

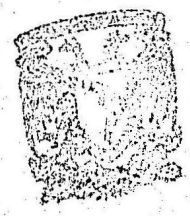
2 E. No. 60



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"ACTIVIDAD DE COLINACETILTRANSFERASA DEL VESTIBULO DEL POLLO Y SU POSIBLE LOCALIZACION CELULAR"



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

## T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

IVAN AXEL LOPEZ BAJONERO

México, D. F.

1984



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 esta 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.

Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente	Prof.	<u>GRACIELA MEZA RUIZ</u>
Vocal	"	<u>LUIS FELIPE ABREU HERNANDEZ</u>
Secretario	"	<u>JESUS HERNANDEZ FALCON</u>
1er. Suplente	"	<u>VICTOR MANUEL LOYOLA VARGAS</u>
2do. Suplente	"	<u>RUBEN VARELA TORRES</u>

Sitio donde se desarrolló el tema:

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, UNAM.

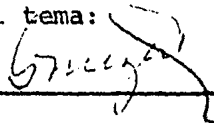
Nombre completo y firma del sustentante:

IVAN AXEL LOPEZ BAJONERO



Nombre completo y firma del asesor del tema:

GRACIELA MEZA RUIZ



**A MIS PADRES.**

**A MIS HERMANOS**

**A MIS AMIGOS**

**A MIS MAESTROS;**

**Con cariño y respeto.**

Agradezco a la M. en C. Graciela Meza Ruiz por su constante apoyo e interés durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mariano Ruiz, por la implementación y ejecución de las técnicas de disección usadas en este trabajo.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Otoneurobio -  
química, Departamento de Neurociencias, Centro de Investiga  
ciones en Fisiología Celular, UNAM.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,  
el apoyo financiero parcial de este trabajo aportado a tra  
vés del donativo PCCBNA-001891.

Estamos muy reconocidos a la Dra. Amelia Samano Bishop por permitirnos usar la incubadora del Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM y el Dr. Enrique Pedernera - por toda la ayuda prestada.

## I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	26
RESULTADOS.....	34
DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	45



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

Se ha visto que la neurotransmisión en la periferia sensorial del sistema vestíbulo-auditivo en los vertebrados es de naturaleza química y que el neurotransmisor eferente es probablemente la acetilcolina.

Nosotros hemos escogido como modelo las crestas aisladas -- del oído interno del pollo en el que, por microscopía electrónica, hemos encontrado conexiones de tipo eferente, por lo que quisimos averiguar si estas terminales eran colinérgicas. Para ello nos propusimos investigar si existía actividad de colin acetiltransferasa (CAT), la enzima que sintetiza a la acetilcolina y -- si esta enzima presentaba propiedades semejantes a las observadas en tejido nervioso ya que se le ha considerado un marcador -- específico de neuronas colinérgicas; además se ha observado que la actividad de este enzima presenta características similares -- en el Sistema Nervioso de diferentes especies localizándose en -- las terminales sinápticas. Para estudiar su posible localización celular aprovechamos que se conoce la embriogénesis del oído interno del pollo y que por estudios morfológicos se sabe que las fibras nerviosas eferentes alcanzan el epitelio sensorial -- muy tardíamente en el desarrollo embrionario; por tanto se midió la actividad de la CAT en tejido vestibular proveniente de embrión de pollo durante diversos estadios de la embriogénesis pa-

ra ver si existía alguna correlación entre la aparición de estas fibras y la actividad de la enzima. En este trabajo se relatan los experimentos efectuados con tal objetivo y los resultados en contrados.

## SISTEMA VESTIBULO-AUDITIVO

El sistema vestibulo-auditivo se considera dividido, desde el punto de vista descriptivo, en los siguientes segmentos: oído externo, oído medio, oído interno, nervio coclear y las vías en el Sistema Nervioso Central (figura 1).

El oído externo comprende a su vez dos porciones, una parte externa más o menos dilatada en forma de concha: la oreja o pabellón del oído y una parte interna que constituye la continuación de aquella y adopta la forma de un conducto más o menos cilíndrico, el conducto auditivo externo (Testut, L. 1966).

