son dos de las sustancias que han sido estudiadas y propuestas como probables transmisores aferentes en la cóclea, en la línea lateral y en la periferia sensorial vestibular.

Las evidencias que se han obtenido en la cóclea son las siguientes: En la cóclea del cuy, tanto el glutamato como el aspartato producen un efecto excitatorio sobre las fibras aferentes (39, 40, 41, 42, 43). La perfusión del oído interno del gato con glutamato produce un aumento significativo en la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes secundarias a nivel del núcleo coclear (44). Se ha reportado inmunoreactividad

a glutamato en las células pilosas internas y externas de la cóclea en el cuy (45).

Se ha propuesto que los aminoácidos excitadores, como el glutámico y el aspártico, pueden actuar en al menos tres tipos de receptores que se distinguen farmacológicamente y que son preferentemente activados por los agonistas específicos N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y quisqualato (QA). Así, se ha encontrado que en la cóclea del gato el KA produce una activación de las aferentes que es 10 veces más potente que la producida por el glutamato (44). En la cóclea del cuy, el KA y el QA son potentes activadores de las fibras aferentes, mientras que el NMDA produce poco ó ningún efecto (40, 46, 47, 48). La administración local de KA por un período prolongado en la cóclea de ratas produce alteraciones morfológicas de las fibras aferentes asociadas a las células pilosas internas, sugiriendo la existencia de receptores glutamatérgicos en estas fibras (49, 50). Usando concentraciones despolarizantes de K^+ para inducir una liberación sincrónica del transmisor de un gran número de células pilosas, se ha demostrado en la cóclea del cuy la liberación de glutámico dependiente de Ca^{2+} y estimulada por potasio (51). Se ha encontrado que las células pilosas de la cóclea son capaces de transportar glutámico y glutamina por un sistema de alta afinidad dependiente de Na^+ . Así, se ha reportado captación de 3H -glutámico y 3H -glutamina en las células pilosas internas de la cóclea (52, 53). En la cóclea se ha encontrado que las enzimas asociadas a la síntesis del glutamato y el aspartato (glutaminasa y aspartato amino transferasa, AAT) se encuentran en altas concentraciones.

Así, la glutaminasa se localiza especialmente en las células cocleares internas. Sin embargo, la distribución de la AAT parece indicar una mayor participación de esta enzima más bien en el metabolismo energético de las células que en la transmisión sináptica (54, 55, 56, 57, 58, 59).

En contraposición a estos resultados, se ha reportado que el NMDA no tiene ningún efecto sobre los potenciales cocleares en el cuy (60). En estudios con HPLC tampoco se ha demostrado un aumento significativo en la liberación de glutamato y aspartato ante estimulación auditiva de la cóclea del cuy (61, 62).

Existen además, evidencias que implican al ácido aspártico en la transmisión eferente, puesto que se han detectado gránulos radiactivos en terminales eferentes de la cóclea cuando ésta se incubaba con ³H-aspártico (63).

Las evidencias que se han obtenido en la línea lateral a favor del glutámico y el aspártico como neurotransmisores son las siguientes: Se ha reportado que el glutamato mimetiza la acción del estímulo natural en los electroreceptores de los peces y en la línea lateral de la rana (40, 64, 65, 66, 67, 68, 69). El glutámico y el aspártico fueron de las primeras sustancias que se mostró que inducen un incremento en la frecuencia de descarga de las fibras aferentes en la línea lateral de *Xenopus laevis* (64, 65, 70, 71). La estimulación fisiológica de la línea lateral de la rana produce un aumento significativo en la liberación de glutamato (72, 73). Se ha encontrado que el NMDA, KA y QA tienen un efecto activador en las aferentes de la línea lateral de la rana (40, 64, 66). El Cis-2,3-piperidín dicarboxílico

(cis-2,3-PDA) y el gamma-D-glutamil-glicina (DGG), que son antagonistas de los aminoácidos excitadores, suprimen la actividad espontánea y la excitación inducida por el movimiento del agua en la línea lateral de *X. laevis*, a concentraciones tan bajas como 50-100 μM . El ácido kinurénico (KYN) es un poco menos potente (125-250 μM) (74). Las tres drogas actúan competitivamente a concentraciones menores de 500 μM . El trans-2,3-PDA no tiene ningún efecto sobre la actividad de la línea lateral a concentraciones de 1-2 mM, indicando que la acción del cis-2,3-PDA es estructuralmente específica. Puesto que el cis-2,3-PDA, DGG y KYN actúan sobre los tres subtipos de receptores (NMDA, KA, QA), estos hallazgos sugieren que además de los receptores NMDA, también están involucrados los receptores KA y posiblemente los QA en la transmisión aferente en la línea lateral (74).

Las evidencias a favor del glutámico como el neurotransmisor aferente en el vestíbulo son las siguientes: El glutamato mimetiza la acción del neurotransmisor natural en los canales semicirculares de la rana (75, 76). Se ha encontrado que el NMDA, KA y QA tienen un efecto activador en las aferentes de los canales semicirculares en la rana (77). En el sáculo, la lagena y los canales semicirculares del ajolote *Ambystoma mexicanum* se han estudiado los efectos del glutámico y el aspártico, los cuales cumplen con el criterio de similitud de acción, ya que la respuesta evocada por ellos remeda la producida por estimulación fisiológica; además, los antagonistas del glutámico y el aspártico bloquean la respuesta a la estimulación

mecánica (78). En contraposición a estos resultados, se ha reportado que la actividad producida por el glutamato en las aferentes primarias en los canales semicirculares de la rana, se asocia con una despolarización de las células pilosas que éstas inervan (75).

Aunque existen evidencias parciales, no se cumplen los criterios que permitan afirmar que el glutamato es el transmisor aferente. Entre ellos, no se ha logrado demostrar de manera convincente que el glutamato realmente se libera durante la estimulación (al menos en la cóclea). La existencia de mecanismos de síntesis y degradación del glutamato no indica que éstos estén asociados necesariamente a su función como neurotransmisor, ya que pueden asociarse al metabolismo normal de la célula (62). Por lo tanto, ya que el glutámico es un potente agente despolarizante, es difícil concluir definitivamente sobre la especificidad de su acción en las aferentes primarias, ya que el glutámico puede activar directamente las células sensoriales ó inducir efectos secundarios como la liberación de otras substancias. Por otro lado, a pesar de las evidencias que indican que el glutamato pudiera ser el transmisor en las células pilosas, no se ha logrado caracterizar con precisión en un mismo sistema la acción de diferentes agonistas y antagonistas, así como estudiar su efecto en la descarga basal y en la respuesta ante la estimulación fisiológica.

NEUROPEPTIDOS.

Existen evidencias experimentales que involucran a las

encefalinas como posibles transmisores eferentes, implicando que sus sistemas coexisten con el de la acetilcolina en terminales eferentes (79). Las evidencias que se han obtenido en la cóclea son las siguientes: La existencia de péptidos neuroactivos en la cóclea fue descrita por primera vez por Fex y Altschuler (80); ellos demostraron inmunoreactividad semejante a las encefalinas en las neuronas olivococleares eferentes de la cóclea del cuy (80). Posteriormente, Hoffman y col. (81) identificaron dos fracciones que contenían metionina-encefalina en la cóclea del cuy, utilizando separación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y posterior radioinmunoensayo. Drescher y col. (61) también detectaron un compuesto semejante a metionina-encefalina en la perilinfa y encontraron que aumenta después de la estimulación con sonido. Estudios de inmunocitoquímica han demostrado un efecto diferencial en el grado en que se marcan las eferentes que contactan a las células pilosas internas y externas de la cóclea, sugiriendo la existencia de subsistemas de fibras eferentes (82, 83, 84). Estudios adicionales utilizando HPLC han demostrado la existencia de diferentes péptidos derivados de la proencefalina A asociados al sistema olivococlear (85, 86). La inmunoreactividad a las encefalinas desaparece en animales deferentados, indicando la asociación de estas substancias al sistema eferente (87). Así mismo, se ha encontrado inmunoreactividad asociada a péptidos derivados de la proencefalina B (prodinorfina) en la cóclea del cuy (88).

Fex y Altschuler han sugerido que las encefalinas pudieran funcionar junto con la acetilcolina en la transmisión eferente

(80).

En la línea lateral de la rana se ha encontrado un péptido relacionado con el gen de la calcitonina, en el sistema aferente (89).

En el sistema vestibular del conejo existe inmunoreactividad a substancia P (90), localizada en las terminales aferentes en forma de cáliz que inervan a las células pilosas tipo I del utrículo y el sáculo (91). Trabajos posteriores han demostrado inmunoreactividad a substancia P y a colecistocinina en el cuerpo de las células pilosas (92).

CATECOLAMINAS.

Las catecolaminas han sido postuladas como posibles transmisores aferentes en las células pilosas (93, 94). Sin embargo, no se ha encontrado que los antagonistas adrenérgicos tengan efecto alguno en la descarga de las fibras aferentes cocleares (95), ni que la noradrenalina ejerza un efecto excitatorio sobre las mismas (96). Tampoco se ha encontrado actividad de la tirosina hidroxilasa en la cóclea de mamífero; por lo tanto, la evidencia actual indica que las catecolaminas no participan en la transmisión aferente en sistema de células pilosas.

SUBSTANCIA ACTIVADORA DEL NERVI0 AUDITIVO (ANAS).

En la perilinfa de sapos y cuyes sujetos a estimulación auditiva se ha detectado que se libera una substancia, la cual ejerce un efecto excitador sobre la frecuencia de descarga en

fibras aisladas del nervio auditivo. Por este motivo se le ha llamado "substancia activadora del nervio auditivo" (ANAS) (97, 98). Aunque estos experimentos no se han reproducido en esa misma línea, recientemente se han aportado nuevas evidencias que indican que existen factores activadores del nervio auditivo cuya estructura química aún no se ha determinado (99). Se han encontrado al menos dos substancias excitadoras que se liberan del oído interno del pez: una de bajo peso molecular (cerca de 200) y otra de mayor peso molecular (cerca de 5000) (99).

ACETILCOLINA (Ach).

Existe considerable evidencia que indica que la acetilcolina es el neurotransmisor eferente en la cóclea de mamíferos (40, 100, 101). Una de las evidencias farmacológicas es la demostración de que la atropina, la D-tubocurarina, la alfa-bungarotoxina y otros agentes anticolinérgicos, cuando se aplican intracoclearmente bloquean los efectos de la estimulación eferente, sin afectar ninguno de los potenciales asociados con la transmisión aferente. Se ha demostrado que cuando se escinden y degeneran las eferentes del haz olivococlear, la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) disminuye hasta un nivel no detectable (102, 103). Esto indica que la AChE está localizada exclusivamente en las terminales eferentes y que la inactivación enzimática de la acetilcolina tiene lugar presinápticamente. También se ha demostrado que la colinacetiltransferasa (CAT) se encuentra exclusivamente en las terminales nerviosas eferentes en la cóclea, y que la actividad de la CAT en la cóclea disminuye a niveles no

detectables después de que las eferentes son seccionadas y degeneran (104). Así, otras estructuras cocleares, incluyendo a la célula pilosa son incapaces de sintetizar acetilcolina. Esto ha sido confirmado por estudios en los que se encontró inmunoreactividad a la CAT en las terminales eferentes de las células pilosas tanto internas como externas (105).

Evidencias tanto fisiológicas, como histoquímicas y bioquímicas, implican a la acetilcolina en la neurotransmisión vestibular eferente de algunos vertebrados. Se ha demostrado un transporte retrógrado de ^3H -colina por las sinapsis eferentes en el laberinto del gato (106). Las terminales eferentes de probable naturaleza colinérgica en el sistema vestibular ejercen un efecto tónico inhibitorio sobre la actividad aferente proveniente del receptor vestibular (107, 108, 109, 110). Técnicas histoquímicas describen la presencia de acetilcolinesterasa (AChE), la enzima que degrada a la acetilcolina, a nivel de la periferia sensorial vestibular de algunos vertebrados (111, 112, 113). Existen evidencias que demuestran que las terminales vesiculadas (eferentes) provenientes de centros superiores, se tiñen selectivamente para la AChE por métodos histoquímicos (114) y esta tinción desaparece después de la escisión del nervio vestibular (115). En posteriores estudios se encontró que también la CAT desaparece después de escindir este nervio, lo cual sugiere su localización en la terminal eferente (116). Durante el desarrollo en el pollo se ha visto que la actividad de la CAT aparece tardíamente, coincidiendo con la llegada de las terminales eferentes al

epitelio sensorial (117).

Se ha encontrado actividad de la colinacetiltransferasa (CAT), la enzima de síntesis de la acetilcolina, en el laberinto aislado del pez (118), de la rana (116), del pollo (119) y del cuy (120, 121), siendo nuestro grupo en México el primero en encontrar actividad de CAT en vertebrados superiores. También se ha reportado que existe un mecanismo de captación de ^3H -colina que es dependiente de sodio y energía, y la liberación de ^3H -ACh dependiente de calcio, en el laberinto de la rana (122, 123). Se encontró actividad de la acetilcolinesterasa en el vestíbulo de la rana (124) y del pollo (125).

ACIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO (GABA).

El caso del GABA no es tan claro como el de la Ach, pues se tienen evidencias contradictorias en cuanto a su participación en la neurotransmisión. Históricamente lo primero que se estudió fue la cóclea, y a continuación se mencionan las evidencias obtenidas en este sistema.

Substancias similares al GABA se incrementan en la perilinfa de cuyes después de una estimulación sonora (61, 126). Existen evidencias que asocian a la función del GABA con la inervación eferente del oído interno: Se han encontrado gránulos radiactivos en las terminales eferentes de la cóclea, cuando ésta se incubó con ^3H -GABA (127) y la captación de GABA se ha localizado preferentemente entre las terminales de las fibras eferentes (63, 128). Estudios por inmunocitoquímica han asociado al GABA a los sistemas eferentes en la cóclea del cuy (56, 129) y del mono

(130). La picrotoxina y la bicuculina reducen la influencia de la estimulación eferente en la cóclea (131). En contraposición a estos resultados, se ha reportado que en la cóclea del gato y del cuy no existen niveles suficientes de las enzimas claves asociadas a la síntesis y degradación del GABA: la GAD, la transaminasa del GABA (GABA-T) y la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSADH) (132, 133); y estudios con agonistas del GABA no modifican significativamente la respuesta de las fibras aferentes cocleares en el gato (131).

Coincidentemente, el GABA es incapaz de remedar el efecto de la estimulación de las fibras aferentes en la línea lateral del *Necturus* (134). Además, se ha reportado que el GABA tiene una acción inhibitoria en la línea lateral de la rana, similar al de agonistas colinérgicos (135).

Los estudios bioquímicos acerca del GABA en el vestíbulo han sido muy recientes, habiendo un lapso de tiempo muy grande entre los estudios de Flock y Lam (1974) y los experimentos bioquímicos realizados por el grupo de México, el primero en estudiar bioquímicamente el GABA en vertebrados superiores. Así, Flock y Lam reportaron síntesis del GABA, en el canal semicircular de la raya (118) y en la papila anfibia la cual carece de innervación eferente (118). El grupo de México encontró actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD) en las crestas ampulares del pollo (136), de la rana (116) y del cuy (120, 121, 137) y además, demostraron la unión específica de ^3H -GABA a una preparación membranal cruda de crestas ampulares de pollo, sugiriendo la presencia de un receptor sináptico a GABA (138).

También se ha reportado la existencia de un sistema de captación de alta afinidad dependiente de sodio y energía, posiblemente representando un sistema inactivador de GABA, en crestas ampulares del pollo (139). Los niveles de la GAD aumentan durante el desarrollo de manera paralela a la maduración de las células pilosas del epitelio sensorial en el vestíbulo del pollo (117). Entre las evidencias farmacológicas se encuentra el hallazgo de que la picrotoxina inhibe la actividad espontánea y evocada en el nervio aferente del canal semicircular de la raya (118). Se ha demostrado que la aplicación iontoforética de GABA incrementa la actividad espontánea en la mácula del sáculo del gato (140); la bicuculina y la picrotoxina bloquean esta respuesta (118, 140). El tratamiento exitoso con picrotoxina de pacientes que sufren crisis de vértigo de origen periférico, pueden correlacionarse con la existencia de un receptor a GABA en la periferia sensorial del laberinto (141). Experimentos inmunocitoquímicos han demostrado reactividad parecida al GABA en las células pilosas del vestíbulo de pollo (142, 143). En estudios recientes se demostró que esta inmunoreactividad también estaba asociada a algunas fibras. Sin embargo, al investigar la inmunoreactividad a la GAD, sólo se encontró en las células pilosas (143). En el mismo estudio, el hallazgo de inmunoreactividad a GABA-T (enzima de degradación del GABA) tanto en las terminales aferentes como en las células del ganglio vestibular, sin encontrarse en las células pilosas, explica la presencia de GABA-T en las fibras y es compatible con su papel de enzima que degrada al GABA, removiéndolo de su sitio de acción y así, inactivando su función como neurotransmisor

(143). En mamíferos, sólo se ha estudiado el mono araña en el cual se ha encontrado inmunoreactividad parecida a GABA en las terminales nerviosas eferentes vestibulares (144).

Contradictoriamente a este acúmulo de evidencias, el GABA no tiene un efecto excitatorio en la respuesta evocada de las crestas ampulares de la rana (145), y ni el GABA ni el muscimol tienen un efecto significativo sobre el potencial de reposo de las terminales aferentes ni en el laberinto de la rana (77) ni en el del ajolote (146). Es posible que en los anfibios, a pesar de haberse hallado síntesis de GABA (118), éste tenga otro papel en el oído interno.

Por lo anterior, es claro que solo existe evidencia incompleta en los mamíferos que apoye al GABA y la acetilcolina como postulados neurotransmisores vestibulares, por lo que en este trabajo se pretende aportar ciertas evidencias experimentales en apoyo a esa postulación, estudiando la síntesis de estos compuestos en el vestíbulo de la rata.

MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL.

La mayoría de los estudios del GABA y la acetilcolina como neurotransmisores en el vestíbulo se han efectuado en peces, anfibios y aves. En mamíferos, existen pocos reportes en donde se sugiere que estos dos mediadores participan en la neurotransmisión vestibular (120, 121, 140, 144). En el presente trabajo se usó a la rata como modelo para aportar evidencias a favor del GABA y la acetilcolina como candidatos a neurotransmisores aferente y eferente, respectivamente, en el

vestíbulo de los mamíferos.

Se usaron los órganos vestibulares aislados del oído interno de ratas pigmentadas Long-Evans. Como criterio principal para postular al GABA y a la acetilcolina como candidatos a neurotransmisores en el vestíbulo de la rata, se determinaron las actividades tanto de la glutamato descarboxilasa (GAD, enzima de síntesis del GABA) como de la Colin acetiltransferasa (CAT, enzima de síntesis de la acetilcolina). Este criterio es importante, no solo porque la velocidad de formación del transmisor, 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 es una poza de neurotransmisor recientemente sintetizado (147). Además, la localización de las enzimas sintetizantes, desde el punto de vista de su distribución tanto regional como subcelular, se correlaciona con la función sináptica del neurotransmisor.

LOCALIZACION CELULAR DE LA CAT Y LA GAD.

El hecho de encontrar la actividad de estas enzimas (GAD y CAT), apoyaría la participación tanto del GABA como de la acetilcolina en la transmisión sináptica vestibular, pero no aportaría información sobre su localización celular, por lo que en este trabajo fué necesario buscar un modelo experimental que nos respondiera esta pregunta. Para determinar la localización celular tanto de la CAT como de la GAD, se utilizaron animales hipotiroideos como modelo.

El hipotiroidismo producido "in útero" nos permite tener

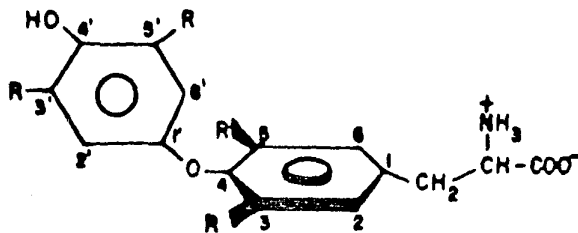
separadas a las poblaciones celulares vestibulares de las fibras nerviosas. Los antecedentes son los siguientes:

HORMONAS TIROIDEAS.

La función principal de la glándula tiroides es la producción de hormonas tiroideas (derivados yodados de la tirosina), que estimulan el metabolismo energético y son esenciales para el crecimiento y desarrollo normales. Las principales hormonas secretadas por la tiroides son la tiroxina (T_4) y la triyodotironina (T_3). La triyodotironina también se forma en los tejidos periféricos por desyodación de la tiroxina (fig. 16).

Las hormonas tiroideas tienen un papel trascendental en la regulación metabólica tanto del individuo en desarrollo como del maduro. En el feto, su función es fundamental para el crecimiento y la diferenciación, mientras que en el animal maduro las hormonas tiroideas regulan el balance energético. La L-tiroxina y la L-triyodotironina son producidas por la tiroides y secretadas al torrente sanguíneo que las distribuye por todo el organismo; su acción se ejerce prácticamente sobre todas las células corporales. Las ínfimas cantidades secretadas están minuciosamente reguladas por un sistema complejo que se origina en el sistema nervioso central, y cuyo estímulo se amplía gracias al hipotálamo y a la hipófisis, pero se reduce por retroalimentación en la que los niveles circulantes de T_3 y T_4 libres reprimen la producción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la hipófisis, y quizás de ésta misma, al inhibir la producción de su hormona liberadora (TRH) en el hipotálamo. Además, las cantidades de hormonas que

CONFIGURACION DE LA MOLECULA DE TIRONINA



TIRONINA	R ₃	R ₅	R ₃ '	R ₅ '
T ₄	I	I	I	I
T ₃	I	I	I	H
T ₃ ^Y	I	H	I	I
T ₂	I	H	I	H
T ₂ ^Y	H	H	I	I
T ₁	H	H	I	H
T ₀	H	H	H	H

Fig. 16.- Se esquematiza la molécula de tironina, que es la estructura química básica a partir de la cual, dependiendo del número y de la posición de los átomos de yodo que contenga, se sintetizan las hormonas tiroideas.

llegan hasta las células para establecer una condición óptima (eutiroides) se encuentran finamente reguladas por dos proteínas plasmáticas: TBG (thyroid hormone-binding globulin) y TBPA (thyroid hormone-binding prealbumin), las cuales ávidamente unen las hormonas tiroideas de manera que sólo una pequeña fracción (menos del 0.3%) de la cantidad total circulante se encuentra libre. Finalmente, desyodasas tisulares convierten a la T_4 en T_3 , de actividad intrínseca cinco veces mayor que la T_4 (148, 149).