El oído medio está formado por una serie de cavidades la caja del tímpano que contiene la cadena de huesecillos (el martillo que se fija a la membrana del tímpano y se articula con el yunque que a su vez está unido al estribo) y las meninges en la región temporal, estos elementos están separados del conducto auditivo externo por la membrana del tímpano. La caja timpánica y la rinofaringe se unen por un conducto cartilaginoso, llamado trompa de Eustaquio (Murray, B.L. 1974).

El oído interno que tiene una función doble se compone de un laberinto membranoso alojado dentro de un laberinto óseo.

En la figura 2 se muestra el laberinto membranoso formado principalmente por la cóclea, los tres canales semicirculares y dos cámaras grandes que se llaman utrículo y sáculo.

Como parte del oído interno se encuentra el origen de la -

rama coclear del nervio auditivo, encargado de recibir y transmitir a la corteza cerebral las impresiones acústicas propiamente dichas y además, el origen de la rama vestibular del mismo nervio, que conduce hacia los centros superiores las impresiones del equilibrio.

El nervio coclear o nervio acústico, desde su emergencia al nervio cocleovestibular, se acompaña de los nervios facial e intermediario situados en el conducto auditivo interno, en posición anterior y superior con respecto a aquel.

Los tractos vestibulares se forman de vías suprasegmentarias distribuidas por el tronco cerebral, la médula espinal y el cerebelo.

Las fibras que proceden de los receptores del conducto semicircular anterior y de los laterales a las del utrículo, tienen sus cuerpos celulares en la parte superior, mientras que las que proceden del conducto semicircular posterior y del sáculo los tienen en la porción inferior (Noback, C. 1980).

Desde el punto de vista fisiológico, se sabe que el oído desempeña dos funciones diferentes: la audición y el equilibrio.

**Audición:** Las vibraciones sonoras son captadas y amplificadas por el conducto auditivo externo y transmitidas a la membrana timpánica y a la cadena de huesecillos, los cuales se encuentran comunicados a diversos líquidos contenidos en la porción coclear del oído interno. El movimiento vibratorio es captado-

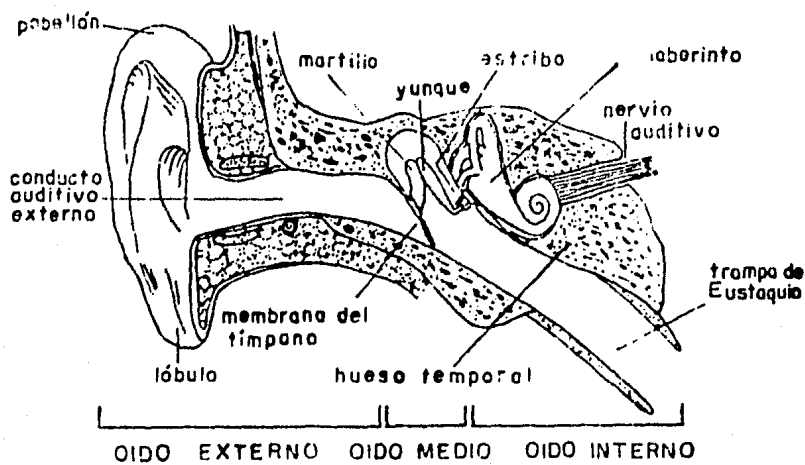
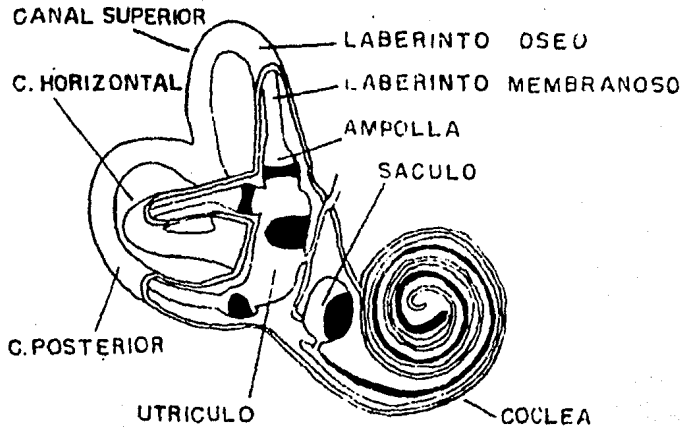