BIOSINTESIS, DISTRIBUCION Y METABOLISMO.

Aunque el yodo es un elemento que se encuentra sólo en trazas en el medio ambiente y en la dieta, la tiroides lo extrae ávidamente de la sangre, en donde se encuentra en forma de yoduro, por un proceso de transporte activo. En las células tiroideas, el yoduro es convertido por una peroxidasa en una forma capaz de yodar los residuos de tirosina presentes en una glicoproteína llamada tiroglobulina. Las monoyodo y diyodotirosinas resultantes reaccionan entre sí en la matriz proteica para formar di, tri y tetrayodotironinas. La tiroglobulina yodada se almacena en las células foliculares tiroideas y a partir de ella, por proteólisis, se liberan T_3 y T_4 (fig. 17). Sólo aquellas concentraciones diminutas de T_4 y T_3 que se encuentran libres en la circulación pueden metabolizarse, la ruta principal es la desyodación de T_4 a T_3 y a $r-T_3$, y de éstas, a otras tironinas inactivas (148). La mayor parte del yodo así liberado se reabsorbe en el riñón.

MECANISMO DE ACCION.- Se han descrito 3 tipos de receptores para

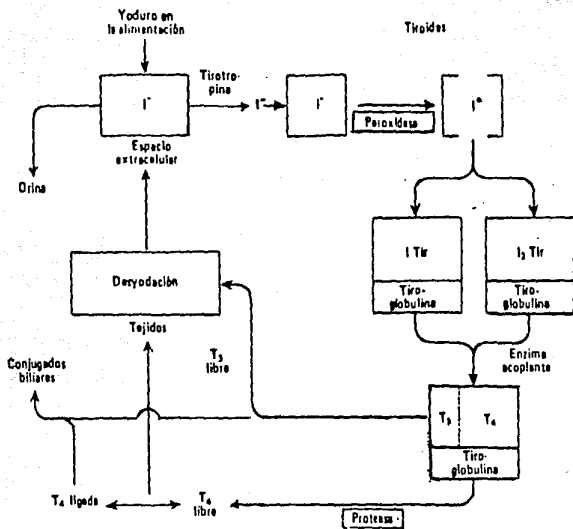


Fig. 17.- Esquema representativo de la síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas.

I Tir = monoyodotirosina.

I₂Tir = diyodotirosina.

T₃ = triyodotironina.

T₄ = tiroxina.

Tomado de: Harper, H.A. Manual de Química Fisiológica. (séptima edición), 1980.

las hormonas tiroideas: membranal, citoplásmico y nuclear. El receptor membranal tiene una participación incierta, ya que se ha demostrado que la T_3 puede cruzar la membrana plasmática de las células blanco sin requerir de un receptor específico; sin embargo, en algunos casos la participación del receptor membranal ha resultado esencial para el transporte desde la membrana hacia el citosol. El receptor citoplásmico puede servir como un sistema de almacenamiento citosólico de la hormona. Los efectos metabólicos ejercidos por las hormonas tiroideas se relacionan con actividades mitocondriales: en este organelo aumentan el consumo de oxígeno y desacoplan la fosforilación oxidativa, por lo que se ha considerado la posible existencia de un receptor mitocondrial; sin embargo en la actualidad existe un consenso general que atribuye los diversos efectos metabólicos de las hormonas tiroideas al resultado de la interacción hormona tiroidea-receptor nuclear, que conduce a la síntesis de nuevas proteínas.

Las hormonas tiroideas no requieren una translocación hacia el núcleo. Los sitios nucleares para T_3 presentan una alta afinidad, están asociados a proteínas nucleares no-histonas, y su peso molecular después de su solubilización es de cerca de 50000 d. La interacción de T_3 y algunos análogos con el receptor nuclear, se refleja en un aumento en la actividad de la RNA polimerasa, con la consecuente formación de RNA (150).

Se conoce que los mensajeros de tercer orden actúan a través de inducción de cambios genómicos (150). Sin embargo, las hormonas tiroideas son los únicos miembros de este grupo para

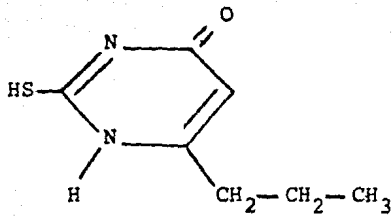
los cuales no se ha descrito la presencia de una molécula citoplásmica que las transfiera hacia el núcleo de la célula. También son los únicos mensajeros de tercer orden para los cuales se ha demostrado la presencia de "receptores" a nivel mitocondrial y un efecto inmediato en la membrana celular (151, 152).

ACCION DEL PROPILTIOURACILO.

Esta droga (2-tio-4-hidroxi-6-n-propil-pirimidina) se ha usado en la terapéutica en el tratamiento del hipertiroidismo como una droga antitiroidea. El propiltiouracilo actúa impidiendo la reacción química entre la tirosina y el yodo para formar tiroxina, pero no inhibe la capacidad de concentrar yodo, por parte de la glándula tiroides (fig. 18). El propiltiouracilo, además de inhibir la síntesis de hormonas tiroideas, disminuye la conversión periférica de T_4 a T_3 (149). Un aspecto de gran importancia en relación con el uso de esta droga es que atraviesa la placenta y se excreta en la leche materna, por lo tanto es capaz de inhibir la función tiroidea del feto y del neonato (149).

EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO EN EL DESARROLLO DEL CEREBRO.

Las hormonas tiroideas tienen un papel vital en el desarrollo del sistema nervioso. El examen del cerebro de animales hipotiroideos revela un desarrollo deficiente, particularmente de las redes axónicas y dendríticas; provoca severos disturbios de sinaptogénesis, neurotransmisión, mielinización y migración neural, así como un retardo en la maduración de la glía (153, 154, 155, 156). Los efectos más



A) PROPILTIOURACILO

B) PROCESO

MEDICAMENTOS QUE PUEDEN BLOQUEAR EL PROCESO

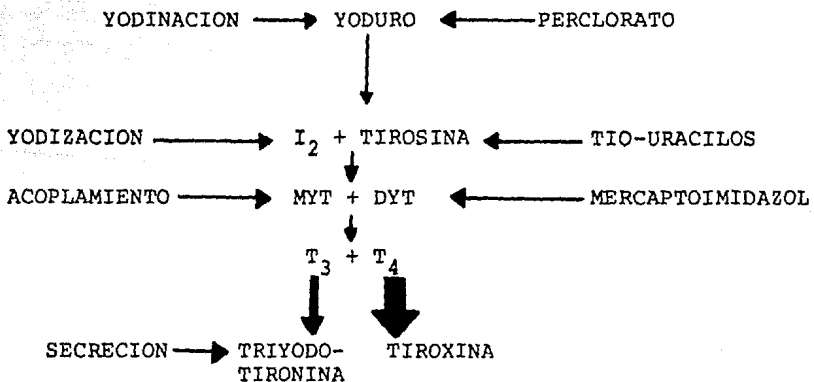


Fig. 18.- Esquema en donde se representa (A) la fórmula del propiltiouracilo y (B) puntos de ataque de los medicamentos antitiroideos. MYT = monoyodotirosina, DYT = diyodotirosina.

significativos de las hormonas tiroideas tienen lugar durante el período crítico de desarrollo del cerebro, cuando las neuronas empiezan a diferenciarse (157). Aunque cada neurona parece única en su función, todas las neuronas experimentan una transformación morfológica común durante este período (154, 158).

EFFECTO DEL HIPOTIROIDISMO EN EL OIDO INTERNO.

Los efectos de las hormonas tiroideas sobre la síntesis de proteínas y actividad enzimática no se limitan al cerebro y hay un gran número de tejidos que se alteran con la administración de las hormonas tiroideas ó con su deficiencia.

Otro efecto de la depleción de las hormonas tiroideas es la pérdida de la función auditiva. Estudios previos han demostrado que en la rata, el hipotiroidismo congénito inducido por PTU impide el inicio de la función coclear (159) y causa alteraciones estructurales en el órgano de Corti (160, 161). En ratones y en ratas hipotiroideas se ha demostrado que las anomalías en el órgano de Corti no ocurren si a los animales previamente tratados con PTU se les administra pequeñas dosis de tiroxina durante el período normal de desarrollo coclear (162). También se ha comprobado que existe un período crítico en el cual el efecto del PTU sobre el órgano de Corti se puede hacer reversible (162, 163).

En ratas normales se ha demostrado que el patrón de sinaptogénesis es diferente entre las células pilosas internas y las externas. La sinaptogénesis en las células pilosas internas está prácticamente terminada al momento del nacimiento, ya que las células pilosas internas se encuentran con contactos sinápticos

tanto aferentes como eferentes y las sinapsis presentan características maduras. En contraste, durante las dos primeras semanas de vida postnatal las células pilosas externas se encuentran inervadas solamente por fibras nerviosas aferentes; las terminales eferentes se desarrollan durante la segunda semana (161). En las ratas hipotiroideas, no se encontraron diferencias con los controles, a nivel de las células pilosas internas, mientras que la sinaptogénesis a nivel de las células pilosas externas mostró claras diferencias cuando se comparó con los controles; las terminales nerviosas eferentes nunca hicieron contacto con las células pilosas en los animales hipotiroideos (161).

Con respecto a la parte vestibular, en una especie tan inmadura como lo es la rata al nacimiento, en la cual la función tiroidea empieza relativamente tarde (en el día 18 de gestación), el rápido incremento en el nivel de las hormonas tiroideas con un pico al inicio de la tercera semana de vida postnatal, coincide con una fase importante en el desarrollo morfológico y funcional de los receptores vestibulares (164). Durante esta fase, la diferenciación y la sinaptogénesis son particularmente activas (165). Por lo tanto, la participación de las hormonas tiroideas durante este periodo puede ser realmente importante.

Se ha reportado que el hipotiroidismo conduce a alteraciones en la maduración de los receptores vestibulares, afectando la diferenciación de las células pilosas tipo I y especialmente su inervación eferente (166). Se han demostrado los efectos del hipotiroidismo producido "in útero" sobre la maduración del

ganglio vestibular y las células pilosas, particularmente en la inervación de éstas (167). El retardo en la maduración del epitelio sensorial se observa ya al nacimiento y persiste a la edad de 33 días. A esta edad, los receptores vestibulares en los animales hipotiroideos exhiben marcados signos de inmadurez. El resultado más importante del hipotiroidismo fué la inmadurez persistente de los contactos sinápticos. Por lo tanto, las últimas células en diferenciarse, durante la segunda semana de vida postnatal, son las más susceptibles a la privación de las hormonas tiroideas.

Ya que en el hipotiroidismo el vestíbulo se encontraría en ausencia de contactos sinápticos maduros, y sólo con células pilosas que han alcanzado la madurez, en el presente trabajo se midieron las actividades de la CAT y de la GAD en el vestíbulo aislado de rata pigmentada Long-Evans, con el objeto de identificar los tipos celulares en donde se ubican estas actividades. Lo que se esperaba encontrar es ambas enzimas (CAT y GAD) en los vestíbulos de ratas normales, mientras que en los animales hipotiroideos debería encontrarse una disminución de aquella enzima que se hallara en las terminales sinápticas ó tipos celulares inmaduros. Del mismo modo, la actividad que se encontrara en las células receptoras ó botones sinápticos maduros no se vería afectada.

Para comprobar que el efecto del PTU era mediado por las hormonas tiroideas, y no un efecto directo sobre el vestíbulo, se realizó la terapia de reemplazo hormonal administrando tiroxina a animales previamente tratados con PTU. Con este

tratamiento lo que se esperaría encontrar, sería una protección de los efectos del PTU, reflejada en las actividades de la CAT y la GAD en estos animales.

Para comprobar el estado hormonal de los animales, se hicieron las determinaciones de tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3) en suero, de todos los grupos experimentales (control, hipotiroideo y PTU- T_4).

EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS.- Los efectos del hipotiroidismo y de la terapia de reemplazo hormonal, sobre la función vestibular y auditiva, también se estudiaron electrofisiológicamente: con la técnica del reflejo vestibulo-ocular postrotatorio (VOR), para medir la función vestibular; y con la medición de los Potenciales Provocados Auditivos de Tallo Cerebral para medir la función auditiva.

Para conocer el estado general de salud de los animales, se hizo un seguimiento del peso de éstos en todos los grupos experimentales.

MATERIAL Y METODOS.

El animal utilizado en todos los experimentos fué la rata pigmentada Long-Evans, de una colonia ubicada en el Laboratorio de Otoneurobioquímica del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., desarrolladas a partir de pies de cría obtenidos del Centro Médico del I.M.S.S.

PROCEDIMIENTO DE DISECCION.

Los animales se decapitaron sin anestesia. Se abrió el cráneo sagitalmente y se extrajo totalmente el cerebro. Se separaron las bulas auditivas del hueso temporal, y bajo el microscopio estereoscópico se extrajo el vestíbulo completo (las crestas ampulares, el utrículo y el sáculo) de ambos oídos, los cuales se recibieron en el medio de reacción frío.

Para la reproducción de los animales se pusieron a 3 ratas hembras con un macho. La presencia del tapón vaginal fué considerado como el primer día de gestación. Las ratas preñadas se separaron del macho y se colocaron en cajas individuales, manteniéndolas con acceso libre a la comida (Purina rat chow) y al agua. Así mismo, tanto la temperatura ($22-26^{\circ}\text{C}$) y los ciclos de luz-obscuridad de 12 horas se mantuvieron constantes durante todo el tiempo de experimentación. Después del nacimiento, se le dejó a cada hembra entre 8 y 10 crías y se les mantuvo bajo las mismas condiciones que sus progenitoras.

GRUPOS EXPERIMENTALES.

Los grupos fueron procesados simultáneamente de camadas nacidas el mismo día y mantenidas en condiciones similares.

1.- GRUPO CONTROL. Este grupo no se sometió a ninguna manipulación experimental y se les mantuvo el acceso libre a la comida y al agua.

2.- GRUPO HIPOTIROIDEO. El hipotiroidismo fue inducido en ratas preñadas a partir del 17^o día de gestación por la administración diaria de 50 mg ó de 75 mg de propiltiouracilo (PTU), disuelto en el agua de los bebederos. Previamente se determinó el volumen de agua ingerido diariamente por cada rata; en un grupo de 10 ratas se midió el volumen de agua bebida diariamente por cada una y se administró el PTU disuelto en el promedio (90 ml diarios). El tratamiento fué iniciado el 17^o día de gestación y se continuó en la progenie a través de la leche materna y posteriormente, en el agua de los bebederos, hasta el momento en que se sacrificaron los animales. Con los animales hipotiroideos se tuvo un cuidado muy especial en las etapas finales de experimentación, manteniéndolos por medio de un foco eléctrico a 37^oC ya que presentan hipotermia y se mueren fácilmente. Después del destete se les alimentó manualmente con el alimento normal de las ratas, pero hecho papilla con agua tibia, para que se alimentaran normalmente hasta el momento en que se sacrificaron.

3.- GRUPO CON TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (PTU-T₄).-Consistió en administrar L-tiroxina (T₄) por vía intramuscular, a ratas hipotiroideas previamente tratadas con PTU, a partir del 12^o día de vida postnatal, el cual es el periodo crítico del

desarrollo vestibular (163). La dosis de hormona administrada cada día depende de la edad del animal y fue calculada de los datos de Vigouroux obtenidos del desarrollo de la función tiroidea en la rata (164).

Para determinar el estado general de salud de los animales, se realizó un seguimiento del peso en los tres grupos experimentales: control, hipotiroideo y con terapia de reemplazo hormonal (PTU- T_4).

Los animales del grupo control se sacrificaron a los 13, 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad, los del grupo hipotiroideo y PTU- T_4 se sacrificaron a los 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de vida postnatal para efectuar las determinaciones de CAT y GAD, y para determinar los niveles hormonales de T_3 y T_4 en suero.

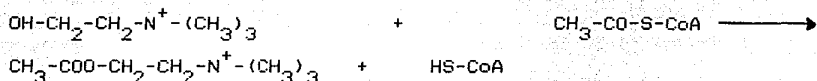
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CAT Y DE LA GAD.

Como se indicó en la introducción, la demostración de las actividades de las enzimas de síntesis de la Ach y del GABA (CAT y GAD) en el vestíbulo del pollo, la rana y el cuy, se han usado como el criterio fundamental de su participación en la neurotransmisión, por lo tanto, algunas de sus propiedades han sido estudiadas, demostrando que estas enzimas presentan características cinéticas y de comportamiento ante inhibidores que hacen pensar que las que se encuentran en el vestíbulo son homólogas a las encontradas en tejido nervioso, por lo que se tienen establecidas de antemano sus condiciones óptimas, cuyas determinaciones se describirán a continuación.

La actividad de la CAT se determinó por el método de Fonnum

(168, 169), con algunas modificaciones (116, 119).

FUNDAMENTO.- La CAT cataliza la transferencia del grupo acetilo de la Acetil-CoA, a la colina formando acetilcolina y Coenzima-A.



En el ensayo se usó al homogenado vestibular como fuente de la enzima, el cual se incubó en una solución amortiguadora con acetil coenzima-A marcada con tritio en el grupo acetilo, y colina. La acetilcolina marcada que se forma durante la reacción, se midió en un contador de centelleo.

PROCEDIMIENTO.- Se extrajo el vestíbulo total de los dos oídos de cuatro ratas y se recibió en el medio de reacción que contenía: fosfato de sodio 10mM, cloruro de colina 10mM, sulfato de eserina 0.1mM, EDTA 10mM, cloruro de sodio 300mM, 0.05% de Tritón X-100; se homogenizó a 550 rpm con un pistón de teflón, con el medio de reacción sumergido en hielo. Se tomaron 0.136 ml del homogenado y se colocaron en tubitos de 3 mm de diámetro por 30 mm de largo (por triplicado), se agregaron 0.06 ml de ^3H -acetil-CoA (a.e. 850 mCi/mmol); se agitó la mezcla en vortex y se incubó a 37°C durante 15 minutos con agitación. Se detuvo la reacción al agregar 10 ml de la solución amortiguadora de fosfatos fría, con una jeringa hipodérmica, teniendo previamente el tubo con la mezcla de reacción en un frasco vial. Se le agregaron 2 ml de tetrafenilbora en acetonitrilo y 8 ml de liquifluor. Se efectuó la misma operación con los blancos, en los que la reacción se detuvo al tiempo "cero". Tanto los problemas como los blancos se dejaron 24 horas en la oscuridad y se determinó la

radioactividad en un contador de centelleo. Tanto los problemas como los blancos se determinaron por triplicado. El homogenado restante se utilizó para la determinación de proteínas.

La actividad de la descarboxilasa glutámica se determinó por el método de Albers & Brady (170) con algunas modificaciones (116).

FUNDAMENTO.- La GAD cataliza la descarboxilación del grupo carboxilo 1 del glutamato, formando GABA y CO_2 .



En el ensayo se usó como fuente de la enzima al homogenado del tejido vestibular, el cual se incubó con ácido glutámico marcado con ^{14}C en el carbono 1, el $^{14}\text{CO}_2$ que se desprende en la reacción se capturó en una base fuerte y se midió la radioactividad en un contador de centelleo.

PROCEDIMIENTO.- Se extrajo el vestíbulo total de los dos oídos de cuatro ratas, se recibió en el medio de reacción que contenía: ácido L-glutámico 10mM, 2-mercaptoetanol 10mM, fosfato de piridoxal 0.1mM, fosfato de potasio 200mM pH de 7.3. Se homogenizó a 550 rpm con un pistón de teflón. El medio de reacción debe estar frío y la homogenización se hace en hielo. Se tomaron 0.06 ml del homogenado y se colocaron en tubitos de 3 mm de diámetro y 30 mm de largo (por triplicado), se agregaron 0.03 ml de ácido ($1\text{-}^{14}\text{C}$)L-glutámico (a.e. 50 mCi/mmol), se agitó la mezcla en vortex y se incubó a 37°C durante 20 minutos, con agitación suave. Después de incubar, se adicionaron 0.1 ml de H_2SO_4 3.6N para parar la reacción. El $^{14}\text{CO}_2$ liberado se capturó en 0.1 ml de hidróxido de hiamina contenida en otro tubito el

cual está conectado al tubo de reacción por medio de una manguera. En los blancos se detuvo la reacción al tiempo "cero"; todos los tubos se post-incubaron 60 minutos más para que se equilibre la reacción. Después de la post-incubación, se colocaron los tubitos que contenían la hiamina, en frascos viales con 8 ml de liquifluor y con una varilla de vidrio se hizo salir la hiamina del tubito para que se mezcle con el líquido de centelleo; se dejaron las muestras reposar 24 horas en la obscuridad y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo. Cada determinación se realizó por triplicado; el homogenado restante se utilizó para la determinación de proteínas.

DETERMINACION DE PROTEINAS.- La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al, usando albúmina sérica bovina como estándar (171) y el análisis se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-6, en todos los grupos experimentales.

DETERMINACION DE T_3 y T_4 .- Las determinaciones de T_3 y T_4 se realizaron en el suero de los animales de 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad, en todos los grupos experimentales. Se decapita al animal y se colecta la sangre del tronco, se deja reposar hasta que se forme el coágulo, el cual se separa por centrifugación a 3000 rpm. por 20 minutos, el suero se guardó a -20°C hasta el momento de las determinaciones de las hormonas. Las determinaciones de los niveles de T_3 y T_4 se llevaron a cabo por el método de Radioinmunoensayo (RIA) específico previamente descrito (172, 173).

CUANTIFICACION DE T_4 .- Todo el procedimiento se realiza por

duplicado, la técnica consiste en adicionar a tubos de ensayo de 12 x 75 mm los siguientes reactivos: 0.01 ml del suero problema diluido 1:4 con suero hipotiroideo (homólogo), 7 pg de $^{125}\text{I-T}_4$ (a.e. 1000-1200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$); 0.3 mg del ácido 8-anilino-naftalensulfónico (sal amoniacal ANS), 0.1 ml de suero inmune antitiroxina a la dilución inicial de 1:300 en amortiguador de Tris-HCl 0.05M, pH 8.6. El volumen total de incubación de 0.35 ml se completa con Tris-HCl adicionado al 0.6% con la sal disódica del ácido etilendinitrilotetracético. En la curva estándar se empleó suero hipotiroideo (homólogo), y soluciones estándar de T_4 en amortiguador Tris-HCl 0.05M, pH 8.6 para cubrir el intervalo de concentración de 0.25 a 4.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$. En cada ensayo se trabaja un juego de tubos denominados unión no específica (UNE), en los cuales se omite la adición de anticuerpo. Efectuada la mezcla de los reactivos se procede con una incubación a 4°C durante 24 horas. Después del periodo de incubación se adiciona a cada tubo 1 ml de suspensión de carbón activado al 0.5% y dextrán al 0.5% en amortiguador de Tris-HCl 0.05M, pH 8.6; los tubos se agitan y se incuban por 20 min. a 4°C . Posteriormente, se centrifugan a 2500 rpm durante 30 min; se separan las fracciones unidas (sobrenadante) y libre (precipitado), y se detecta la radioactividad presente en cada fracción en un contador de centelleo.

CÁLCULOS.- Obtenida la radioactividad de las fracciones separadas, se calcula la proporción porcentual de T_4 radioactiva unida al anticuerpo con respecto a la radioactividad total (% U/T). Para este cálculo se utiliza el % de UNE como factor de corrección de

todo el ensayo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% U/T = \frac{\text{cpm Unidas} - \text{cpm UNE}}{\text{cpm totales} - \text{cpm UNE}} \times 100$$

Los resultados de la curva estándar se grafican en papel semilogarítmico, disponiendo en el eje de las ordenadas el % U/T y en las abscisas la concentración de la solución estándar de T_4 . La concentración de las muestras problema se calcula interpolando en esta gráfica el % U/T correspondiente.

CUANTIFICACION DE T_3 . - Todo el procedimiento se realiza por duplicado, la técnica consiste en adicionar a tubos de ensayo de 12 x 75 mm los siguientes reactivos: 0.05 ml del suero problema, 7.6 μg de $^{125}\text{I-T}_3$ (a.e. 1 mCi/ μg), 0.1 mg de la sal de amonio del ácido 8-anilino-1 naftalén sulfónico (ANS) (esta solución se prepara junto con la hormona radiactiva unos momentos antes de ser usada), 0.1 ml de suero inmune antitriyodotironina a la dilución inicial de 1:300 en amortiguador de Tris-HCl 0.05M, pH 8.6, el volumen final se completó a 0.5 ml con amortiguador Tris-HCl. En la curva estándar se empleó suero hipotiroideo (homólogo) y soluciones estándar de T_3 para cubrir el intervalo de concentración de 6.0 a 200 $\mu\text{g}/0.1$ ml. En cada ensayo se trabaja un juego de tubos denominados unión no específica (UNE), en los cuales se omite la adición de anticuerpo. El ensayo se incuba durante 24 horas a 4°C; después de la incubación se agrega a cada tubo 1 ml de suspensión de carbón activado al 0.75% y polietilenglicol (PEG) al 1%. Los tubos se incuban durante 20 minutos a 4°C con agitación continua. Después de la incubación, se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 30 minutos, se separan ambas fracciones: unida (sobrenadante) y libre (precipitado), y se

detecta la radioactividad presente en cada fracción en un contador de centelleo.

CALCULOS.- Se efectúan de la misma manera que para T_4 .

Cada hormona fué cuantificada en todas las muestras dentro del mismo RIA. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo son de 8.6% y 10.5% para T_4 , y 9.0% y 12.8% para T_3 . El límite de sensibilidad para cada RIA es de 0.25 ug/dl para T_4 , y 10.0 ng/dl para T_3 .

PRUEBAS FISIOLÓGICAS.

PRUEBA DEL NISTAGMUS (Reflejo Vestibulo-ocular postrotatorio, VOR).

Para efectuar esta prueba se usó un aparato con un disco giratorio integrado (tornamesas), cuyo mecanismo permite controlar la velocidad del giro.

1. Se coloca a la rata sin anestesia en el tornamesas, se inmoviliza al animal y se coloca la cabeza en un ángulo de 30° del plano horizontal.
2. Se colocan los electrodos de aguja subcutáneamente en el canto externo de los ojos. Un electrodo adicional se inserta en la cabeza (Vertex).
3. Se gira al animal durante 90 seg a 45 rpm, se registra en las condiciones basales y en post-estimulo.
4. La señal se envía a un equipo de Electronistagmografía Life-Tech 3002 A y se registra en papel.
5. Se analiza la duración del nistagmus, el número de sacudidas (movimientos oculares) y se determina la frecuencia.

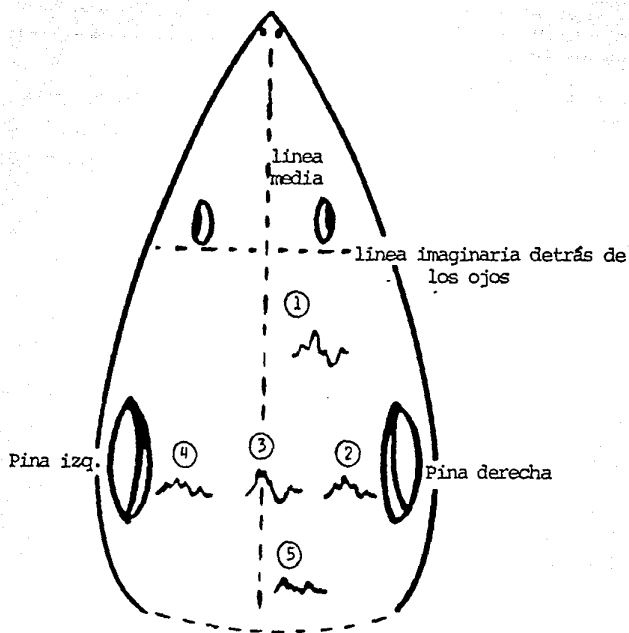
METODO DE REGISTRO DE LOS POTENCIALES PROVOCADOS AUDITIVOS DE TALLO CEREBRAL.

1. Se anestesia al animal con hidrato de cloral, 200 mg/kg de peso para los controles y los PTU-T₄ y 100mg/kg peso para los hipotiroideos.

2. Se colocan los electrodos de aguja subcutáneamente, uno en la cabeza (Vertex), otro detrás del oído izquierdo y uno más detrás del oído derecho. Los lugares óptimos para registro fueron determinados experimentalmente (Fig. 19).

3. Se aplica una estimulación binaural en campo libre, a través de una bocina localizada a 70 cm enfrente del animal. La estimulación consistió de clicks (duración de 10 milisegundos y frecuencia de repetición de 20/seg) de polaridad alterna no filtrada. La intensidad del estímulo fué calibrada en dBHL usando un sonómetro Bruel & Kjaer 2218.

4. La actividad eléctrica fué filtrada (filtros pasa-banda a 100 y 3000 Hz.), amplificada y recibida en un promediador Racia APE-78. 500 estímulos fueron sumados para cada registro. Las latencias de las ondas I, II, III y IV se midieron a 70 y 30 decibeles (dB).



Parte posterior del cráneo

Fig. 19.- Localización de los electrodos para un óptimo registro de los Potenciales provocados auditivos de tallo cerebral, en la rata pigmentada.

- 1.- Parte media entre la línea imaginaria detrás de los ojos y la parte posterior del cráneo.
- 2.- Parte media entre la línea media y el arco interior de la pinya derecha.
- 3.- Intercepto entre la línea media y el punto equidistante a ambas pínas.
- 4.- Parte media entre la línea media y el arco interior de la pinya izquierda.
- 5.- Línea media en la parte posterior del cráneo.

La posición 1 es la que se escogió para los registros, debido al claro registro de las ondas I, II, III y IV.

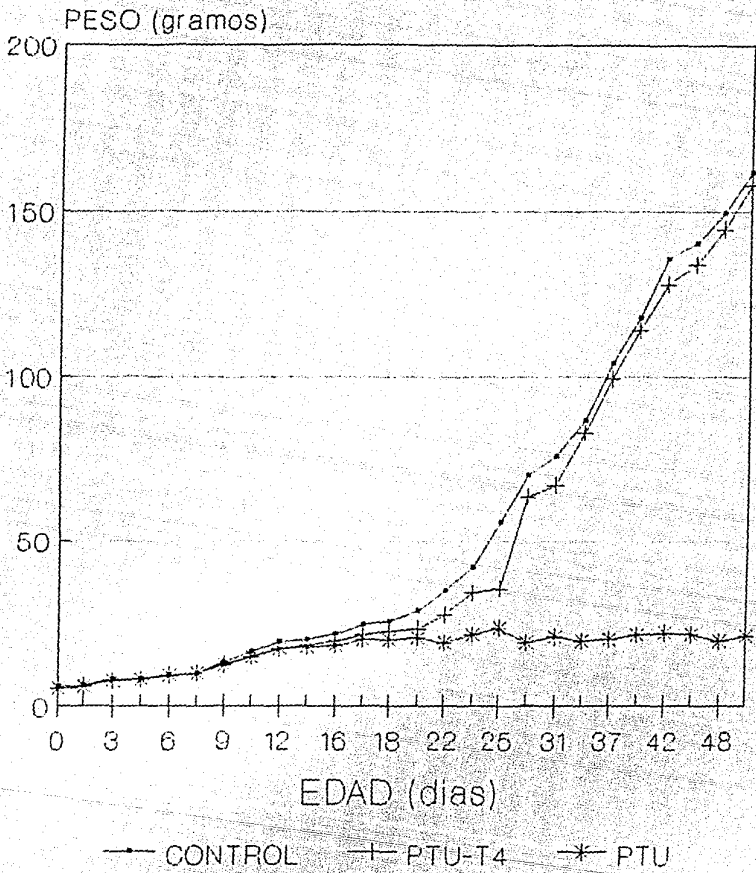
RESULTADOS Y DISCUSION.

ESTADO GENERAL DE SALUD DE LOS ANIMALES.- En la fig. 20 se presenta el incremento de peso de los animales de cada grupo experimental (control, hipotiroideo y PTU-T₄). Se encontró que los tres grupos incrementan de peso en forma constante hasta el día 14 de vida postnatal y hasta este día no se encontraron diferencias en apariencia física y peso entre los animales hipotiroideos y el grupo control. Posteriormente, las ratas hipotiroideas no siguen incrementando de peso, y desarrollan las características que han sido descritas en la literatura para ratas cretínicas (fig. 21). Los animales con terapia de reemplazo hormonal fueron indistinguibles de los controles en cuanto a apariencia física y peso corporal (fig. 21). Estos resultados corroboran los hallazgos de Meisami en donde se observa las mismas características físicas y el retardo en el crecimiento de las ratas hipotiroideas (174).

Los animales hipotiroideos presentaron, además de una disminución del peso corporal, un retardo en promedio de 4 días más en abrir los ojos que los controles.

HALLAZGOS BIOQUIMICOS.

La actividad específica de la GAD en homogenados vestibulares de ratas control de 13, 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad, resultó ser de: 12.6 ± 0.8 , 15.5 ± 0.5 , 16.1 ± 0.7 , 16.4 ± 0.43 , 16.1 ± 0.61 , 17.5 ± 0.57 , 17.6 ± 0.62 y 17.2 ± 0.29 nmol/mg proteína/h, respectivamente (fig. 22, Tabla 1). Como puede verse, la actividad de la GAD a la edad de 13 días ya se encuentra muy



cada punto es el promedio de 10 individuos.

Fig. 20.- GRAFICA DEL AUMENTO DE PESO DE LAS RATAS CONTRA TIEMPO.

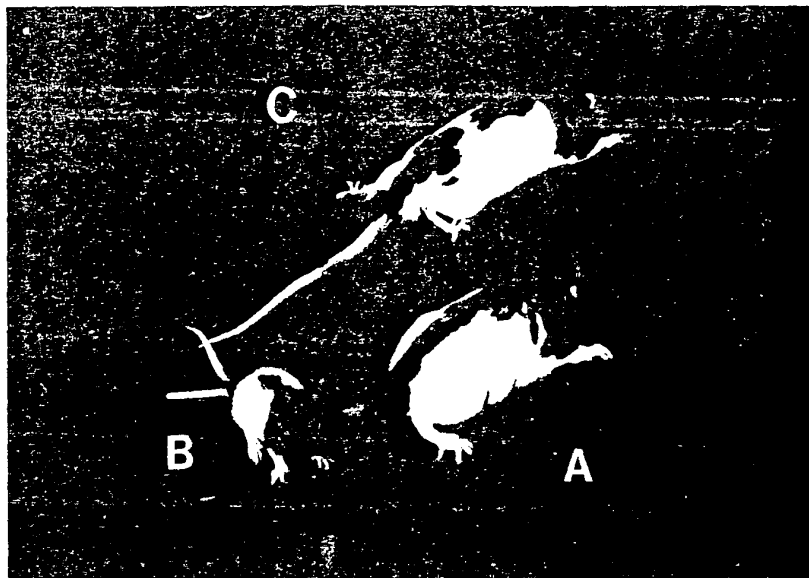


Fig. 21.- Fotografía en donde se muestra la diferencia en apariencia entre la rata control (A), la rata hipotiroidea (B) y la rata con terapia de reemplazo hormonal (C). Las tres ratas son de la misma edad (50 días).

elevada, y desde los 15 hasta los 60 días presenta prácticamente la misma actividad (fig. 22). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de GAD a las diferentes edades de los animales, por lo que la enzima no cambia a partir del día 20 de vida postnatal. Este rango se encuentra en el mismo orden de magnitud que la actividad de GAD obtenida en cerebro completo (Tabla 2) y los reportados en retina (175) y tejido nervioso (176) de ratas adultas. Estos resultados indican además que los tipos celulares en donde se encuentra la GAD (probablemente las células pilosas) ya están completamente maduros a esta edad.

Estos hallazgos se han corroborado por estudios ontogenéticos en crestas vestibulares aisladas del pollo y del cuy (137, 117). En estos experimentos la GAD aparece muy temprano en el desarrollo, cuando la célula pilosa se encuentra ya madura. Además, el hallazgo de la enzima sintetizante del GABA, en el vestíbulo de la rata, con actividad semejante a la del SNC del mismo animal, apoya la posible participación del GABA como neurotransmisor en este sistema.

La actividad de la CAT en el vestíbulo de la rata control de 13, 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad es de: 21.0 ± 2.0 , 101.0 ± 7.0 , 610.0 ± 25 , 692.0 ± 9.3 , 691.0 ± 11.8 , 699.0 ± 10.5 , 707.0 ± 21 y 720.0 ± 6.9 pmol/mg proteína/min, respectivamente (fig. 22, Tabla 1). La actividad de la CAT es prácticamente indetectable a la edad de 13 días, mientras que a los 15 días ya se eleva un poco más y a partir de los 20 días la actividad de la CAT ya no se modifica (fig. 22). Estos valores se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los obtenidos en cerebro completo (Tabla 2)

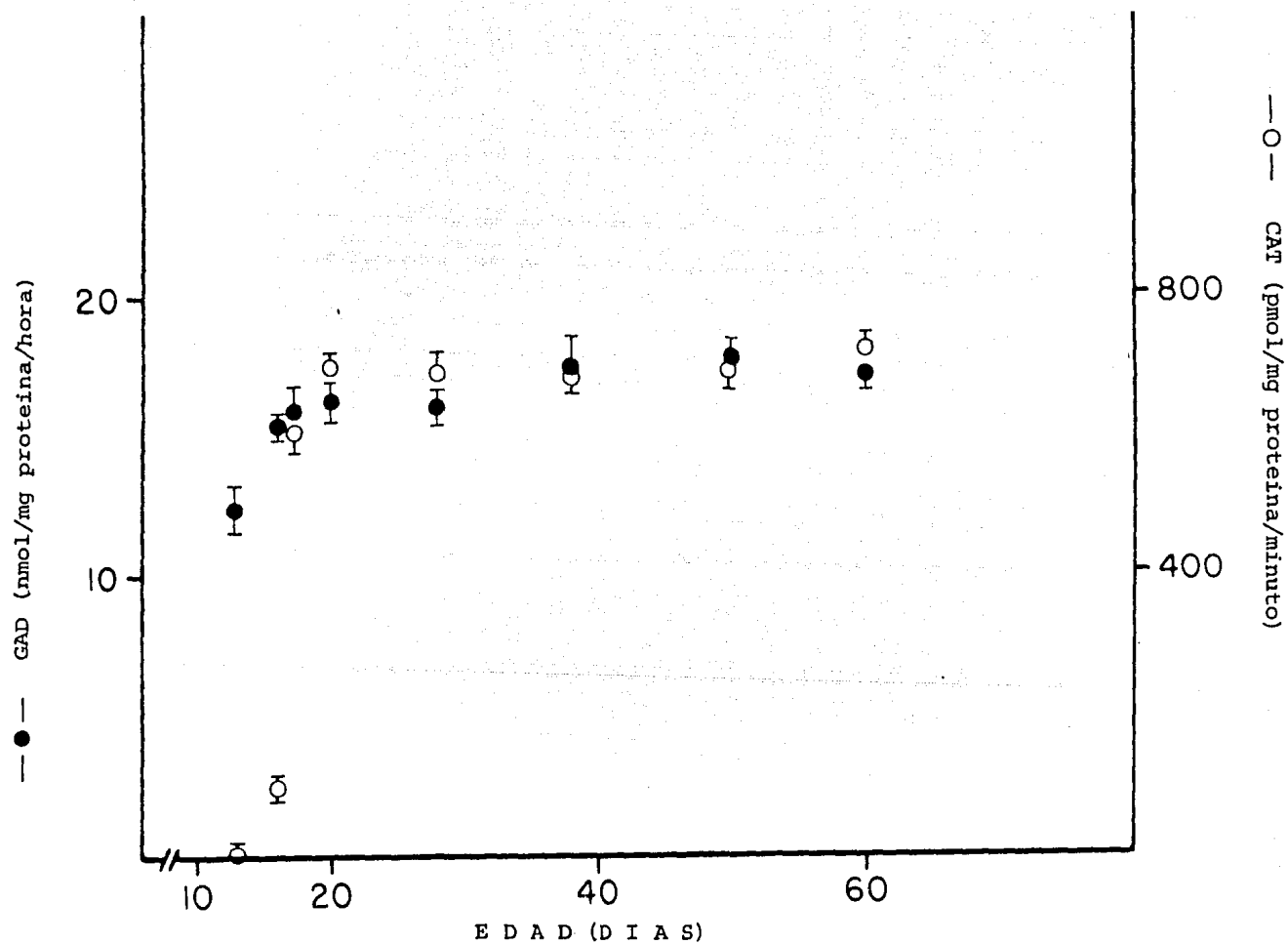


Fig. 22.- Desarrollo de la actividad de la GAD y la CAT en la rata pigmentada control.

TABLA 1.

ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD) Y DE COLINACETILTRANSFERASA (CAT) EN HOMOGENADO VESTIBULAR DE RATAS CONTROL, HIPOTIROIDEAS Y CON TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (PTU-T₄).

DIA	ENZIMA	CONTROL	HIPOTIROIDEO	PTU-T ₄
13	GAD	12.6±0.8(4)	N.D.	N.D.
	CAT	21.0±2.0(4)	N.D.	N.D.
15	GAD	15.5±0.5(4)	15.2 (2)	15.1 (2)
	CAT	101.0±7.0(4)	91 (2) [9.9]	105 (2)
17	GAD	16.1±0.7(4)	15.9 (2)	15.5 (2)
	CAT	610±25(4)	553 (2) [9.3]	639 (2)
20	GAD	16.4±0.43 (4)	15.4±0.56 (4)	15.6±0.35 (4)
	CAT	692.0±9.3 (4)	633.0±6.3 (4) [9]	680.0±7.8 (4)
28	GAD	16.1±0.61 (4)	15.8±0.4 (4)	16.4±0.38 (4)
	CAT	691.0±11.8(4)	588.0±15.8(4) [15]	687.0±18.2(4)
38	GAD	17.5±0.57 (4)	17.1±0.29 (4)	16.8±0.58 (4)
	CAT	699.0±10.5(4)	536.0±12.7(4) [23]	701.0±14.0(4)
50	GAD	17.6±0.62 (4)	16.9±0.37 (4)	17.2±0.55 (4)
	CAT	707.0±21.1(4)	453.0±15.6(4) [36]	705.0±14.7(4)
60	GAD	17.2±0.29 (4)	17.1±0.1 (4)	17.6±0.23 (4)
	CAT	720.0±6.9 (4)	394.0±7.9 (4) [45]	694.0±10.0(4)

GAD (nmol/mg proteina/h ± E.S.M.).

CAT (pmol/mg proteina/min ± E.S.M.).

() Número de experimentos mostrado entre paréntesis.

[] Indica el porcentaje de disminución con respecto al control.

N.D. no determinadas.

y los reportados para CAT en retina (175) y en tejido nervioso (176). Los cambios en la maduración de la CAT vestibular en la rata corroboran estudios ontogenéticos realizados en crestas vestibulares aisladas del pollo y del cuy (137, 117), en donde la CAT se detecta sólo cuando los botones eferentes llegan al epitelio a hacer contacto con las células pilosas.

El hallazgo de la actividad de la CAT en el vestíbulo de la rata, con valores semejantes a los de la enzima homóloga de SNC, indican que la substancia que sintetiza esta enzima (Ach) podría estar actuando como neurotransmisor en el vestíbulo de la rata. El no haber diferencias significativas en los valores de la CAT con el tiempo, a partir del día 20 de vida postnatal, parece indicar que el tipo celular que contiene a esta enzima se encuentra esencialmente maduro a esta edad.