FIGURA 1. Esquema que representa el oído humano (las vías ves-  
tibulo-auditivas no aparecen en la figura) (Ham, --  
A.W. 1975).



**FIGURA 2.** Diagrama de los órganos que componen el oído interno (en la figura los sitios en negro representan la porción sensorial) (Hudspeth, A.J. 1983).

por las células pilosas que conforman el epitelio sensorial del-  
órgano de Corti lo que desencadena un potencial bioeléctrico que  
se transmite al Sistema Nervioso Central.

Equilibrio: El aparato vestibular es el órgano que recibe -  
información sensorial necesaria para el mantenimiento del equili-  
brio.

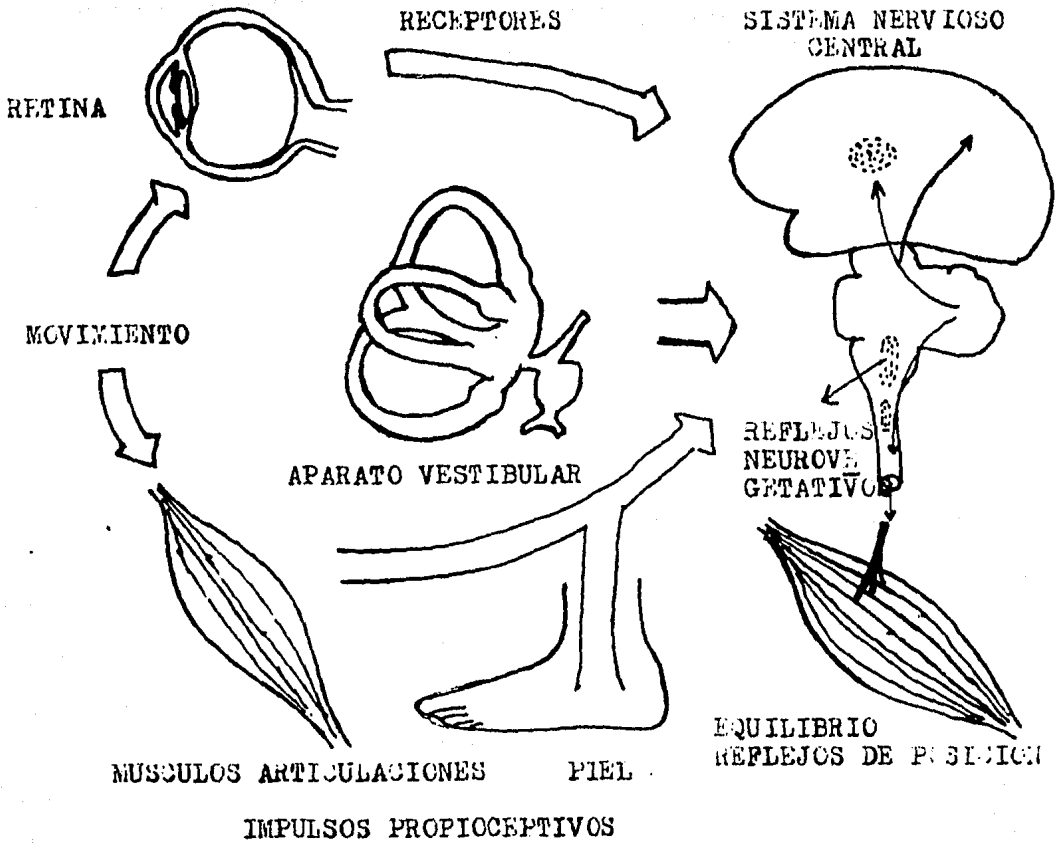
El estudio de las funciones vestibulares resulta difícil, -  
pues el aparato vestibular no es sino una de las fuentes de infor-  
mación que utiliza el sistema de mantenimiento del equilibrio y-  
orientación. Este sistema es multimodal, es decir, también reci-  
be información del sentido de la vista y de receptores somáticos  
(figura 3).