Estos hallazgos nos indican que a los 20 días de vida postnatal, las dos enzimas (GAD y CAT) se encuentran en los valores de la rata adulta, por lo tanto, la edad límite inferior de los grupos experimentales puede establecerse a los 20 días sin temor a error debido al desarrollo.

El hallazgo de la actividad tanto de la GAD como de la CAT con actividades específicas semejantes a la de sus enzimas homólogas en SNC, nos podrían sugerir que el GABA y la acetilcolina actuarían como neurotransmisores en el vestíbulo de la rata. Sin embargo, no nos permiten señalar a la población celular en la que están localizadas estas actividades enzimáticas, por lo que, como se explicó anteriormente, se utilizó el modelo del hipotiroidismo.

TABLA 2.

ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD) Y DE LA COLIN ACETILTRANSFERASA (CAT) EN CEREBRO DE RATA PIGMENTADA LONG-EVANS CONTROL.

DIA	ENZIMA	ACTIVIDAD
20	GAD	47.5±2.33(4)
	CAT	804.0±16.3(4)
28	GAD	50.5±2.5 (4)
	CAT	848.0±17.5(4)
38	GAD	56.5±2.3 (4)
	CAT	842.0±21 (4)
50	GAD	55.0±1.96(4)
	CAT	870.0±21.6(4)
60	GAD	54.0±1.87(4)
	CAT	850.0±24 (4)

GAD (nmol/mg proteína/h ± E.S.M.)

CAT (pmol/mg proteína/min ± E.S.M.)

() Número de experimentos mostrado entre paréntesis.

Al efectuar la determinación de la actividad de la GAD en los animales hipotiroideos se encontró que esta enzima no se modifica, y sus valores son de la misma magnitud que en los controles, siendo los valores de GAD los siguientes: 15.2, 15.9, 15.4±0.56, 15.8±0.4, 17.1±0.29, 16.9±0.37 y 17.1±0.1 nmol/mg proteína/h en los animales hipotiroideos de 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad respectivamente (tabla 1, fig. 23). Estos valores representan el 98%, 98.7%, 93.9%, 98.1%, 97.7%, 96% y 99.4% de los controles, respectivamente.

En contraste, la actividad de la CAT en los animales hipotiroideos mostró una disminución gradual con el tiempo de tratamiento con PTU. En animales hipotiroideos de 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad se encontró una actividad específica de la CAT de: 91, 553, 633.0±6.3, 588.0±15.8, 536.0±12.7, 453.0±15.6 y 394.0±7.0 pmol/mg proteína/min, respectivamente (Tabla 1, Fig. 23). Esto representa una disminución del 9.9%, 9.3%, 9%, 15%, 23% 36% y 45% con respecto al control, en esos mismos días.

Estos resultados nos permiten postular una localización de la GAD en una estirpe celular que no sufre ninguna modificación con el tratamiento, posiblemente la célula pilosa; y que la CAT se encuentra en una población celular que se ve afectada por el hipotiroidismo, y que posiblemente sean las terminales eferentes de maduración tardía.

Se conoce que en la rata, la función tiroidea empieza relativamente tarde (en el día 18 de gestación). El rápido incremento en el nivel de las hormonas tiroideas, con un pico al inicio de la tercera semana de vida postnatal coincide con una

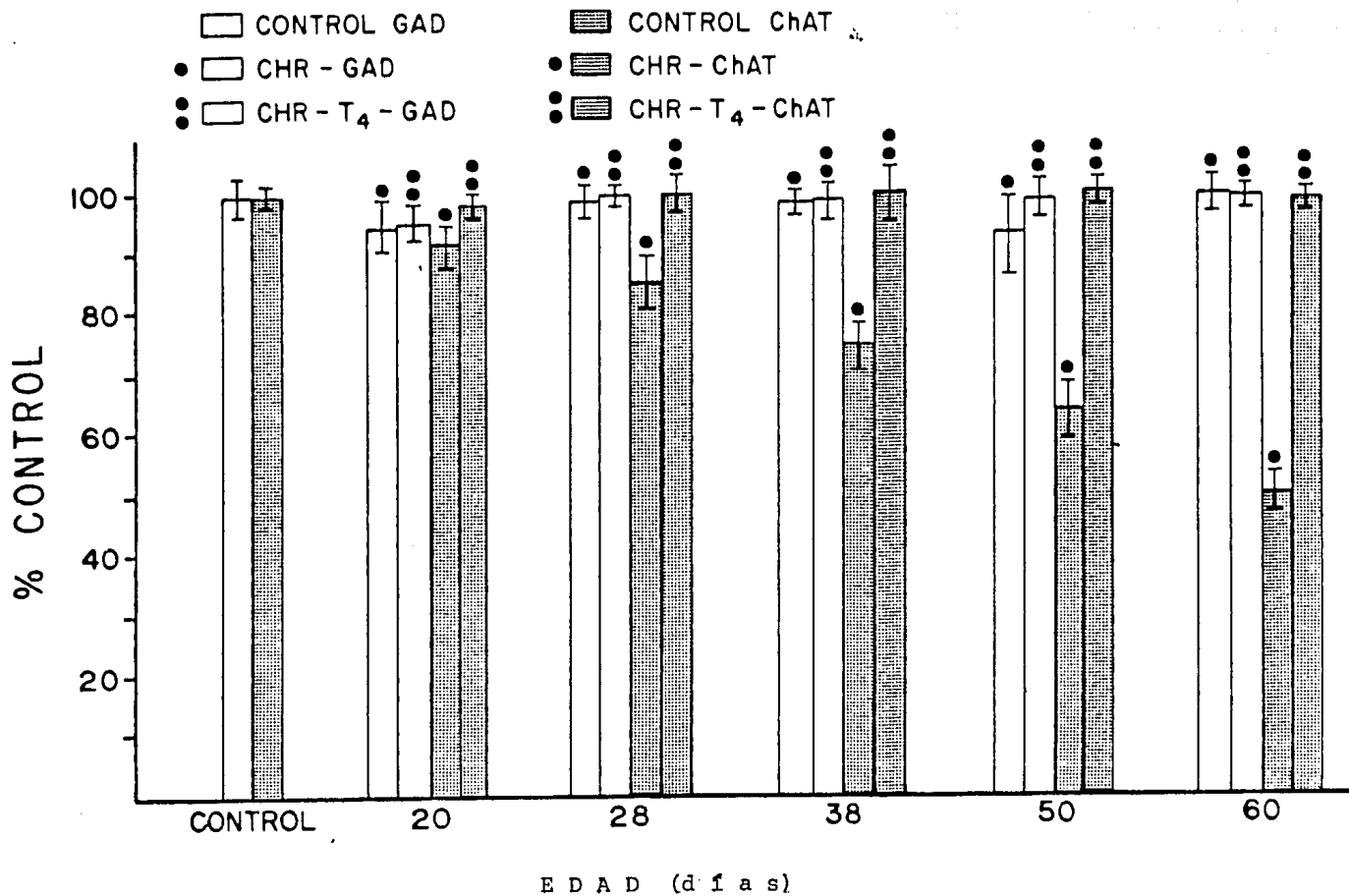


Fig. 23. Actividad de la GAD y la CAT en la rata control, hipotiroidea (CHR) y con terapia de reemplazo hormonal (CHR-T₄).

fase importante en el desarrollo morfológico y funcional de los receptores vestibulares (164). Durante esta fase, la diferenciación celular y la sinaptogénesis son particularmente activas (165), por lo tanto, la participación de las hormonas tiroideas en el desarrollo vestibular (al menos para algunas poblaciones celulares) puede ser realmente importante.

Se ha reportado que el hipotiroidismo afecta la maduración del ganglio vestibular y las células pilosas, particularmente la innervación de éstas últimas (167). En este estudio se observó que a los 14 días de vida postnatal no se encontraron diferencias a nivel de las células pilosas tipo II y sus contactos sinápticos, entre las ratas hipotiroideas y los controles. Esto indica que la maduración de las células pilosas tipo II y sus innervaciones está prácticamente concluída al nacimiento. Así, la maduración de la célula pilosa tipo II parece no afectarse con el hipotiroidismo, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados bioquímicos. En contraste, en el mismo reporte se describe que en el vestíbulo de las ratas hipotiroideas de 33 días de edad se encuentran células pilosas tipo I y II bien diferenciadas, y las primeras presentan algunas características de inmadurez especialmente a nivel de las fibras eferentes, por lo tanto nuestra interpretación de que el decremento en la actividad de la CAT se debe a que el hipotiroidismo afecta los contactos eferentes de las células pilosas tipo I, de maduración tardía. Esta interpretación está bien documentada en la literatura, en donde los estudios morfológicos del desarrollo normal del sistema vestibular y auditivo muestran un desarrollo asimétrico de las

células pilosas y sus inervaciones. Esas observaciones morfológicas en el vestíbulo indican que existe una maduración temprana de las células pilosas tipo II, después la de las células pilosas tipo I, y una formación temprana de sinapsis aferentes en los dos tipos de células en la misma secuencia (177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184). En la periferia auditiva, el desarrollo asimétrico de las células pilosas cortas es seguido por el de las células pilosas largas en la papila basilar del pollo (185, 186, 187), y las células pilosas externas se desarrollan antes que las células pilosas internas en la cóclea de mamíferos (188, 189).

Con respecto a la inervación eferente, una aparición tardía de estas terminales en el vestíbulo ha sido inferido por varios autores. En esos estudios, fueron examinados estadios muy tempranos en donde las terminales eferentes aún no se encontraban presentes (190), o en otros las terminales nerviosas no se examinaron después del nacimiento (181, 191). Sin embargo, las terminales eferentes han sido observadas en otros estudios (191, 192), y se ha descrito una aparición tardía de éstas en los órganos auditivos (184, 185, 186, 189, 193, 194, 195, 196, 197, 198). Un estudio controversial el cual reporta que esta diferencia en el desarrollo asimétrico de las células pilosas no ocurre en el vestíbulo del ratón, podría sugerir que existen características especiales para cada especie (165, 199).

En base a lo anterior es posible suponer que la maduración de las células pilosas tipo II está prácticamente concluida al nacimiento, lo cual implicaría que para su maduración participan las hormonas tiroideas maternas, y no las fetales como ha sido

descrito recientemente para el tejido nervioso (200).

Las características morfológicas vestibulares en los animales de 33 días de edad (167) podrían explicar la disminución de la actividad de la CAT encontrada en los animales hipotiroideos de 28 días de vida postnatal, sin embargo, esto no explicaría el decremento gradual de esta enzima que se observa en los animales tratados con PTU a partir del día 28 hasta el día 60.

A este respecto, podría postularse un efecto similar del hipotiroidismo en el vestíbulo, al que se sabe sucede en la cóclea; esto es, en el órgano de Corti las terminales nerviosas eferentes hacen contacto con las células pilosas externas, pero posteriormente se retraen y degeneran debido a la acumulación de material amorfo entre las células pilosas y las terminales nerviosas (160, 161). En estudios posteriores se encontró que este material amorfo está formado por polisacáridos que contienen ácido siálico y manosa (201). Un efecto similar del hipotiroidismo en el vestíbulo podría estar ocurriendo, es decir, que las terminales eferentes que ya habían hecho contacto con las células pilosas se retrajeran y degeneraran debido a la acumulación de material amorfo, por lo cual se observa una disminución gradual de la actividad de la CAT con el tiempo.

El desarrollo de la actividad de la CAT en el cerebro de la rata también se ve afectado por el hipotiroidismo (202, 203). También se ha estudiado el efecto de la deficiencia tiroidea sobre la actividad de la CAT en diferentes partes del cerebro (204). Durante el desarrollo normal, la actividad de la CAT se incrementa en la corteza cerebral e hipocampo, y disminuye en el cerebelo; la

deficiencia tiroidea neonatal ocasiona un retardo en el patrón de desarrollo de la actividad de esta enzima (204). En otro estudio, se ha reportado el efecto del hipotiroidismo sobre la actividad de la CAT, GAD y tirosina hidroxilasa en el cuerpo estriado de la rata, y se observó que solamente el desarrollo de la actividad de la CAT se ve afectado en las ratas hipotiroideas (205). Esto implica que las células colinérgicas y GABAérgicas del vestíbulo muestran un patrón de desarrollo muy similar al del cerebro.

La participación de las hormonas tiroideas en el efecto provocado por el hipotiroidismo fué corroborado cuando se observó que la disminución en la actividad de la CAT no se hacía evidente en los animales hipotiroideos a los cuales se les administró la terapia de reemplazo hormonal con tiroxina (PTU- T_4). El valor obtenido de CAT en los animales con terapia de reemplazo hormonal fué de: 105, 639, 680.0 ± 7.8 , 687.0 ± 18.2 , 701.0 ± 14 , 705.0 ± 14.7 y 694.0 ± 10 pmol/mg proteína/min, en animales de 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días, respectivamente (Tabla 1, fig. 23). La actividad de la GAD en los animales con terapia de reemplazo hormonal no sufre ninguna modificación, y los valores obtenidos son de la misma magnitud que los controles. Los valores de GAD en los animales con terapia de reemplazo hormonal de 15, 17, 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad son: 15.1, 15.5, 15.6 ± 0.35 , 16.4 ± 0.38 , 16.8 ± 0.58 , 17.2 ± 0.55 y 17.6 ± 0.23 nmol/mg proteína/h, respectivamente (Tabla 1, fig. 23).

Como se muestra en la tabla II (Brain Res.), la dosis administrada de PTU fué efectiva en inducir el hipotiroidismo; en esta tabla se muestran los niveles de tiroxina y triyodotironina

en el suero de los animales control, hipotiroideos y PTU- T_4 .

Los niveles de tiroxina en el suero de ratas control de 20, 28, 38, 50 y 60 días fueron de: 2.8 ± 0.12 , 3.1 ± 0.08 , 2.7 ± 0.07 , 3.6 ± 0.18 y 2.1 ± 0.12 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente. Los niveles de triyodotironina en las ratas control son de: 95.0 ± 7.1 , 113.0 ± 2.3 , 98.5 ± 5.7 , 95.0 ± 3.1 y 92.0 ± 3.5 ng/dl , en 20, 28, 38, 50 y 60 días respectivamente.

Los niveles de T_3 y T_4 en los animales hipotiroideos se encontraron muy disminuidos. En los animales de 20 días de edad se encontraron niveles de T_3 de 11.7 ± 0.47 ng/dl , lo cual representa el 87% de disminución con respecto al control; a los 28 días se encontró un valor de T_3 de 18.2 ± 1.3 ng/dl , que representa el 84% de disminución del valor control; en los animales hipotiroideos de 38 días de edad se encontraron niveles de T_3 de 23.5 ± 1.5 ng/dl , que representa el 76% de disminución con respecto al valor control; a los 50 días de edad se encontraron niveles de T_3 de 22.5 ± 1.27 ng/dl , lo que representa un 77% de disminución con respecto al control; y en los animales de 60 días de edad se encontraron niveles de T_3 de 21.7 ± 1.6 ng/dl , lo que representa un 77% de disminución con respecto al control (Tabla II, Brain Res.).

Los niveles de T_4 en los animales hipotiroideos de 20 y 28 días de edad no fueron detectables; en los animales de 38 días se encontraron niveles de T_4 de 0.3 ± 0.009 $\mu\text{g/dl}$, que representa el 88.9% de disminución con respecto al control; a los 50 días se encontraron niveles de T_4 de 0.25 ± 0.011 $\mu\text{g/dl}$, que es el 93.1% de disminución con respecto al control; en los animales de 60 días de edad se encontraron niveles de T_4 de 0.28 ± 0.012 $\mu\text{g/dl}$, que

representa el 87% de disminución con respecto al control (tabla II, Brain Res.).

En los animales con terapia de reemplazo hormonal se encontraron niveles de T_3 y T_4 de la misma magnitud que los controles (Tabla II, Brain Res.). En este grupo se hallaron niveles de T_3 de: 83.3 ± 2.7 , 84.0 ± 1.6 , 85.5 ± 4.8 , 89.5 ± 6.7 y 88.5 ± 3.3 ng/dl, en 20, 28, 38, 50 y 60 días respectivamente. Los niveles de T_4 que se detectaron en los animales PTU- T_4 de 20, 28, 38, 50 y 60 días de edad son de: 2.1 ± 0.04 , 2.2 ± 0.08 , 2.28 ± 0.06 , 2.5 ± 0.14 y 2.3 ± 0.14 μ g/dl, respectivamente (Tabla II, Brain Res.).

Estos resultados muestran que las dosis correctivas de T_4 restauraron los niveles normales circulantes de T_3 y T_4 en los animales hipotiroideos a los cuales se les administró la terapia de reemplazo hormonal con tiroxina. Los niveles normales tanto de T_3 como de T_4 se observan desde los 20 días de edad.

HALLAZGOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

VALORACION DEL REFLEJO VESTIBULO-OCULAR POSTROTATORIO (VOR).- La valoración del VOR se realizó en el Instituto Nacional de la Comunicación Humana (INCH), en donde el Dr. Adrián Poblano se encargó de manejar el Electronistagmógrafo y registrar la respuesta, el manejo de los animales y el procesamiento y análisis estadístico de los datos fué realizado por la autora de esta tesis. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Los animales del grupo control no presentan respuesta a la edad de 14 días, a la edad de 17, 18, 21, 24, 27, 28, 31, 35, 38, 45, 46, 47, 48 y 49 días presentan una frecuencia de: 3.88 ± 0.075 ,

TABLA 3.

REFLEJO VESTIBULO-OCULAR POSTROTATORIO (VOR) EN RATAS PIGMENTADAS CONTROL Y CON TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (PTU-T₄).

EDAD (días)	FRECUENCIA (No. de sacadas/duración)	
	CONTROL	PTU-T ₄
14	N.R.	N.R.
17	3.88±0.075 (6)	N.R.
18	3.89±0.11 (6)	N.R.
21	4.65±0.09 (6)	3.68±0.17 (6)
24	4.64±0.15 (6)	4.25±0.1 (6)
27	4.74±0.13 (6)	4.67±0.086(6)
28	4.85±0.12 (6)	4.86±0.1 (6)
31	4.65±0.076(6)	4.71±0.054(6)
35	4.70±0.1 (6)	4.95±0.037(6)
38	4.95±0.12 (6)	4.8 ±0.11 (6)
45	4.9 ±0.11 (6)	4.8±0.076 (6)
46	4.76±0.11 (6)	4.71±0.065(6)
47	4.86±0.1 (6)	4.76±0.11 (6)
48	4.9±0.069 (6)	4.81±0.079(6)
49	4.85±0.12 (6)	4.75±0.088(6)

La prueba se realizó a 45 rpm, durante 90 segundos, por triplicado en cada animal, con un intervalo de 15 minutos entre cada prueba.
() Entre paréntesis se indica el número de animales.

N.R. No hay respuesta.

3.89±0.11, 4.35±0.09, 4.64±0.15, 4.74±0.13, 4.85±0.12, 4.65±0.076, 4.7±0.1, 4.95±0.12, 4.9±0.11, 4.76±0.11, 4.86±0.1, 4.9±0.069, 4.85±0.12. La respuesta se estabiliza el día 21, y no se encontraron diferencias significativas desde ese día hasta el día 49 (Tabla 3). Como se observa en esta tabla, los resultados del grupo control están de acuerdo con los bioquímicos, al encontrarse una respuesta homogénea en el VOR a partir del día 21 de vida postnatal, lo que indica una madurez del sistema a partir de ese momento.

En los animales del grupo con terapia de reemplazo hormonal no se obtuvo respuesta a la edad de 14, 17 y 18 días, estos animales empiezan a responder a los 21 días de edad en donde presentan una frecuencia de 3.68±0.17. A la edad de 24, 27, 28, 31, 35, 38, 45, 46, 47, 48 y 49 días presentan una frecuencia de: 4.25±0.1, 4.67±0.086, 4.86±0.1, 4.71±0.054, 4.95±0.037, 4.8±0.11, 4.8±0.076, 4.71±0.065, 4.76±0.11, 4.81±0.079 y 4.75±0.088, respectivamente (Tabla 3). Estos animales manifiestan una completa recuperación de la función vestibular a partir de los 24 días de edad, que es cuando presentan una respuesta igual a la de los controles. Esto nos muestra que la terapia de reemplazo hormonal con tiroxina fué efectiva en inducir la recuperación de la función vestibular, aunque difieren un poco de los resultados bioquímicos en los que ya se observa la protección del reemplazo hormonal sobre la actividad de la CAT desde los 20 días.

En los animales del grupo hipotiroideo no se obtuvo respuesta, desde los 14 hasta los 49 días de edad que fué el último día que se registraron, lo cual indica que estos animales

tienen completamente dañado el aparato vestibular.

MEDICION DE LOS POTENCIALES PROVOCADOS AUDITIVOS DE TALLO CEREBRAL.-La medición de los potenciales provocados auditivos de tallo cerebral se realizó en el Instituto Nacional de la Comunicación Humana (INCH), en donde el Dr. Adrián Poblano se encargó de manejar el aparato para medir los Potenciales y registrar la respuesta, el manejo de los animales y el procesamiento y análisis estadístico de los datos fué realizado por la autora de esta tesis.

En la tabla 4 se muestran los resultados de la medición de los potenciales provocados auditivos de tallo cerebral a 70 dB, en la rata control, desde los 11 hasta los 60 días de edad. A los 11 días de edad no se obtuvo ninguna respuesta, a los 14, 17, 18, 20, 22 y 24 días se registra la onda I con una latencia (mseg) de: 2.12 ± 0.079 , 1.62 ± 0.06 , 1.6 ± 0.05 , 1.52 ± 0.048 , 1.35 ± 0.076 y 1.23 ± 0.061 , respectivamente; desde el día 25 hasta el día 60 se registra la onda I con una latencia de 1.2 mseg. La onda II se registra con una latencia de: 3.2 ± 0.089 , 2.88 ± 0.095 , 2.68 ± 0.06 , 2.53 ± 0.056 , 2.45 ± 0.11 , 2.4 ± 0.1 , 2.38 ± 0.065 , 2.35 ± 0.067 , 2.3 ± 0.063 , 2.18 ± 0.1 y 2.15 ± 0.056 mseg, a los 14, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 27, 29, 30 y 32 días, respectivamente. Desde el día 33 hasta el día 60 se registra la onda II con una latencia de 2.1 mseg. A los 14, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 33 y 39 días aparece la onda III con una latencia de: 4.6 ± 0.037 , 4.53 ± 0.11 , 4.37 ± 0.14 , 4.2 ± 0.12 , 3.82 ± 0.12 , 3.62 ± 0.095 , 3.5 ± 0.12 , 3.45 ± 0.085 , 3.12 ± 0.06 , 3.0 ± 0.058 , 2.95 ± 0.085 , 2.9 ± 0.052 y 2.85 ± 0.067 mseg,

TABLA 4.
 POTENCIALES PROVOCADOS AUDITIVOS DE TALLO CEREBRAL A 70 dB, EN
 RATAS PIGMENTADAS LONG-EVANS CONTROL.

EDAD (Días)	ONDA I*	ONDA II*	ONDA III*	ONDA IV*
11	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
14	2.12±0.079(6)	3.2 ±0.089(6)	4.6 ±0.037(6)	N.R.
17	1.62±0.06 (6)	2.88±0.095(6)	4.53±0.11 (6)	4.92±0.13 (6)
18	1.6 ±0.058(6)	2.68±0.06 (6)	4.37±0.14 (6)	4.85±0.11 (6)
20	1.52±0.048(6)	2.53±0.056(6)	4.2 ±0.12 (6)	4.75±0.1 (6)
22	1.35±0.076(6)	2.45±0.11 (6)	3.82 ±0.12(6)	4.6 ±0.063(6)
24	1.23±0.061(6)	2.4 ±0.1 (6)	3.62±0.095(6)	4.45±0.076(6)
25	1.2 ±0.052(6)	2.38±0.065(6)	3.5 ±0.12 (6)	4.28±0.083(6)
27	1.2 ±0.037(6)	2.35±0.067(6)	3.45±0.085(6)	4.05±0.076(6)
29	1.2 ±0.052(3)	2.3 ±0.063(6)	3.12±0.06 (6)	3.93±0.088(6)
30	1.2 ±0.082(6)	2.18±0.1 (6)	3.0 ±0.058(6)	3.88±0.095(6)
32	1.2 ±0.068(6)	2.15±0.056(6)	2.95±0.085(6)	3.85±0.056(6)
33	1.2 ±0.086(6)	2.1 ±0.068(6)	2.9 ±0.052(6)	3.83±0.067(6)
39	1.2 ±0.045(6)	2.1 ±0.037(6)	2.85±0.067(6)	3.8 ±0.097(6)
46	1.2 ±0.026(6)	2.1 ±0.025(6)	2.8 ±0.052(6)	3.75±0.067(6)
54	1.2 ±0.037(6)	2.1 ±0.052(6)	2.8 ±0.063(6)	3.7 ±0.073(6)
60	1.2 ±0.025(6)	2.1 ±0.026(6)	2.8 ±0.037(6)	3.7 ±0.058(6)

* Representa la latencia de las ondas expresada en mseg.
 La prueba se realizó por triplicado en cada animal.
 () Entre paréntesis se indica el número de animales.

N.R. no hay respuesta.

respectivamente. Desde el día 46 hasta el día 60 aparece la onda III con una latencia de 2.8 msec. La onda IV se registra con una latencia de: 4.92 ± 0.13 , 4.85 ± 0.11 , 4.75 ± 0.1 , 4.6 ± 0.063 , 4.45 ± 0.076 , 4.28 ± 0.083 , 4.05 ± 0.076 , 3.93 ± 0.088 , 3.88 ± 0.095 , 3.85 ± 0.056 , 3.83 ± 0.067 , 3.8 ± 0.073 y 3.75 ± 0.067 msec, a los 17, 18, 20, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 33, 39 y 46 días respectivamente, a los 54 y 60 días se registra con una latencia de 3.7 msec (tabla 4).

Se observa una disminución de las latencias de las ondas I, II, III y IV a medida que aumenta la edad del animal, y a los 24 días de edad se estabiliza la onda I, con una latencia de 1.23 msec, no existe diferencia significativa entre este valor y 1.2 msec, que es la latencia que se registra desde el día 25 hasta el día 60. La onda II se estabiliza el día 30 en donde se registra con una latencia de 2.18 msec, y no existe diferencia significativa entre este valor y el que se registra desde el día 33 hasta el día 60 que es de 2.1 msec. La onda III se estabiliza el día 39, en donde se registra con una latencia de 2.85 msec, y no existe diferencia significativa con el valor registrado desde el día 46 hasta el 60 que es de 2.8 msec. La onda IV se estabiliza el día 46 en donde se registra con una latencia de 3.75 msec y no existe diferencia significativa entre este valor y el registrado el día 54 y el día 60 que es de 3.7 msec (Tabla 4).

Los animales hipotiroideos no presentan ninguna respuesta a 70 dB, desde los 11 hasta los 60 días de edad.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la medición de los potenciales provocados auditivos de tallo cerebral a 30 dB, en

TABLA 5.

POTENCIALES PROVOCADOS AUDITIVOS DE TALLO CEREBRAL A 30 dB, EN LA RATA PIGMENTADA LONG-EVANS CONTROL.

EDAD (Días)	ONDA I*	ONDA II*	ONDA III*	ONDA IV*
11	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
14	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
17	2.23±0.049(6)	3.13±0.071(6)	4.17±0.076(6)	5.4 ±0.1 (6)
18	2.2 ±0.068(6)	3.0 ±0.052(6)	4.15±0.11 (6)	5.28±0.04 (6)
20	2.05±0.081(6)	2.93±0.13 (6)	4.1 ±0.13 (6)	5.2 ±0.1 (6)
22	1.9 ±0.058(6)	2.85±0.13 (6)	4.03±0.067(6)	5.1 ±0.13 (6)
24	1.83±0.076(6)	2.82±0.095(6)	3.83±0.084(6)	4.85±0.12 (6)
25	1.8 ±0.082(6)	2.77±0.1 (6)	3.75±0.085(6)	4.73±0.067(6)
27	1.8 ±0.073(6)	2.75±0.085(6)	3.68±0.06 (6)	4.55±0.096(6)
29	1.8 ±0.037(6)	2.73±0.092(6)	3.55±0.056(6)	4.37±0.088(6)
30	1.8 ±0.089(6)	2.7 ±0.068(6)	3.4 ±0.063(6)	4.3 ±0.073(6)
32	1.8 ±0.037(6)	2.6 ±0.073(6)	3.38±0.054(6)	4.2 ±0.063(6)
33	1.8 ±0.052(6)	2.58±0.095(6)	3.3 ±0.086(6)	4.15±0.099(6)
39	1.8 ±0.068(6)	2.6 ±0.037(6)	3.25±0.076(6)	4.13±0.076(6)
46	1.78±0.031(6)	2.6 ±0.045(6)	3.2 ±0.058(6)	4.05±0.022(6)
54	1.8 ±0.057(6)	2.6 ±0.058(6)	3.2 ±0.089(6)	4.0 ±0.068(6)
60	1.8 ±0.025(6)	2.6 ±0.026(6)	3.2 ±0.073(6)	4.0 ±0.052(6)

* Representa la latencia de las ondas, expresada en mseg.
 La prueba se realizó por triplicado en cada animal.
 () Entre paréntesis se indica el número de animales.
 N.R. No hay respuesta.

la rata control, desde los 11 hasta los 60 días de edad. A los 11 y 14 días no se obtiene ninguna respuesta. A los 17, 18, 20, 22, y 24 días aparece la onda I con una latencia de: 2.23 ± 0.049 , 2.2 ± 0.068 , 2.05 ± 0.081 , 1.9 ± 0.058 , y 1.83 ± 0.076 mseg, respectivamente. Desde el día 25 hasta el día 60 se registra la onda I con una latencia de 1.8 mseg. La onda II se registra con una latencia de: 3.13 ± 0.071 , 3.0 ± 0.052 , 2.93 ± 0.13 , 2.85 ± 0.13 , 2.82 ± 0.095 , 2.77 ± 0.1 , 2.75 ± 0.085 , 2.73 ± 0.092 y 2.7 ± 0.068 mseg, en el día 17, 18, 20, 22, 24, 25, 27, 29 y 30, respectivamente. Desde el día 32 hasta el día 60 se registra con una latencia de 2.6 mseg. La onda III se registra con una latencia de: 4.17 ± 0.076 , 4.15 ± 0.11 , 4.1 ± 0.13 , 4.03 ± 0.067 , 3.83 ± 0.084 , 3.75 ± 0.085 , 3.68 ± 0.06 , 3.55 ± 0.056 , 3.4 ± 0.063 , 3.38 ± 0.054 , 3.3 ± 0.086 y 3.25 ± 0.076 mseg, a los 17, 18, 20, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 33 y 39 días, respectivamente. Desde el día 46 hasta el día 60 se registra con una latencia de 3.2 mseg. La onda IV aparece con una latencia de: 5.4 ± 0.1 , 5.28 ± 0.04 , 5.2 ± 0.1 , 5.1 ± 0.13 , 4.85 ± 0.13 , 4.73 ± 0.067 , 4.55 ± 0.096 , 4.37 ± 0.088 , 4.3 ± 0.073 , 4.2 ± 0.063 , 4.15 ± 0.099 , 4.13 ± 0.076 y 4.05 ± 0.022 mseg, a los 17, 18, 20, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 33, 39 y 46 días, respectivamente, en el día 54 y el día 60 se registra con una latencia de 4.0 mseg (tabla 5).

También se observa una disminución de las latencias de las ondas I, II, III y IV a medida que aumenta la edad del animal. La onda I se estabiliza el día 24, en donde se registra con una latencia de 1.83 mseg, la onda II se estabiliza el día 32 en donde aparece con una latencia de 2.6 mseg, la onda III se

estabiliza el día 39 en donde se registra con una latencia de 3.25 mseg, y la onda IV se estabiliza el día 46 en donde aparece con una latencia de 4.05 mseg (tabla 5).

Los cambios en la morfología de los potenciales evocados auditivos de tallo cerebral se atribuyen a cambios en el número y sincronización del disparo neural, y un incremento en la eficiencia de la transmisión sináptica dentro de los núcleos que forman parte de la vía auditiva (206). Esos son los factores que explican la reducción en las latencias durante el desarrollo postnatal.

Los animales hipotiroideos presentan un daño en el sistema auditivo puesto que no se obtuvo respuesta en estos animales, ni a 70 dB ni a 30 dB, desde los 11 hasta los 60 días de edad, que es el último día que se registraron.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la medición de los potenciales provocados auditivos de tallo cerebral a 70 dB en las ratas del grupo con terapia de reemplazo hormonal, desde los 22 hasta los 60 días de edad. No se obtuvo respuesta en los animales de este grupo, a la edad de 11, 14, 17, 18 y 20 días. A la edad de 22, 24, 27, 29 y 32 días se registra la onda I con una latencia de: 1.98 ± 0.06 , 1.7 ± 0.077 , 1.4 ± 0.037 , 1.35 ± 0.043 y 1.3 ± 0.037 mseg, respectivamente, y desde el día 39 hasta el día 60 se registra con una latencia de 1.2 mseg. La onda II aparece con una latencia de: 3.0 ± 0.093 , 2.85 ± 0.076 , 2.4 ± 0.052 , 2.37 ± 0.042 , 2.3 ± 0.052 y 2.23 ± 0.076 mseg, a los 22, 24, 27, 29, 32 y 39 días de edad, respectivamente, y desde los 46 hasta los 60 días se registra con una latencia de 2.1 mseg. La onda III se registra

TABLA 6.

POTENCIALES PROVOCADOS AUDITIVOS DE TALLO CEREBRAL A 70 dB, EN LAS RATAS CON TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (PTU-T₄).

EDAD (Días)	ONDA I*	ONDA II*	ONDA III*	ONDA IV*
22	1.98±0.06 (6)	3.0 ±0.093(6)	4.05±0.099(6)	5.05±0.072(6)
24	1.7 ±0.077(6)	2.85±0.076(6)	3.7 ±0.068(6)	4.8 ±0.073(6)
27	1.4 ±0.037(6)	2.4 ±0.052(6)	3.5 ±0.068(6)	4.2 ±0.14 (6)
29	1.35±0.043(6)	2.37±0.042(6)	3.2 ±0.093(6)	3.98±0.12 (6)
32	1.3 ±0.037(6)	2.3 ±0.052(6)	2.98±0.12 (6)	3.9 ±0.063(6)
39	1.2 ±0.086(6)	2.23±0.076(6)	2.92±0.13 (6)	3.88±0.12 (6)
46	1.2 ±0.037(6)	2.1 ±0.052(6)	2.9 ±0.073(6)	3.85±0.1 (6)
54	1.2 ±0.063(6)	2.1 ±0.037(6)	2.8 ±0.037(6)	3.7 ±0.07 (6)
60	1.2 ±0.026(6)	2.1 ±0.045(6)	2.8 ±0.052(6)	3.7 ±0.077(6)

* Representa la latencia de las ondas, expresada en mseg.

La prueba se realizó por triplicado en cada animal.

() Entre paréntesis se indica el número de animales.

No existe respuesta antes de los 22 días.

con una latencia de: 4.05 ± 0.099 , 3.7 ± 0.068 , 3.5 ± 0.068 , 3.2 ± 0.093 , 2.98 ± 0.12 , 2.92 ± 0.13 y 2.9 ± 0.073 mseg, a los 22, 24, 27, 29, 32, 39 y 46 días, respectivamente, el día 54 y el día 60 se registra con una latencia de 2.8 mseg. La onda IV se registra con una latencia de: 5.05 ± 0.072 , 4.8 ± 0.073 , 4.2 ± 0.14 , 3.98 ± 0.12 , 3.9 ± 0.063 , 3.88 ± 0.12 y 3.85 ± 0.1 mseg, a la edad de 22, 24, 27, 29, 32, 39 y 46 días, respectivamente; el día 54 y el día 60 se registra con una latencia de 3.7 mseg (tabla 6).

Al igual que en el grupo control, las latencias de las ondas disminuyen conforme aumenta la edad del animal, pero la maduración de la respuesta no ocurre a la misma velocidad que en el grupo control. La onda I se estabiliza hasta el día 39 en los animales del grupo PTU-T₄, mientras que en el grupo control esta onda se estabiliza el día 24 de vida postnatal. Lo mismo ocurre con la onda II, la cual en el grupo PTU-T₄ se estabiliza hasta el día 46, mientras que en el grupo control se estabiliza desde el día 30. En el grupo PTU-T₄, la onda III se estabiliza hasta el día 54, mientras que en el grupo control se estabiliza el día 39; la onda IV se estabiliza el día 54 de vida postnatal, en el grupo PTU-T₄, mientras que en el grupo control esta onda se estabiliza el día 46.

En el día 22 de vida postnatal se obtuvo la primera respuesta a 70 dB, en los animales PTU-T₄, pero las latencias de las ondas no son las mismas que las del grupo control, mientras que en el grupo control la latencia de la onda I es de 1.35, mseg, en los PTU-T₄ la latencia es de 1.98 mseg, de igual manera existe una diferencia en las latencias de las ondas II, III y IV. En el

grupo control se registra la onda II con una latencia de 2.45 mseg y en el grupo PTU-T₄ se registra con una latencia de 3.0 mseg, la onda III se registra con una latencia de 3.82 mseg en el grupo control y 4.05 mseg en el grupo PTU-T₄. En el grupo control se registra la onda IV con una latencia de 4.6 mseg y en el grupo PTU-T₄ se registra con una latencia de 5.05 mseg. De la misma manera, existe una diferencia en las latencias de las ondas entre el grupo control y el PTU-T₄, en el día 24 de vida postnatal; las latencias de las ondas en el grupo PTU-T₄ son mayores que las del grupo control (Tablas 4 y 6). En el día 27 de vida postnatal se registra la onda I con una latencia de 1.2 mseg en el grupo control, mientras que en el grupo PTU-T₄ se registra con una latencia de 1.4 mseg; la onda II se registra con una latencia de 2.35 mseg en el grupo control y 2.4 mseg en el grupo PTU-T₄; la onda III se registra con una latencia de 3.45 mseg en el grupo control y 3.5 mseg en el grupo PTU-T₄; la onda IV se registra con una latencia de 4.05 mseg en el grupo control y 4.2 mseg en el grupo PTU-T₄. A la edad de 39 días ya la onda I presenta la misma latencia tanto en el grupo control como en el PTU-T₄, que es de 1.2 mseg, mientras que las ondas II, III y IV todavía presentan diferencias con respecto al control. A la edad de 46 días ya la onda II presenta el mismo valor que en el grupo control, que es de 2.1 mseg, mientras que la onda III alcanza el mismo valor que el control hasta la edad de 54 días; y la onda IV presenta el mismo valor que el grupo control también a la edad de 54 días.

Los animales del grupo con terapia de reemplazo hormonal presentan la misma respuesta que el grupo control, a partir de

los 54 días de edad, a 70 dB, pero no responden a 30 dB; esto indica que los animales a los que se les administró la terapia de reemplazo hormonal no recuperan completamente la función auditiva, probablemente porque la terapia de reemplazo hormonal se inició después del período crítico de desarrollo de la cóclea. Se ha demostrado previamente, que la administración de pequeñas dosis de tiroxina desde el nacimiento, a ratas hipotiroides tratadas con PTU, corrigen completamente las anormalidades durante el desarrollo de la función coclear (159). En el presente trabajo, la administración de tiroxina se empezó el día 12 de vida postnatal, por lo que es muy probable que el período crítico de desarrollo coclear se encuentre antes del día 12; y las anormalidades funcionales que se observan en los animales con terapia de reemplazo hormonal, pueden explicarse por la incompleta corrección de la morfogénesis de las estructuras cocleares.

CONCLUSIONES.

Por los resultados presentados en este trabajo es evidente que existe actividad de la Glutamato descarboxilasa (GAD) y de la Colin acetiltransferasa (CAT), en el vestibulo de la rata pigmentada Long-Evans, lo que apoya la posible participación del GABA y la acetilcolina como neurotransmisores en este sistema.

En cuanto a la localización celular de la GAD y la CAT se encontró que en los animales hipotiroideos se observa un decremento gradual en la actividad específica de la CAT, llegando a un 45% del control a los 60 días de edad, mientras que la actividad específica de la GAD no se modificó. Estos resultados nos indican que la GAD se encuentra localizada en un elemento celular que no sufre ninguna alteración con el tratamiento con PTU, posiblemente la célula pilosa; mientras que la CAT se encuentra localizada en una estirpe celular que se ve afectada por el hipotiroidismo, en este caso las terminales sinápticas eferentes.

La disminución en la actividad de la CAT no se observa en los animales a los que se les administró la terapia de reemplazo hormonal, lo que demuestra que el efecto deletéreo del PTU es mediado a través de las hormonas tiroideas, y no un efecto directo sobre el vestibulo.

Estos resultados, aunque indirectos, corroboran los reportes en los cuales la acetilcolina ha sido reportada como uno de los transmisores eferentes en la periferia sensorial de los vertebrados, y apoyan también al GABA como un candidato a

transmisor aferente en este sistema.

Se comprobó el estado hipotiroideo de los animales al hacer la determinación de las hormonas tiroideas, encontrándose niveles muy bajos de T_3 y T_4 en éstos. En los animales del grupo con terapia de reemplazo hormonal se encontraron niveles de T_3 y T_4 de la misma magnitud que en el grupo control, lo cual indica que la dosis de tiroxina administrada fué efectiva en restaurar los niveles normales circulantes de T_3 y T_4 .

Los registros electrofisiológicos indicaron daño tanto en la parte vestibular como en la auditiva en los animales hipotiroideos. En los animales del grupo con terapia de reemplazo hormonal se observa una completa recuperación de la función vestibular, mientras que la función auditiva sólo experimenta una recuperación parcial.

REFERENCIAS .

1. Murray, B.L. (1974). Sistema Auditivo y Sistema Vestibular, En Sistema Nervioso Humano, Ed. Harla, S.A. de C.V., México, pp.271-290.
2. Parker, D.E. (1981). El Aparato Vestibular, Scientific American, 52, 62-75.
3. Netter, F.H. (1983). Nervous System. Part I. Anatomy and Physiology. The CIBA Collection of Medical Illustrations, pp. 176-182.
4. Hudspeth, A.J. (1983). The hair cells of the inner ear. Scientific American, 247,42-52.
5. 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), 2047-2411.
6. Flock, A. (1967). Ultrastructure and function in the lateral line organs, In lateral line receptors, P. Cochn (Ed.) Indiana Univ. Press. Bloomington, In. pp. 163-197.
7. Shotwell, S.L., Jacobs, R. and Hudspeth, A.J. (1981). Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles. Ann. New York Acad. Sci. 374,1-10.
8. Kandel, E.R. and Schwartz, J.H. (1985), Principles of Neural Science, pp. 396-408, 584-596.
9. Roberts, W.M., Howard, J. and Hudspeth, A.J. (1988), Hair Cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear.

Ann. Rev. Cell Biol. 4, 63-92.

10. Corey, D.P. and Hudspeth, A. J. (1979), Ionic Basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell, *Nature*, 281, 675-677.

11. Ohmori, H. (1985), Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J. Physiol.* 359, 189-217.

12. Howard, J. and Hudspeth, A.J. (1988), Gating compliance associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron*, 1, 189-199.

13. Holton, T. and Hudspeth, A.J. (1986), The voltage dependence of hair cell transduction. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 12, 778.

14. Ohmori, H. (1987), Gating properties of the mechano-electrical transducer channel in the dissociated vestibular hair cell of the chick, *J. Physiol.* 387, 589-609.

15. Boshier, S.K. and Warren, R.L. (1978), Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid, *Nature*, 273, 377-378.

16. Corey, D.P. and Hudspeth, A.J. (1979), Response latency of vertebrate hair cells, *Biophys. J.* 26, 499-506.

17. Corey, D.P. and Hudspeth, A.J. (1983), Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. *J. Neurosci.* 3, 962-976.