En el vestíbulo existen dos clases de receptores, los órga-  
nos otolíticos que responden a movimientos lineales de la cabeza  
y a la aceleración de la gravedad y los canales semicirculares -  
que responden a cambios angulares de la misma.

Estos órganos otolíticos en forma de saco denominados utrí-  
culo y sáculo contienen un epitelio sensorial que está formado -  
por células especializadas en la mecanorecepción (células pilo-  
sas sensitivas) que constituyen la mácula (figura 4).

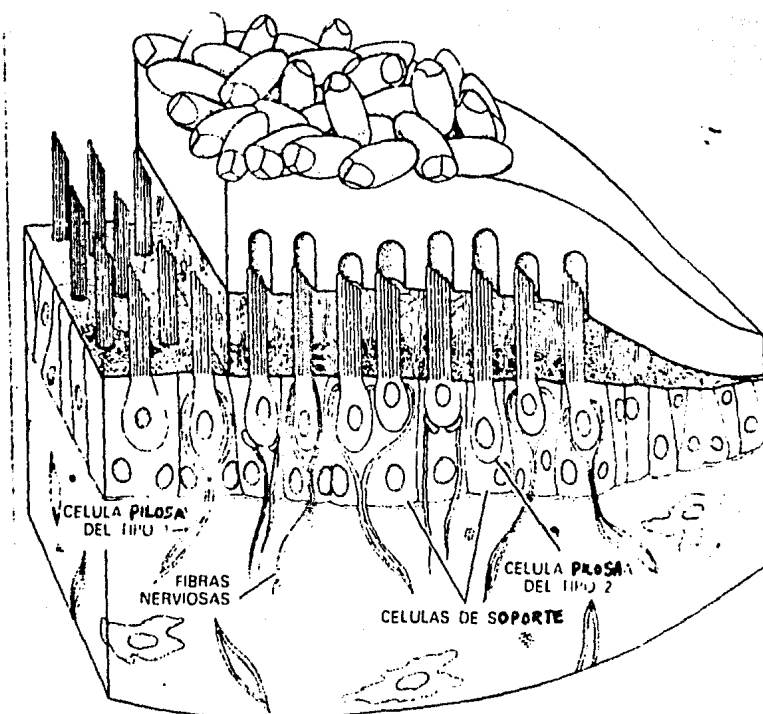
En el utrículo, la mácula se encuentra en posición vertical  
mientras que en el sáculo se proyecta lateralmente.

Los tres canales semicirculares se encuentran situados en -  
tres planos. Dependiendo del plano de rotación de la cabeza re-  
sultarán afectados un canal, dos canales o los tres.



**FIGURA 3.** Esquema representativo de los órganos que constituyen el sistema del mantenimiento del equilibrio y la postura (Planel, H. 1982)





**FIGURA 4.** Esquema que representa al Receptor Otolítico; formado por las células pilosas tipo I y II, células de soporte, fibras nerviosas aferentes y eferentes y cristales denominados otoconias. La curvatura de la capa inferior del tejido corresponde a la pared interior del utrículo y del sáculo (Parker, D.E. 1981).

Cada canal posee una dilatación: la ampolla, que contiene a su vez un epitelio sensorial muy parecido al que se halla en la mácula en una superficie que por su forma recibe el nombre de -- cresta (Parker, D.E. 1981) (figura 5).