18. Hudspeth, A.J. (1989), How the ear's works work. *Nature*, 341, 397-404.

19. Huang, C.M. (1980), A comparative study of the brainstem auditory response in mammals. *Brain Res.*, 184, 215-219.

20. Moller, A.R. (1983), On the origin of the compound action potentials (N1, N2) of the cochlea of the rat. *Exp. Neurol.*, 80, 633-644.
21. Furukawa, T. and Ishii, Y. (1967), Neurophysiological studies on hearing in goldfish. *J. Neurophysiol.* 30, 1377-1403.
22. Furukawa, Y., Ishii, Y. and Matsumura, S. (1972), Synaptic delay and time course of the postsynaptic potential at the junction between hair cells and eighth nerve fibers in the goldfish. *Jap. Physiol.* 22, 617-635.
23. Ishiik, Y., Matsumura, S. and Furukawa, T. (1971), Quantal nature of transmission at the synapse between hair cells at the eighth nerve fibers. *Jap. J. Physiol.* 19, 79.
24. Wersäll, J., Flock, A. and Lundquist, P.G. (1965), Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 30, 115-145.
25. Bagger-Sjöbäck, D. and Gulley, R.L. (1979), Synaptic structures in the type II hair cell in the vestibular system of the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 88, 401-411.
26. Nakajima, Y. and Wong, D.W. (1974), Morphology of afferent and efferent synapses in the hearing organ of the goldfish. *J. Comp. Neurol.* 156, 403-416.
27. Smith, C.A. and Sjöstrand, F.S. (1961), A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J. Ultrastruc. Res.* 5, 184-192.
28. Wersäll, J. (1956), Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea

fig. A light and electronmicroscopic investigation. Acta Otolaryngol. 126, 1-85.

29. Wersäll, J. and Bagger-Sjöbäck, D. (1974), Morphology of the vestibular sense organ. In Handbook of Sensory Physiology. H.H. Kornhuber (Ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, New York. Vol. 6, pp. 124-170.

30. Wersäll, J. and Flock, A. (1965), Functional anatomy of the vestibular and lateral line organs. In Neff, W.D. (Ed.). Contributions to sensory physiology, Vol. 1, New York, Academic Press. pp. 39-61.

31. Sjöstrand, F.S. (1958), Ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. J. Ultrastruc. Res. 2, 122-170.

32. Rossi, M.L., Valli, P. and Casella, C. (1977), Post-synaptic potentials recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. Brain Res. 135, 67-75.

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

34. Gacek, R.R. (1974), Morphological aspects on the efferent vestibular system. In Handbook of Sensory Physiology, H.H. Kornhuber (Ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, N.Y., Vol. 16, pp. 213-220.

35. Warr, W.B. (1975), Olivocochlear and vestibular efferent neurons on the feline brain stem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. J. Comp. Neurol. 161,

159-183.

36. Gleissner, L. and Henriksson, N.G. (1963), Efferent and afferent activity pattern in the vestibular nerve of the frog. *Acta Otolaryngol.*, 58 (suppl. 2), 90-103.
37. Werman, R. (1966), Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 18, 745-766.
38. Goth, A. (1972), *Medical Pharmacology: Principles and concepts* (6th. ed.), St. Louis: C.V. Mosby.
39. Bobbin, R.P. (1979), Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.*, 34, 389-393.
40. Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C. and Jenison, G.L. (1984), Neurotransmitter of the cochlea and lateral line organ. In C. Berlin (Ed.), *Recent advances in hearing science*, San Diego, CA., College-Hill Press., pp. 159-180.
41. Bobbin, R.P. and Thompson, M.H. (1978), Effects of putative transmitter on afferent cochlear transmission. *Annals of Oto-Laryngol.*, 87, 185-190.
42. Klinke, R. and Oertel, W. (1975), Transmitter physiology of cochlear synapses. *Exp. Brain Res. Suppl.* 23, 150.
43. Yu-Wen, S., Yi-Xiong, Z. and Dan-Ping, D. (1986), Effects of L-aspartate and oxaloacetic acid on click-evoked cochlear potentials. *Hearing Res.*, 21, 83-86.
44. Dechesne, C., Raymond, J. and Sans, A. (1984), Action of glutamate in the cat labyrinth. *Annals of Otorhinolaryngol.*, 93, 163-165.
45. Altschuler, R.A., Sheridan, Ch. E., Horn, J.W. and Wenthold,

- R.J. (1989), Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hearing Res.*, 42, 167-174.
46. Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P. and Chihal, D.M. (1981), Kainic acid: An evaluation of its action on cochlear potentials. *Hearing Res.*, 4, 109-120.
47. Jenison, G.L. and Bobbin, R.P. (1985), Quisqualate excites spiral ganglion neurons of the guinea pig. *Hearing Res.*, 20, 261-265.
48. Jenison, G.L., Winbery, S. and Bobbin, R.P. (1986), Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acid agonists, on guinea pig cochlear potentials. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84C, 385-389.
49. McGeer, P.L., McGeer, E.G. and Hattori, T. (1978), Kainic acid as a tool in neurobiology. In: *Kainic acid as a tool in neurobiology*. McGeer, E.G., Olney, J.W. and McGeer P.L. (Eds.), Raven Press, New York, pp. 123-137.
50. Pujol, R., Lenoir, M., Robertson, D., Eybalin, M. and Johnstone, B.M. (1985), Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hearing Res.*, 18, 145-151.
51. Jenison, G.L., Bobbin, R.P. and Thalmann, R. (1985), Potassium-induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. *Journal of Neurochemistry*, 44, 1845-1853.
52. Eybalin, M. and Pujol, R. (1983), A radioautographic study of ^3H -glutamate and ^3H -glutamine uptake in the guinea pig cochlea. *Neuroscience*, 9, 863-871.

53. Ryan, A.F. and Schwartz, I.R. (1984), Preferential uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. *Brain Res.*, 290, 376-379.
54. Altschuler, R.A., Wenthold, R.J., Schwartz, A.M., Haser, W.G., Curthoys, N.P. and Parakkal, M.H. (1984), Immunocytochemical localization of glutaminase like immunoreactivity in the auditory nerve. *Brain Res.*, 291, 173-178.
55. Fex, J. and Altschuler, R.A. (1985), Immunocytochemistry of the mammalian cochlea: results and expectations. *Auditory Biochemistry*, Drescher, D.G., Charles C. Thomas (Ed.), Springfield Illinois, pp, 5-30.
56. Fex, J. and Altschuler, R.A. (1986), Neurotransmitter related immunocytochemistry of the organ of Corti. *Hearing Res.*, 22, 249-263.
57. Fex, J., Altschuler, R.A., Wenthold, J. and Parakkal, M.H. (1982), Aspartate aminotransferase immunoreactivity in cochlea of guinea pig. *Hearing Res.*, 7, 149-160.
58. Fex, J., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H. and Altschuler, R.A. (1985), Glutaminase like immunoreactivity in the organ of Corti of guinea pig. *Hearing Res.*, 17, 101-113.
59. Wiet, J.G., Godfrey, D.A., Ross, D.C. and Dunn, J.D. (1986), Quantitative distribution of aspartate aminotransferase and glutaminase activities in the rat cochlea. *Hearing Res.*, 24, 137-150.
60. Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C. and Chihal, D.M. (1981), Effects of various excitatory amino acid antagonists of guinea pig cochlear potentials. In *Abstracts of the Association for Research*

in Otolaryngology, St. Petersburg Beach, FL., pp. 27.

61. Drescher, M.J., Drescher, D.G. and Medina, J.E. (1983), Effect of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates, in perilymph of guinea pig inner ear. *J. Neurochem.*, 41, 309-320.

62. Melamed, B., Norris, C., Bryant, G. and Guth, P. (1982), Amino acid content of guinea pig perilymph collected under conditions of quiet or sound stimulation. *Hearing Res.*, 7, 13-18.

63. Schwartz, I.R. and Ryan, A.F. (1983), Differential labelling of sensory cell and neural populations in the organ of Corti following amino acid incubations. *Hearing Res.*, 9, 185-200.

64. Bledsoe, S.C., Chihal, D.M., Bobbin, R.P. and Morgan, D.N. (1983), Comparative actions of glutamate and related substances on the lateral line of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C, 119-206.

65. Bobbin, R.P. and Morgan, D.N. (1980), Glutamate mimics the afferent transmitter in the *Xenopus laevis* lateral line. In R.J. (Ed.), *Morphogenesis and malformation of the ear*, New York, Alan R. Liss., pp. 107-109.

66. Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., Winbery, S.L. and Jenison, G.L. (1985), Actions of putative neurotransmitters and other relevant compounds on *Xenopus laevis* lateral line. In: *Auditory Biochemistry*, Drescher, D.G. (Ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 102-121.

67. Higuchi, T., Umekita, S.H. and Obara, S. (1980), The afferent neurotransmitter in the ampullary electroreceptors: L-glutamate mimics the natural transmitter. *Neurosc. Lett. Suppl.* 4, S7.

68. Steinbach, A.B. and Bennett, M.V.L. (1971), Effects of divalent ions and drugs on synaptic transmission in phasic electroreceptors in a mormyrid fish. *J. Gen. Physiol.*, 58, 580-589.
69. Umekita, S.H., Matsumoto, Y., Abe, T. and Obara, S. (1980), The afferent neurotransmitter in ampullary electroreceptors: stimulus-dependent release experiments refute the transmitter role of L-glutamate. *Neurosci. Lett. Suppl.* 4, S7.
70. Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., Chihal, D.M. and Morgan, D.N. (1981), Comparative actions of glutamate and related substances on the *Xenopus laevis* lateral line. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69C, 146-147.
71. Zimmerman, D. McG. (1979), Onset of neural function in the lateral line. *Nature*, 282, 82-84.
72. Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P., Thalmann, R. and Thalmann, I. (1980), Stimulus induced release of endogenous amino acids from skins containing the lateral line organ in *Xenopus laevis*. *Exp. Brain Res.*, 40, 97-101.
73. Bledsoe, S.C., McLaren, J.D. and Meyer, J.R. (1986), Potassium-induced, calcium dependent release of endogenous amino acids from the *Xenopus* lateral line. *Assoc. Res. Otolaryngol. Abs.* 9, 89-90.
74. Bledsoe, S.C., Meyer, J.R. and Howland, M.M. (1985), Effects of excitatory amino acid receptor antagonists on synaptic excitation in the lateral line of *Xenopus laevis*. In Abstracts of the Association for Research in Otolaryngology, Clearwater Beach, FL., Abs. 8, pp. 111.
75. Valli, P., Zuca, G., Prigioni, I., Botta, L., Casella, C. and

- Guth, P.S. (1985), The effect of glutamate on the frog semicircular canal. *Brain Res.*, 330, 1-9.
76. Guth, P.S., Norris, C.H. and Barron, S.E. (1988), Three tests of the hypothesis that glutamate is the sensory hair cell transmitter in the frog semicircular canal. *Hearing Res.*, 33, 223-228.
77. Annoni, J.M., Cochran, S.L. and Precht, W. (1984), Pharmacology of the hair cell-afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog. *The Journal of Neuroscience*, 4, 2106-2116.
78. Soto, E. and Vega, R. (1988), Action of excitatory amino acid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl. *Brain Res.*, 462, 104-111.
79. Altschuler, R.A., Parakkal, M.H. and Eckenstein, F. (1984), Co-localization of enkephalin like and choline acetyltransferase immunoreactivities in olivocochlear neurons of the guinea pig. *J. Histochem. Cytochem.*, 32, 839-843.
80. Fex, J. and Altschuler, R.A. (1981), Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibers in cochlea of guinea pig and rat. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 78, 1255-1259.
81. Hoffman, D.W., Altschuler, R.A. and Fex, J. (1983), High-performance liquid chromatographic identification of enkephalin-like peptides in the cochlea. *Hearing Res.*, 9, 71-78.
82. Eybalin, M., Cupo, A. and Pujol, R. (1983), Localisation ultrastructurale des immunoreactions a un anticorps met-enkephaline dans l'organe de Corti. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, serie III, 296, 1125-1128.

83. Eybalin, M., Cupo, A. and Pujol, R. (1984), Met-enkephalin characterization in the cochlea: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. Brain Res., 305, 313-322.

84. Eybalin, M. and Pujol, R. (1984), Immunofluorescence with met-enkephalin and leu-enkephalin antibodies in the guinea pig cochlea. Hearing Res., 13, 135-140.

85. Eybalin, M., Abou-Madi, L., Rossier, J. and Pujol, R. (1985), Electron microscopic localization of N-terminal proenkephalin immunostaining in the guinea pig organ of Corti. Brain Res., 358, 354-359.

86. Eybalin, M., Cupo, A. and Pujol, R. (1985), Met-enkephalin-arg⁶-gly⁷-leu⁸ in the organ of Corti: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy, Brain Res., 389-395.

87. Altschuler, R.A., Parakkal, M.H., Rubio, J.A., Hoffman, D.W. and Fex, J. (1984), Enkephalin like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: Ultrastructural and lesion studies. Hearing Res., 16, 17-31.

88. Hoffman, D.W., Zamir, N., Rubio, J.A., Altschuler, R.A. and Fex, J. (1985), Proenkephalin and prodynorphin related neuropeptides in the cochlea. Hearing Res., 17, 47-50.

89. Adams, J.C., Mroz, E.A. and Sewell, W.F. (1987), A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair cell sensory organ. Brain Res., 419, 347-351.

90. Ylikoski, J., Paivarinta, H., Eranko, L., Mrena, I. and Lenhtosalo, J. (1984), Is substance P the neurotransmitter in the

vestibular end organs. *Acta Otolaryngol.*, 97, 523-528.

91. Nowak, R., Dorn, A., Bernstein, H.G., Rinne, A., Ziegler, M. and Scholtz, H.J. (1986), Immunocytochemical detection of peptides in the guinea pig cochlea. *Arch. Otorhinolaryngol.*, 243, 36-38.

92. Nowak, R., Dorn, A., Bernstein, H.G., Rine, A., Ziegler, M. and Scholtz, H.J. (1986), Neuropeptides in macula utriculi and macula sacculi of guinea pig labyrinth and immunohistochemical study. *Acta Histochem.*, 78, 219-221.

93. Osborne, M.P. and Thornhill, R.A. (1972), The effect of monoamine depleting drugs upon synaptic bars in the inner ear of the bullfrog (*Rana catesbiana*). *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.*, 127, 347-355

94. Thornhill, R. (1972), The effect of catecholamine precursor and related drugs on the morphology of the synaptic bars in the vestibular epithelia of the frog (*Rana temporaria*). *Comp. Gen. Pharmacol.*, 2, 89-97.

95. Klinke, R. and Evans, E.F. (1977), Evidence that catecholamines are not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.*, 28, 315-324.

96. Comis, S.D. and Leng, C. (1979), Action of putative neurotransmitter in the guinea pig cochlea. *Brain Res.*, 36, 119-128.

97. Guth, P.S., Norris, C.H. and Sewell, W.F. (1985), Primary afferent transmission in acousticolateralis organs. In *Auditory Biochemistry*. Drescher, D.G. (Ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Ill., pp. 42-49.

98. Sewell, W.F., Norris, C.H. and Guth, P.S. (1978), Detection

- of an auditory nerve activating substance. *Science*, 302, 910-912.
99. Sewell, W.F. and Mroz, E.A. (1987), Neuroactive substances in inner ear extracts. *J. Neuroscience*, 7, 2465-2475.
100. Guth, P.S., Norris, C.H. and Bobbin, R.P. (1976), The pharmacology of transmission in the peripheral auditory system. *Pharmacological Reviews*, 28, 95-125.
101. Klinke, R. (1981), Neurotransmitters in the cochlea and the cochlear nucleus. *Acta Oto-Laryngol. (Stockh.)*, 91, 541-554.
102. Churchill, J.A., Schuknecht, H.P. and Doran, R. (1956), Acetylcholinesterase activity in the cochlea. *Laryngoscope*, 66, 1-15.
103. Schuknecht, H.F., Churchill, J.A. and Doran, R. (1959), The localization of acetylcholinesterase in the cochlea. *Archives of Oto-Laryngol.*, 69, 549-559.
104. Jasser, A. and Guth, P.S. (1973), The synthesis of acetylcholine by olivocochlear bundle. *Journal of Neurochemistry*, 20, 45-53.
105. Altschuler, R.A., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H. and Fex, J. (1985), Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res.*, 338, 1-11.
106. Dememes, D., Raymond, J. and Sans, A. (1983), Selective retrograde labelling of vestibular efferent neurons with ³H-choline. *Neuroscience*, 8, 285-290.
107. Bernard, C., Cochran, S.L. and Precht, W. (1985), Presynaptic actions of cholinergic agents upon the hair cell-afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog. *Brain Res.*, 338,

225-236.

108. Caston, J. and Rousell, H. (1984), Curare and the efferent vestibular system. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.), 97, 19-26.
109. Guth, P.S., Norris, C.H., Guth, S.L., Quine, D.B. and Williams, H. (1986), Cholinomimetics mimic efferent effects on semicircular canal afferent activity in the frog. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.), 102, 186-194.
110. Valli, P., Costa, J. and Zucca, G. (1984), Local mechanism in vestibular receptor control. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) 97, 611-618.
111. Hilding, D. and Wersäll, J. (1962), Cholinesterase and its relation to the nerve endings in the inner ear. *Acta Otolaryngol.*, 55, 205-217.
112. Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. and Reale, E. (1971), Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. *Acta Otolaryngol.*, 71, 147-152).
113. Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. and Reale, E. (1971), Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the inner ear. *Acta Otolaryngol.*, Suppl. (Stockh.) 279, 1-50.
114. Dohlman, G.F. (1965), Histochemical studies of vestibular mechanism. In Rasmussen, G.L. and Windl, W.F. (Eds.), *Neural mechanisms of the Auditory and Vestibular systems*. Springfield, Charles C. Thomas, pp. 258-275.
115. Gacek, R.R., Nomura, Y. and Balogh, K. (1965), Acetylcholinesterase activity in the efferent fibers of the statoacoustic nerve. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.), 59, 541-553.
116. López, I. and Meza, G. (1988), Neurochemical evidence for

afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *Neuroscience*, 25, 13-18.

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

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

119. Meza, G., López, I. and Ruiz, M. (1984), Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. *Neuroscience Letters*, 49, 93-98.

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

121. Meza, G., López, I., Paredes, M.A., Peñaloza, Y. and Poblano, A. (1989), Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 107, 406-411.

122. Meza, G., Cuadros, P. and López, I. (1984), Biochemical studies on the cholinergic neurotransmission of the frog vestibule. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 10, 1152.

123. Meza, G. and López, I. (1985), Characterization of cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *J. Neurochem.*, 44, S98C.

124. López, I. and Meza, G. (1980), Some properties of frog vestibular choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. *Neurochem. Res.*, 14, 113-118.

125. Meza, G. (1985), Characterization of GABAergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. *En: Auditory*

Biochemistry. Edited by Dennis G. Drescher, Charles C. Thomas
Publisher. Springfield Ill., pp. 80-101.

126. Drescher, D.G. and Drescher, M.J. (1985), HPLC analysis of
presumptive neurotransmitter in perilymph. In Auditory
Biochemistry. Drescher, D.G. (Ed.), Charles C. Thomas, Springfield
Ill. pp. 50-67.

127. Richrat, W., Kraus, H., Frome, H. (1974), Lokalization von
³H-aminobuteraure in der cochlea. Arch. Otolaryngol. (Stockh.),
64, 436-448.

128. Gulley, R.L., Fex, J. and Wenthold, R.J. (1979), Uptake of
putative neurotransmitters in the organ of Corti. Acta
Oto-Laryngol. (Stockh.), 88, 177-182.

129. Altschuler, R.A. and Fex, J. (1986), Efferent
neurotransmitters. In Neurobiology of Hearing: The cochlea.
Altschuler, R.A., Hoffman, D.W. and Bobbin, R.P. (Eds.), Raven
Press, New York, pp. 383-396.

130. Thompson, G.C., Cortez, A.M. and Igarashi, M. (1986),
GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey organ of Corti.
Brain Res., 372, 72-79.

131. Klinke, R. and Oertel, W. (1977), Evidence that GABA is not
the afferent transmitter in the cochlea. Exp. Brain Res., 28,
311-314.

132. Fex, J. and Wenthold, R.J. (1976), Choline acetyltransferase,
glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in the cochlea
and cochlear nucleus of the guinea pig. Brain Res., 109, 575-585.

133. Tachibana, M. and Kuriyama, K. (1974), Gamma-aminobutyric
acid in the lower auditory pathway of the guinea pig. Brain Res.,

69, 370-374.

134. Sand, O., Ozawa, S. and Hagiwara, S. (1975), Electrical and mechanical stimulation of hair cells in the mudpuppy. *J. Comp. Physiol.*, A 102, 13-26.

135. Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., Winbery, S., Ceasar, G. and Jenison, G.L. (1985), Comparative actions of GABA and acetylcholine on the *Xenopus laevis* lateral line. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80C, 313-318.

136. Meza, G., Cárabez, A. and Ruíz, M. (1982), GABA synthesis in isolated vestibulatory tissue of chick inner ear. *Brain Res.*, 241, 157-161.

137. Iturbe, A.G. and Meza, G. (1986), Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 4 (Suppl. 4) S32.

138. Meza, G., González, M.T. and Ruíz, M. (1985), Specific ^3H -gamma-aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Res.*, 337, 179-183.

139. Meza, G., Hernández, C. and Ruíz, M. (1981), ^3H -GABA uptake in isolated vestibullary cristae of chick inner ear. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7, 147.

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

141. 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.*, 93, 269-273.

142. Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G. (1987), GABA-like immunoreactivity in the chick vestibular end organs. *Brain Res.*, 418, 383-387.
143. Usami, S., Hozawa, J., Tasawa, M., Igarashi, M., Thompson, G.C., Wu, J. and Wenthold, R. (1989), Immunocytochemical study of the GABA system in chicken vestibular endorgans and the vestibular ganglion. *Brain Res.*, 503, 214-218.
144. Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G.C. (1987), GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans. *Brain Res.*, 417, 367-370.
145. Guth, S.L. and Norris, C.H. (1984), Pharmacology of the isolated semicircular canal: Effect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.*, 56, 72-78.
146. Vega, R., Soto, E., Budelli, R. and González, M.T. (1987), Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system?. *Hearing Res.*, 29, 163-167.
147. Tapia, R. and Meza, G. (1981), Propiedades bioquímicas de las sinapsis GABAérgicas y colinérgicas. En temas selectos de Fisiología Celular. A. Peña, R. Drucker y R. Tapia (Eds.), UNAM, México, pp. 223-240.
148. Lehmann, P.A. (1982), Las hormonas tiroideas. *Ciencia*, 33, 145-153.
149. Williams, R.H. (1984), Tratado de Endocrinología (sexta edición), Ed. Interamericana, pp. 186-259.
150. Oppenheimer, J.H. (1979), Thyroid hormones action at the cellular level. *Science*, 203, 971-1002.
151. Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Mariash, C.N., Kinlaw,

W.B., Wong, N.C.W. and Freake, H.C. (1987), Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocrine Reviews*, 8, 288-307.

152. Tata, J.R. (1980), The action of growth and developmental hormones. *Biol. Rev.*, 55, 285-319.

153. Atterwill, C.K., Atkinson, D.J., Bermúdez, I. and Balazz, R. (1985), Effect of thyroid hormone and serum on the development of Na^+ , K^+ adenosine triphosphatase and associated ion fluxes in cultures from rat brain. *Neuroscience* 14, 361-373.

154. Dussault, J.H. and Ruel, J. (1987), Thyroid hormones and brain development. *Ann. Rev. Physiol.*, 49, 321-334.

155. Granholm, A. (1985), Effects of thyroid hormones deficiency on glial constituents in developing cerebellum of the rat. *Exp. Brain Res.*, 59, 451-456.

156. Moliniego Luigi, Cassone Chiara, and Oggero Livio (1986), Action of hypo and hyperthyroidism on the post mortal decay of acetylcholine in the rat spinal cord. *Neuroendocrinol.*, 42, 28-31.

157. Kolz, K., Swirski, C., Pearlman, S. and Gallagher, M. (1987), Simultaneous neonatal T_4 /TSH RIA system, a simultaneous determination of total T_4 -TSH in dried blood spot samples. *En Adv. Neon. Scree.* (Therrell, B.L. Ed.), pp. 59.

158. Eayrs, J. T (1960), Influence of the thyroid on the central nervous system. *Br. Med. Bull.* 16, 122.

159. Uziel, A., Rabie, A. and Marot, M. (1980), The effect of hypothyroidism on the onset of cochlear potentials in developing rats. *Brain Res.*, 182, 172-175.

160. Uziel, A., Gabrion, J., Ohresser, M. and Legrand, Ch. (1981),

Effects of hypothyroidism on the structural developmet of the organ of Corti in the rat. *Acta Otolaryngol.*, 92, 469-480.

161. Uziel, A., Pujol, R., Legrand, Ch. and Legrand, J. (1983), Cochlear synaptogenesis in the hypothyroid rat. *Dev. Brain Res.*, 7, 295-301.

162. Uziel, A., Legrand, Ch. and Rabie, A. (1985), Corrective effects of thyroxine on cochlear abnormalities induced by congenital hypothyroidism in the rat. I: Morphological study. *Dev. Brain Res.*, 19, 111-122.

163. Uziel, A., Marot, M. and Rabie, A. (1985), Corrective effects of thyroxine on cochlear abnormalities induced by congenital hypothyroidism in the rat. II: Electrophysiological study. *Dev. Brain Res.*, 19, 123-127.

164. Vigouroux, E. (1976), Dynamic study of postnatal thyroid function in the rat. *Acta Endocrinol.*, 83, 752-762.

165. Nordemar, H. (1983), Postnatal development of the vestibular sensory epithelium in the mouse. *Acta Otolaryngol.*, 96, 447-456.

166. Dechesne, C., Legrand, C. and Sans, A. (1984), Effects of experimental hypothyroidism on the surface structures of vestibular receptors in developing rats. *Rev. Laryngol.*, 105, 237-241.

167. Dememes, D., Dechesne, C., Legrand, Ch. and Sans, A. (1986), Effects of hypothyroidism on postnatal development in the peripheral vestibular system. *Dev. Brain Res.*, 25, 147-152.

168. Fonnum, F. (1975), A rapid radiochemical method for determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.*, 24, 407-409.

169. Fonnum, F. (1975), Radiochemical assays for choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. In research methods in Neurochemistry, Vol. 3 (Ed. Rodnight R.), Plenum Press, New York, pp. 253-375.
170. Albers, R.W. and Brady, R.D. (1959), The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. J. Biol. Chem., 234, 926-928.
171. Lowry, H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951), Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
172. Aceves, C., Legarreta, G. and Valverde, C. (1982), Importancia del Radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. Veterinaria Mex., 13, 207-212.
173. Ruiz, J.A., Tovalín, A.A., Mora, B.R. and Valverde, C. (1964), Desarrollo y estandarización de un Radioinmunoanálisis para cuantificar T_3 reversa en suero humano y de bovinos. Rev. Invest. Clin., 36, 231-238.
174. Meisami, E. (1984), Complete recovery of growth deficits after reversal of PTU-induced postnatal hypothyroidism in the female rat: A model for catch-up growth. Life Sciences, 34, 1487-1496.
175. Lam, D.M.K. (1975), Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina. Cold Spring Harbor, S.Q.Biol., 50, 571-579.
176. Fisher, S.K. and Davies, W.E. (1976), GABA and its related enzymes in the lower auditory system of the guinea pig. J. Neurochem., 27, 1145-1155.
177. Anniko, M., Nordemar, H. and Van de Water, T.R. (1979),

Embryogenesis of the inner ear. I. Development and differentiation of mammalian cristae ampullaris in vivo and in vitro. Arch. Otorhinolaryngol., 224, 285-299.

178. Dememes, D., Dechesne, C., Legrand, Ch. and Sans, A. (1986), Effects of hypothyroidism on postnatal development in the peripheral vestibular system. Develop. Brain Res., 25, 147-152.

179. Favre, D. and Sans, A., (1979), Morphological changes in afferent hair cells synapses during postnatal development of the cat. J. Neurocytol., 8, 765-775.

180. Ginzberg, R.D. and Gilula, N.B. (1979), Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium. Dev. Biol., 68, 110-129.

181. Nakai, Y. (1970), The development of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the rabbit. Pract. Oto-Rhino-Laryngol. (Basel), 32, 268-278.

182. Sans, A. and Chat, M. (1982), Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography. J. Comp. Neurol., 206, 1-8.

183. Sans, A. and Dechesne, C.J. (1987), Afferent nerve ending development and synaptogenesis in the vestibular epithelium of human fetuses. Hearing Res., 28, 65-72.

184. Shneron, A., Devigne, C. and Pujol, R. (1982), Age-related changes in the C57BL/65 mouse cochlea. II. Ultrastructural findings. Dev. Brain Res., 2, 77-88.

185. Chandler, J.P. (1984), Light and electron microscopic studies of the basilar papilla in the duck *Anas platyrhynchos*. II. Embryonic development. J. Comp. Neurol., 222, 523-542.

186. Fermin, C.D. and Cohen, G.M. (1984), Developmental gradients in the embryonic chick's basilar papilla. *Acta Oto-Laryngol.*, 97, 39-51.
187. Hirokawa, N. (1978), Synaptogenesis in the basilar papilla of the chicken. *J. Neurocytol.*, 7, 283-300.
188. Carlier, E. and Pujol, R. (1978), Role of the inner and outer hair cells in coding sound intensity: An ontogenetic approach. *Brain Res.*, 147, 174-176.
189. Pujol, R. and Carlier, E. (1982), Cochlear synaptogenesis after sectioning the efferent bundle. *Dev. Brain Res.*, 3, 151-154.
190. Vázquez-Nin, G.H. and Sotelo, J.R. (1968), Electron microscopy study of the developing nerve terminals in the acoustic organs of the chick embryo. *Z. Zellforsch.*, 92, 325-338.
191. Heywood, P., Pujol, R. and Hilding, D.A. (1976), Development of the labyrinthine receptors in the guinea pig, cat and dog. *Acta Oto-Laryngol.*, 82, 359-367.
192. Favre, D. and Sans, A. (1977), Synaptogenesis of the efferent vestibular nerve endings of the cat. Ultrastructural study. *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.*, 215, 183-186.
193. Cohen, G.M. and Fermin, C.D. (1978), The development of hair cells in the embryonic chick's basilar papilla. *Acta Oto-Laryngol.*, 86, 342-358.
194. Hirokawa, N. (1977), Disappearance of afferent and efferent nerve terminals in the inner ear of the chick embryo after chronic treatment with bungarotoxin. *J. Cell. Biol.*, 73, 27-46.
195. Jones, D.G. and Eslami, H. (1983), An ultrastructural study

of the development of afferent and efferent synapses on outer hair cells of the guinea pig organ of Corti. *Cell Tissue Res.*, 231, 533-539.

196. Lenoir, M., Shnerson, A. and Pujol, R. (1980), Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat. Embryol.*, 160, 253-262.

197. Pujol, R., Carlier, E. and Lenoir, M. (1980), Ontogenetic approach to inner and outer hair cell function. *Hearing Res.*, 2, 423-430.

198. Rebillard, M. and Pujol, R. (1983), Innervation of the chicken basilar papillae during its development. *Acta Oto-Laryngol.*, 96, 379-388.

199. Nordemar, H. (1983), Embryogenesis of the inner ear. *Acta Otolaryngol.*, 96, 1-8.

200. Morreale, G., Obregón, M., Ruiz, M. and Escobar, F. (1988), Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinology*, 122, 1521-1531.

201. Prieto, J.J., Rueda, J., Sala, M.L. and Merchan, J.A. (1990), Lectin staining of saccharides in the normal and hypothyroid developing organ of Corti. *Dev. Brain Res.*, 52, 141-149.

202. Kalaria, R.N., Kotas, A.M., Prince, A.K., Reynolds, R. and Wong, P.T-H. (1981), Choline uptake and choline acetyltransferase in brain of developing rats made hypothyroid with propylthiouracil. In G. Pepeu and H. Ladinsky (Eds.), *Cholinergic mechanism*, Plenum Press, New York, pp. 73-83.

203. Ladinsky, H., Consolo, S., Peri, G. and Garattini, S. (1972),

Acetylcholine, choline and choline acetyltransferase activity in the developing brain of normal and hypothyroid rats. *J. Neurochem.*, 19, 1947-1952.

204. Patel, A., Hayashi, M. and Hunt, A. (1987), Selective persistent reduction in choline acetyltransferase activity in basal forebrain of the rat after thyroid deficiency during early life. *Brain Res.*, 422, 182-185.

205. Kalaria, R.N. and Prince, A.K. (1985), Effects of thyroid deficiency on the development of cholinergic, GABA, dopaminergic and glutamate neuron markers and DNA concentrations in the rat corpus striatum. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3, 655-666.

206. Jewett, D.L. and Romano, M.N. (1972), Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Res.*, 36, 101-115.

Vestibular site of action of hypothyroidism in the pigmented rat

Dora Acuña¹, Carmen Aceves², Brenda Anguiano² and Graciela Meza¹

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico D.F. (Mexico) and ²Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico D.F. (Mexico)

(Accepted 10 July 1990)

Key words: Vestibular sensory periphery; Vestibular glutamate decarboxylase; Vestibular choline acetyltransferase; Propyl-thio-uracil; Hypothyroidism; Vestibular efferent terminal

The vestibular cell type affected by congenital hypothyroidism (CH) was investigated by measuring the activity of glutamate decarboxylase (GAD) and choline acetyltransferase (ChAT), synthesizing enzymes of putative afferent (GABA) and efferent (acetylcholine, ACh) neurotransmitters and thus, respectively, hair cell I and II (HC-I, HC-II), and efferent terminal (ET) marker enzymes, in vestibular homogenates of control, congenitally hypothyroid rats (CHR) and in thyroxine-replaced CHR (CHR-T₄). Postnatal age ranged from 20 to 60 days old. In the vestibule, HC-II and its efferent cholinergic contacting bouton matured later than HC-I and its afferent cholinergic contacts, whereas HC-I-differentiation and its efferent synapse arrival are the latest events in vestibular maturation. The differential effect of CH upon GAD and ChAT in CHR could be anticipated. In control rats as in CHR the magnitude of GAD was the same with time starting on the 20th day. In CHR, ChAT gradually diminished beginning on day 25 to become 45% decreased with respect to control on the 60th postnatal day. Prevention of ChAT decrease in CHR by early administration of thyroxine (T₄) a striking diminution of T₄ and triiodothyronine (T₃) in CHR serum and a normal level of these hormones found in CHR-T₄ corroborated thyroid involvement. These results confirm the preference of hypothyroidism to affect cholinergic cell types (or compartments) of late maturation (HC-I-containing ET and hence 45% ChAT decrease) leaving HC-I, HC-II and HC-II-connecting ET untouched, supported by a 55% remnant ChAT and a constant GAD activity regardless of time and treatment.

INTRODUCTION

A deficiency of thyroid hormones during the neonatal period results in severe impairment of brain function. In the rat brain, the regions which undergo intense postnatal neurogenesis are more sensitive to thyroid hormone deprivation than those in which the former is essentially prenatal²⁵.

Previous studies have demonstrated that in the rat, severe congenital hypothyroidism induced by propyl-thio-uracil (PTU) results in absence of onset of cochlear function⁴⁶ and alterations in the organ of Corti⁴⁵. These effects were mainly mediated by a degeneration of efferent terminals contacting outer hair cells.

Vestibular hair cell localization of glutamate decarboxylase (GAD), α -aminobutyric acid (GABA) synthesizing enzyme, has been suggested because it becomes available very early in development in the efferent terminal-devoid vestibular sensory periphery, having already mature hair cells in chicks³⁰ and guinea pigs²⁶, and prevails in the periphery after frog eighth-nerve ablation, which causes efferent terminal degeneration²⁷. Recent immunocytochemical experiments rendered GABA-like reactivity in chick vestibular hair cells²⁴.

Cholinergic efferent neurotransmission and acetylcholine (ACh) enzyme of synthesis (choline acetyltransferase, ChAT) localization in vestibular efferent boutons is supported by developmental studies which showed that measurable ChAT activity in the vestibular guinea pig²⁰ and chick³⁰ sensory periphery started at the moment that the efferent terminal reached the neuroepithelium and increased when these terminals augmented in number^{20, 30}. Additionally, ChAT activity disappears in the periphery after efferent bouton-degeneration caused by frog eighth-nerve excision²⁷. Acetylcholinesterase (the ACh-degrading enzyme) as detected by cytochemical experiments can be demonstrated at the bottom of vestibular hair cells (HCs) where efferent connections reach the latter²⁴.

PTU-induced congenital hypothyroidism effect in the developing albino rat vestibule has been studied by morphological analyses of 4 postnatal ages between 1 and 35 days and it was concluded that hypothyroidism causes a delayed maturation of HC-I and its innervation leaving HC-II and its related synaptic contacts untouched⁷.

As GABA and ACh have a unique function in the vestibule, i.e. to serve as neurotransmitters (having so far no general metabolic involvement), their enzymes of synthesis (respectively GAD and ChAT) can be used as

markers of hair cell and efferent terminal integrity.

Therefore, in the present work, a longitudinal postnatal study measuring the activity of GAD (L-glutamate-1-carboxylase, EC 4.1.1.15) and of ChAT (Acetyl CoA: choline-o-acetyltransferase, EC 2.3.1.6) in vestibular homogenates of 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old normal and PTU-induced congenitally hypothyroid rats (CHR) was performed. The aim of these experiments was to observe a change in enzymatic activity (either GAD or ChAT) depending in the cell or compartment (hair cell or efferent terminal) which resulted affected by hypothyroidism.

To assess the involvement of thyroid hormones, thyroxine replaced CHR-derived vestibules (CHR-T₄) also underwent GAD and ChAT determinations and serum levels of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) were measured in all experimental groups. The present report describes the experiments performed and the results obtained.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted with Long-Evans pigmented rats bred in the laboratory. Three female rats were mated with a normal male breeder. The presence of a vaginal plug was considered the first day of pregnancy. Pregnant rats were housed individually 1 week prior to delivery and maintained on *ad libitum* access to food (Purina rat chow) and water. Constant temperature (22–26 °C) and a light-dark cycle of 12 h were maintained throughout experimentation time. Litters were restricted to 8–10 pups on the day following birth and they were left with their mother under the same conditions as their progenitors during experimentation time.

Hypothyroidism was induced in pups by administering to pregnant dams either 50 or 75 mg of 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) per day in their drinking water dissolved in a volume per day, per rat that was previously assessed. PTU treatment was initiated on day 17 of gestation and continued in the offspring after weaning until they were sacrificed; pups from untreated mothers served as controls.

To assess the involvement of thyroid hormones, some PTU-treated pups received intramuscular injections of L-thyroxine beginning on day 12 after birth which is the critical period for vestibular development¹⁶. The dose of hormone administered each day depended on the age of the animal and it was calculated from the data of Vigouroux on the developmental of thyroid function in the rat¹⁶.

To determine the effect of hypothyroidism on the general health state of the animals weight gain was followed in control, CHR and thyroxine-replaced CHR (CHR-T₄). To avoid effects due to malnutrition, after weaning hypothyroid animals were hand-fed with the same diet as their experimental co-mates but ground and resuspended in tepid water. Control and CHR-T₄ animals were allowed an *ad libitum* diet.

Animals of each group were sacrificed at 20, 28, 38, 50 and 60 days of postnatal age by decapitation followed by a rapid dissection of auditory bullae and extraction of the whole membranous vestibule at already described²⁷. Homogenization was performed in a suitable medium to measure either GAD or ChAT.

Glutamic acid decarboxylase assay

GAD was quantified in triplicate samples of 8 pooled vestibules (approximately 40 µg protein each) by the radiochemical method described by Albers and Brady²⁸, with minor modifications already reported by our group for vestibular tissue²⁷.

Choline acetyltransferase assay

ChAT activity was determined in triplicate samples of 8 pooled vestibules (approximately 40 µg protein each) by a slightly modified radiochemical method^{29,31} previously described for the chick³¹ and frog²⁹ vestibule.

Radioactivity was measured in a Packard Tricarb Scintillation Spectrometer.

Protein measurement. Protein content was determined by the method of Lowry et al using bovine serum albumin as standard³².

Serum collection. Every time that control, CHR or CHR-T₄ animals were sacrificed, trunk blood was collected after decapitation, let stand until the clot became retracted. Then it was separated from the serum by centrifugation at 3000 rpm for 20 min and decanted. It was stored at -20 °C until hormone assays (duplicate) were performed.

Total serum T₄ and T₃ content. Serum total thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) were assayed by a specific radioimmunoassay method (RIA) previously described³³. Each hormone was quantified in all samples within the same RIA. The intra- and interassay coefficients of variations were 8.6 and 10.5% for T₄ and 9.0 and 12.8% for T₃. The sensitivity limit for each RIA was 0.25 µg/dl for T₄ and 10.0 ng/dl for T₃.

Materials

[1-¹⁴C]-L-glutamic acid, [²⁵I]thyroxine and [¹²⁵I]triiodothyronine were from New England Nuclear, Boston, MA (U.S.A.). [³H]acetyl-coenzyme A and hyamine hydroxide were purchased from Amersham, IL (U.S.A.). Eserine sulfate, tetraphenylboron, 5-acetyl-coenzyme A, ethylen-diamine-tetraacetic acid (EDTA), choline chloride, Triton X-100, 2,5'-diphenylazoarol (PPO), 1,1-[bis 2(5-phenyloxazoly) benzene] (POPOP), bovine serum albumin, pyridoxal phosphate, 2-mercapto-ethanol, L-glutamic acid, 6-n-propyl-2-thiouracil and non-radioactive iodothyronines were obtained from Sigma, St. Louis, MO (U.S.A.). Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem, La Jolla, CA (U.S.A.). NaCl from Mallinkrodt (Mexico). Toluene and H₂SO₄ were provided by J.T. Baker (Mexico). Acetonitrile, potassium and sodium phosphate from Merck (Mexico).

RESULTS

GAD activity of vestibular homogenates in control rats whose ages were 20, 28, 38, 50 and 60 days after birth was of 16.4 ± 0.43, 16.1 ± 0.61, 17.5 ± 0.57, 17.6 ± 0.62 and 17.2 ± 0.29 nmol/mg protein/h, respectively (Table I). This range is of the same magnitude as that obtained for GAD activity in rat retina²⁴ and nervous tissue¹¹. ChAT activity in vestibular homogenates of 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old control rats was of, respectively, 692.0 ± 9.3, 691.0 ± 11.8, 699.0 ± 10.5, 707.0 ± 21 and 720.0 ± 6.9 pmol/mg protein/min (Table I). These values are of the same magnitude as those reported for retina²⁴ and nervous tissue¹¹ for the homologous enzyme. At previous ages, starting on the 13th day postnatal (results not shown) GAD activity was found to be essentially of the same level and properties as that encountered on day 20 of postnatal age whereas ChAT was found to rise its level on the 17th day attaining a constant activity and characteristics from the 20th postnatal day thereafter.

In CHR, vestibular GAD activity was of the same magnitude as in control rats and remained of the same values as long as day 60 after birth, values being: 15.4 ±

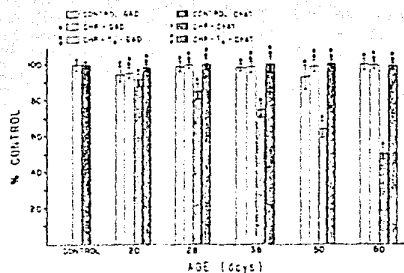


Fig. 1. Effect of neonatal thyroid deficiency on ChAT and GAD activities in vestibular homogenates of pigmented rats expressed as percent of control value of either enzyme. Each column is the mean of 4 experiments with S.E.M. indicated by the bar. Significant differences ($P < 0.01$) between ChAT activity of group control and PTU are evident. Significant differences ($P < 0.01$) between ChAT activity from PTU group were as follows: day 20 vs day 38, day 20 vs day 50, day 20 vs day 60, day 28 vs day 50, day 28 vs day 60, day 38 vs day 60. Values of control GAD and ChAT between all groups were not significant, neither were GAD values within all experimental groups. Data were statistically analyzed by the Tukey HSD test using a SYSTAT statistical package.

0.56, 15.8 ± 0.4 , 17.1 ± 0.29 , 16.9 ± 0.37 and 17.1 ± 0.1 in, respectively, 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rats, which represented as percentages of the control value (Fig. 1) are 93.9, 98.1, 97.7, 96 and 99.4% respectively.

In contrast, ChAT activity showed a gradual drop along time in vestibules of CHR, i.e. 633.0 ± 6.3 , 588.0 ± 15.8 , 536.0 ± 12.7 , 453.0 ± 15.6 and 394.0 ± 7.9 pmol/mg protein/min, in respectively 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rats (Fig. 1). This represents, with respect to control ChAT activity, a decrease of 9, 15, 23, 36 and 45% for the above cited ages.

The involvement of thyroid hormones in this effect was

TABLE I

GAD and ChAT activity in vestibular homogenates of normal pigmented rats

Figures represent GAD (nmol/mg protein/h) or ChAT (pmol/mg protein/min) activity of averaged triplicate samples \pm S.E.M. for the number of experiments shown in parentheses.

Day	Enzyme	Control
20	GAD	16.4 ± 0.43 (4)
	ChAT	692.0 ± 9.3 (4)
28	GAD	16.1 ± 0.61 (4)
	ChAT	691.0 ± 11.8 (4)
38	GAD	17.5 ± 0.57 (4)
	ChAT	699.0 ± 10.5 (4)
50	GAD	17.6 ± 0.62 (4)
	ChAT	707.0 ± 21 (4)
60	GAD	17.2 ± 0.29 (4)
	ChAT	720.6 ± 6.9 (4)

TABLE II

Total serum levels of T_3 and T_4 in control CHR and CHR- T_4

Dams received 50 mg PTU per day except for day 38 which were given 75 mg daily. Values are ng/dl (T_3) and μ g/dl (T_4) of averaged duplicate values \pm S.E.M. for the number of experiments shown in parentheses, n.d., not detected. Significant differences between mean values of the control and experimental groups are indicated by asterisks. Values within control or CHR- T_4 and between control and CHR- T_4 are not statistically significant. Data were statistically analyzed by the Tukey HSD test using a SYSTAT statistical package.

Day	Hormone	Control	Chr	Chr- T_4
20	T_3	95.0 ± 7.1 (4)	11.7 ± 0.47 (4)*	83.3 ± 2.7 (4)
	T_4	2.8 ± 0.12 (4)	n.d.	2.1 ± 0.04 (4)
28	T_3	113.0 ± 2.3 (4)	18.2 ± 1.3 (4)*	84.0 ± 1.6 (4)
	T_4	3.1 ± 0.08 (4)	n.d.	2.2 ± 0.05 (4)
38	T_3	98.5 ± 5.7 (4)	23.5 ± 1.5 (4)*	85.5 ± 4.8 (4)
	T_4	2.7 ± 0.07 (4)	0.3 ± 0.009 (4)*	2.28 ± 0.06 (4)
50	T_3	95.0 ± 3.1 (4)	22.5 ± 1.27 (4)*	89.5 ± 6.7 (4)
	T_4	3.6 ± 0.18 (4)	0.25 ± 0.011 (4)*	2.5 ± 0.14 (4)
60	T_3	92.0 ± 3.5 (4)	21.7 ± 1.6 (4)*	88.5 ± 3.3 (4)
	T_4	2.1 ± 0.12 (4)	0.28 ± 0.012 (4)*	2.3 ± 0.14 (4)

* $P < 0.01$.

corroborated when the observed decrease of ChAT activity in CHR was prevented by early administration of thyroxine, thus ChAT activity in CHR- T_4 was 650.0 ± 7.8 , 687.0 ± 18.2 , 701.0 ± 14 , 705.0 ± 14.7 and 694.0 ± 10 in, respectively, 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rat vestibule. As in CHR, GAD activity in CHR- T_4 did not suffer any modification throughout the experimentation time, values being: 15.6 ± 0.35 , 16.4 ± 0.38 , 16.8 ± 0.58 , 17.2 ± 0.55 and 17.6 ± 0.23 in, respectively, 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rats (Fig. 1).

Total serum (TS) values for T_3 and T_4 in control CHR and CHR- T_4 are shown in Table II. TS- T_3 content in control rats whose ages were 20, 28, 38, 50 and 60 days after birth was of 95.0 ± 7.1 , 113.0 ± 2.3 , 98.5 ± 5.7 , 95.0 ± 3.1 and 92.0 ± 3.5 ng/dl, respectively. This TS- T_3 content in control rats is similar to values reported previously by other laboratories¹⁶.

TS- T_4 content in control rats of 20, 28, 38, 50 and 60 days old was of, respectively, 2.8 ± 0.12 , 3.1 ± 0.08 , 2.7 ± 0.07 , 3.6 ± 0.18 and 2.1 ± 0.12 μ g/dl. These values are of the same magnitude as reported by other laboratories¹⁶.

TS- T_3 and TS- T_4 values in CHR were found to diminish along time. In CHR the values of TS- T_3 were 11.7 ± 0.47 , 18.2 ± 1.3 , 23.5 ± 1.5 , 22.5 ± 1.27 and 21.7 ± 1.6 ng/dl in respectively, 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rats. In CHR the values of TS- T_4 could not be detected in 20- and 28-day-old rats; values being 0.3 ± 0.009 μ g/dl in 38-day-old rats, 0.25 ± 0.011 μ g/dl in 50-day-old rats and 0.28 ± 0.012 μ g/dl in 60-day-old rats.

In CHR- T_4 the serum levels of T_3 and T_4 were

essentially of the same magnitude as in control rats along age, i.e. the TS-T₃ content in CHR-T₄ was 83.3 ± 2.7 , 84.0 ± 1.6 , 85.5 ± 4.8 , 89.5 ± 6.7 and 88.5 ± 3.3 ng/dl in, respectively, 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rats. TS-T₄ content in CHR-T₄ of 20-, 28-, 38-, 50- and 60-day-old rats was of, respectively, 2.1 ± 0.04 , 2.2 ± 0.08 , 2.28 ± 0.06 , 2.5 ± 0.14 and 2.3 ± 0.14 µg/dl.

Follow up of weight gain, as an assessment of the general health state of animals (results not shown) behaved essentially as earlier reports²⁵ throughout experimentation time, i.e. up to the 10th to 14th day after birth, differences in physical appearance and body weights between the hypothyroid and the normal control groups were not apparent. Thereafter, the body weights of hypothyroid animals increased strikingly less than those of controls. At 22 days of age characteristics were similar to those that have been described in the literature for the cretinoid rat. The animals of the hypothyroid group which received injections of L-thyroxine were indistinguishable from normal controls in terms of general appearance and body weight.

DISCUSSION

The cell type or compartment affected by hypothyroidism was studied by assessing the enzymes of synthesis of putative afferent or efferent neurotransmitters (and respective postulated markers of hair cell and efferent boutons) in the vestibular sensory periphery, GAD for GABA and ChAT for acetylcholine.

In normal rats, these enzymes do not change starting on postnatal day 20, implying that their respectively containing cell types are essentially mature at this age. These findings (and the ones of previous ages) corroborate earlier results and interpretations in the developing chick vestibule³⁰ and in embryonic guinea pig vestibular cristae²⁰ in which GAD and ChAT levels showed an asymmetrical development which correlated well with early maturation of hair cells and a late appearance of efferent boutons, as followed by morphological electron microscopy studies^{17,30}.

Those earlier results led us to choose rats from the 20th postnatal day and thereafter to analyze the effects of CH on GAD and ChAT activity, whose changes could be attributed to CH and not to developmental variations of both enzymes. Thus, when we measured GAD activity in CHR we found that this enzyme remained constant, as it was in control animals, from day 20 to day 60 after birth suggesting that GAD might be confined to a cell element (or compartment) that did not suffer any alteration with the treatment of PFT; this could well be the hair cell. In contrast, ChAT activity was found to decline in hypothyroid rats in a fashion that can be correlated to an action

of cholinergic efferent terminals of late maturation. The participation of thyroid hormones in these effects was corroborated when this decline in ChAT activity was prevented by critical-period-thyroxine treatment of the pups. Similarly, hormone values along time in normal, CHR and CHR-T₄ sera were as expected and corresponded to those reported in the literature¹⁶.

It is known that, in the rat, thyroid function starts relatively late (on the 18th day of gestation). The rapid increase of thyroid hormone level with a peak at the beginning of the 3rd postnatal week³⁰ coincides with an important phase in the morphological and functional development of the vestibular receptors. During this phase the cellular differentiation and synaptogenesis which start a few days before birth, become particularly intense³¹. Consequently, a possible role of thyroid hormones in vestibular development (at least for some cellular population) during this period might be suspected.

A morphological study on the effects of congenital hypothyroidism on the maturation of vestibular ganglia and sensory cell, and particularly on the innervation of the latter performed in rats has been reported⁷. In that study, hypothyroid rat pups showed no apparent differences with controls in either HC-II or at the level of its synaptic contacts as early as in 14-day-old pups. Thus, the maturation of the HC-II and its innervation appears not to be affected by hypothyroidism which conforms well with our biochemical findings. In contrast, the same morphological report describes that the vestibule of CHR of postnatal day 33, present well recognizable type I and II hair cells, the former showing some immature features, especially that of efferent boutons, hence our interpretation of decrement of ChAT activity being due to affected HC-I efferent contacts of late maturation. This latter interpretation is well documented in the literature originated in morphological studies of normal vestibular development in vestibular and in auditory organs showing an early and asymmetrical development of hair cells and its corresponding innervation. These morphologic observations in the vestibule describe an early maturation of type II hair cells, which is followed by that of type I hair cells and by an early formation of afferent synapses on the two types of cells in the same sequence^{5,7,9,14,33,41-43}. In the auditory periphery, the asymmetric development of short hair cells is followed by tall hair cells in the chick basilar papillae^{5,10,19} and outer hair cells develop prior to inner hair cells in the mammalian cochlea³⁷.

As to efferent innervation, a late appearance of efferent endings in the vestibule has been inferred by several authors. In those studies, either very early stages were examined in which efferent boutons were not yet present⁴⁰ or the endings were not followed after birth^{17,35}. However, efferent endings have been observed in

other studies^{8,17}, and late efferent-bouton synaptogenesis has been described for auditory organs^{5,6,10,18, 21,26,37-39,43}. A controversial study which reports this difference not being found in the mouse vestibule might show, however, a species characteristic^{34,35}.

On the basis of the above discussion, as maturation of the HC-II and its innervation is practically achieved at birth, it is not surprising that, both HC-II and their contacting efferent boutons escape the morphogenetic action of thyroid hormone implying that, for their maturation, they rely in maternal thyroid hormones rather than on fetal ones, as has been recently described for nervous tissue³²; hence, our findings of unmodified GAD in both hypothyroid and CHR-T₄ rats and a remnant of a 55% of ChAT activity.

In our results of CHR, ChAT activity starts decreasing, from normal values at 20 days old, at about the 28th postnatal day. Related to this, a similar vestibular effect of hypothyroidism to that occurring at the cochlea in the CHR might be postulated, i.e. in the organ of Corti, outer hair cell-contacting efferent boutons (of known cholinergic nature) are established, but later retract and degenerate due to the accumulation of amorphous material⁴⁷. In a later study, this material was found to be a mannose and sialic acid-containing polysaccharide³⁶. A similar mode of action in the vestibule, as yet undocumented, awaits experimentation.

REFERENCES

- 1 Aceves, C., Legarreta, G. and Valverde, C., Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos, *Veterinaria Mex.*, 13 (1982) 207-212.
- 2 Albers, R.W. and Brady, R.D., The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 926-928.
- 3 Anniko, M., Nordemar, H. and Van De Water, T.R., Embryogenesis of the inner ear. I. Development and differentiation of mammalian cristae ampullaris in vivo and in vitro, *Arch. Otorhinolaryngol.*, 224 (1979) 285-299.
- 4 Carlier, E. and Pujol, R., Role of the inner and outer hair cells in coding sound intensity: an ontogenetic approach, *Brain Research*, 147 (1978) 174-176.
- 5 Chandler, J.P., Light and electron microscopic studies of the basilar papilla in the duck *Anas platyrhynchos*. II. Embryonic development, *J. Comp. Neurol.*, 222 (1984) 523-542.
- 6 Cohen, G.M. and Fermin, C.D., The development of hair cells in the embryonic chick's basilar papilla, *Acta Oto-Laryngol.*, 86 (1978) 342-358.
- 7 Dememes, D., Dechesne, C., Legrand, Ch and Sans, A., Effects of hypothyroidism on postnatal development in the peripheral vestibular system, *Develop. Brain Res.*, 25 (1986) 147-152.
- 8 Favre, D. and Sans, A., Synaptogenesis of the efferent vestibular nerve endings of the cat. Ultrastructural study, *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.*, 215 (1977) 183-186.
- 9 Favre, D. and Sans, A., Morphological changes in afferent hair cells synapses during postnatal development of the cat, *J. Neurocytol.*, 8 (1979) 765-775.
- 10 Fermin, C.D. and Cohen, G.M., Developmental gradients in the embryonic chick's basilar papilla, *Acta Oto-Laryngol.*, 97 (1984)

Our observations, when discussed on the grounds of some brain developmental studies in hypothyroid animals, where ChAT and GAD (and some other GABAergic parameters) as well as tyrosine hydroxylase were measured, the only enzyme affected was the former in the majority of the cases with an undiscussed partial effect (i.e. a 45% decrease) as we have seen in the vestibule. This implies that vestibular GABAergic and cholinergic cells show a very similar developmental pattern as in the brain^{22,23}. This also explains that in spite of their apparent immaturity, GABAergic vestibular HC-I are not affected in hypothyroidism.

In conclusion, the results presented in this paper confirm the preference of hypothyroidism to affect cholinergic cell types (or compartments) or late maturation (HC-I-contacting efferent boutons) and hence the observed 45% ChAT decrease, leaving untouched hair cell I and II supported by a constant GAD level, regardless of time and treatment and 55% of remaining ChAT localized in efferent origin boutons connecting HC-II.

Acknowledgements. The authors are indebted to Dr. Beatriz Villa DVM for her guidance in animal care and breeding, to M.Sc. Ivan López for implementation and performance of dissection procedures, to M. Psic. José Luis Jurado for help in the statistical analyses and to Miss Yolanda Díaz de Castro for secretarial assistance. D.A. was partially supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología M.Sc. Thesis Fellowship.

- 39-51.
- 11 Fisher, S.K. and Davies, W.E., GABA and its related enzymes in the lower auditory system of the guinea pig, *J. Neurochem.*, 27 (1976) 1145-1155.
- 12 Fonnum, F., A rapid radiochemical method for determination of choline acetyltransferase, *J. Neurochem.*, 24 (1975) 407-409.
- 13 Fonnum, F., Radiochemical assays for choline acetyltransferase. In R. Rodnight (Ed.), *Research Methods in Neurochemistry*, Vol. 3, Plenum, New York, 1975, pp. 253-275.
- 14 Ginzberg, R.D. and Gilula, N.B., Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst: sensory epithelium, *Develop. Biol.*, 68 (1979) 110-129.
- 15 Ginzberg, R.D. and Gilula, N.B., Synaptogenesis in the vestibular sensory epithelium of the chick embryo, *J. Neurocytol.*, 9 (1980) 405-424.
- 16 Hebert, R., Langlois, J.M. and Dussault, J.H., Permanent defects in rat peripheral auditory function following perinatal hypothyroidism: determination of a critical period, *Develop. Brain Res.*, 23 (1985) 161-170.
- 17 Heywood, P., Pujol, R. and Hiding, D.A., Development of the labyrinthine receptors in the guinea pig, cat and dog, *Acta Oto-Laryngol.*, 82 (1976) 359-367.
- 18 Hirokawa, N., Disappearance of afferent and efferent nerve terminals in the inner ear of the chick embryo after chronic treatment with bungarotoxin, *J. Cell Biol.*, 73 (1977) 27-46.
- 19 Hirokawa, N., Synaptogenesis in the basilar papilla of the chicken, *J. Neurocytol.*, 7 (1978) 283-300.
- 20 Iurbe, A.G. and Meza, G., Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule, *Int. J. Dev. Neurosci.*, Suppl. 4, 4 (1986) 532.
- 21 Jones, D.G. and Eslami, H., An ultrastructural study of the development of afferent and efferent synapses on outer hair cells of the guinea pig organ of Corti, *Cell Tissue Res.*, 231 (1983)

- 533-539.
- 22 Kalaria, R.N., Kotas, A.M., Prince, A.K., Reynolds, R. and Wong, P.T., Choline uptake and choline acetyltransferase in brain of developing rats made hypothyroid with propylthiouracil. In G. Pepeu and H. Ladinisky (Eds.), *Cholinergic Mechanism*, Plenum, New York, 1981, pp. 73-83.
 - 23 Kalaria, R.N. and Prince, A.K., Effects of thyroid deficiency on the development of cholinergic, GABA, dopaminergic and glutamate neuron markers and DNA concentrations in the rat corpus striatum, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3 (1985) 655-666.
 - 24 Lam, D.M.K., Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina, *Cold Spring Harbor, S.Q. Biol.*, 50 (1975) 571-579.
 - 25 Legrand, J., Morphological and biochemical effects of hormones on the developing nervous system in mammals. In S.R. Berenberg (Ed.), *Brain Fetal and Infant*, Martinus Nijhoff, The Hague, 1977, pp. 137-164.
 - 26 Lenoir, M., Shnerson, A. and Pujol, R., Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis, *Anat. Embryol.*, 160 (1980) 253-262.
 - 27 López, I. and Meza, G., Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule, *Neuroscience*, 25 (1988) 13-18.
 - 28 Lowry, H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
 - 29 Meisami, E., Complete recovery of growth deficits after reversal of PTU-induced postnatal hypothyroidism in the female rat: a model for catch-up growth, *Life Sci.*, 34 (1984) 1487-1496.
 - 30 Meza, G. and Hinojosa, R., Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitter in the chick vestibule, *Hearing Res.*, 28 (1987) 73-85.
 - 31 Meza, G., López, I. and Ruiz, M., Possible cholinergic neurotransmission in the crista ampullares of the chick inner ear, *Neurosci. Lett.*, 49 (1984) 93-98.
 - 32 Morreale, G., Obregón, M., Ruiz, M. and Escobar, F., Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency, *Endocrinology*, 122 (1988) 1521-1531.
 - 33 Nakai, Y., The development of the sensory epithelium of the crista ampullares in the rabbit, *Pract. Oto-Rhino-Laryngol.*, 32 (1970) 268-278.
 - 34 Nordemar, H., Embryogenesis of the inner ear, *Acta Otolaryngol.*, 96 (1983) 1-8.
 - 35 Nordemar, H., Postnatal development of the vestibular sensory epithelium in the mouse, *Acta Otolaryngol.*, 96 (1983) 447-456.
 - 36 Prieto, J.J., Rueda, J., Sala, M.L. and Merchan, J.A., Lectin staining of saccharides in the normal and hypothyroid developing organ of Corti, *Develop. Brain Res.*, 52 (1990) 141-149.
 - 37 Pujol, R. and Carlier, E., Cochlear synaptogenesis after sectioning the efferent bundle, *Develop. Brain Res.*, 3 (1982) 151-154.
 - 38 Pujol, R., Carlier, E. and Lenoir, M., Ontogenetic approach to inner and outer hair cell function, *Hear. Res.*, 2 (1980) 423-430.
 - 39 Rebillard, M. and Pujol, R., Innervation of the chicken basilar papillae during its development, *Acta Oto-Laryngol.*, 96 (1983) 379-388.
 - 40 Ruiz, J.A., Tovalin, A.A., Mora, B.R. and Valverde, C., Desarrollo y estandarización de un radioinmunoanálisis para cuantificar T₃ reversa en suero humano y de bovinos, *Rev. Invest. Clin. (Mex.)*, 36 (1984) 231-238.
 - 41 Sans, A. and Chat, M., Analysis of temporal and spatial patterns of rat vestibular hair cell differentiation by tritiated thymidine radioautography, *J. Comp. Neurol.*, 206 (1982) 1-8.
 - 42 Sans, A. and Dechesne, C.J., Afferent nerve ending development and synaptogenesis in the vestibular epithelium of human fetuses, *Hear. Res.*, 28 (1987) 65-72.
 - 43 Shnerson, A., Devigne, C. and Pujol, R., Age-related changes in the C57BL/65 mouse cochlea. II. Ultrastructural findings, *Develop. Brain Res.*, 2 (1982) 77-88.
 - 44 Usami, S., Igarachi, M. and Thompson, G., GABA-like immunoreactivity in the chicken vestibular endorgans, *Brain Res.*, 418 (1987) 383-387.
 - 45 Uziel, A., Gabrion, J., Ohresser, M. and Legrand, Ch., Effects of hypothyroidism on the structural development of the organ of Corti in the rat, *Acta Otolaryngol.*, 92 (1981) 469-480.
 - 46 Uziel, A., Marot, M. and Rabie, A., Corrective effects of thyroxine on cochlear abnormalities induced by congenital hypothyroidism in the rat. II. Electrophysiological study, *Develop. Brain Res.*, 19 (1985) 123-127.
 - 47 Uziel, A., Pujol, R., Legrand, Ch. and Legrand, J., Cochlear synaptogenesis in the hypothyroid rat, *Develop. Brain Res.*, 7 (1983) 295-301.
 - 48 Uziel, A., Rabie, A. and Marot, M., The effect of hypothyroidism on the onset of cochlear potentials in developing rats, *Brain Research*, 182 (1980) 172-175.
 - 49 Vázquez-Nin, G.H. and Sotelo, J.R., Electron microscopy study of the developing nerve terminals in the acoustic organs of the chick embryo, *Z. Zellforsch.*, 92 (1968) 325-338.
 - 50 Vigouroux, E., Dynamic study of postnatal thyroid function in the rat, *Acta Endocrinol.*, 83 (1976) 752-762.