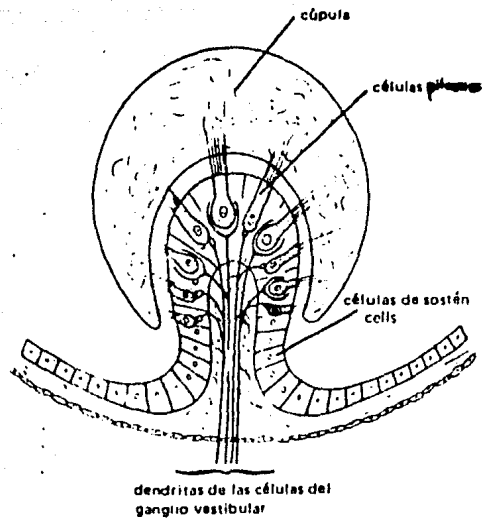
La estructura general del epitelio sensorial es la misma, -- tanto en la mácula como en la cresta.

Está constituido por cinco elementos: las células pilosas -- sensitivas que por su forma han sido clasificadas en tipos I y -- II, células soporte, sinapsis aferentes y eferentes y un mecanismo de acoplamiento mecánico (figura 6).

La célula pilosa tipo I, tiene forma de botella, con base -- redonda y la porción del cuello angosta, en su parte apical presenta una cutícula a la cual está anclado un cilio verdadero o -- cinocilio y varias prolongaciones de la membrana plasmática llamados pelos sensorios ó estereocilios. En su parte basal es -- contactada por la envoltura caliciforme de la prolongación terminal de una fibra nerviosa aferente. A esta prolongación llegan -- fibras nerviosas aferentes y forman sinapsis. (Figura 6).

La célula pilosa tipo II es cilíndrico, columnar y al igual que la célula pilosa tipo I, presenta en su parte apical una cutícula con un cinocilio y varios esterocilios. En su región sínáptica, colocada basalmente, existen múltiples terminaciones -- nerviosas de fibras vestibulares eferentes y aferentes.

Por medio de las sinapsis aferentes se envía la información



**FIGURA 5.** Representación de la ampolla de uno de los canales se micirculares observada en su totalidad. Las células-pilosas ubicadas en una superficie en forma de cresta se proyectan en una masa gelatinosa denominada cúpula. (Barr, M.L. 1975).

vestibular al Sistema Nervioso Central; a través de las sinapsis eferentes se recibe la información de centros superiores.

Por microscopía electrónica, ambos tipos de sinapsis son fácilmente reconocibles: la aferente presenta un cuerpo generalmente globular en la célula pilosa y un engrosamiento postsináptico en la fibra que la inerva; en la eferente puede observarse en la célula pilosa una cisterna en la zona de contacto con el botón sináptico, en el cual presenta multitud de vesículas (figura 6 - parte superior).

#### Transducción y Transmisión en las células pilosas.

A nivel vestibular las células pilosas son receptores responden a la dirección del movimiento llamado con frecuencia movimiento angular o rotación angular.

Estos receptores son capaces de detectar rotaciones tan lentas como dos grados por segundo. Durante ese movimiento, ya sea en el plano de un conducto semicircular o cerca del mismo, la endolinfa queda rezagada por la inercia y la cúpula se balancea. La inercia de la endolinfa ocasiona que la cúpula se mueva momentáneamente en dirección opuesta cuando la cabeza se detiene. Los pelos sensorios de las células pilosas se doblan al mismo tiempo, iniciando un fenómeno denominado de transducción, que altera la polarización eléctrica de la superficie de la membrana de las células pilosas, por tanto, una fuerza mecánica es convertida en una señal eléctrica (Murray, B.L. 1974).

En el fenómeno de transducción, a nivel de la parte basal de

la célula pilosa, hay siempre más canales iónicos abiertos, que en la parte apical. Cuando los cilios de la célula pilosa son desplazados sobre un eje de simetría hacia el cinocilio, se abren canales adicionales en la zona apical. Entonces los iones potasio son atraídos por el potencial negativo de la célula pilosa y se precipitan a través de la membrana. El aumento de la permeabilidad en el área apical incrementa la contribución sobre todo el potencial de membrana y éste cae a -40 milivolts.

Si los cilios son empujados sobre el mismo eje lejos del cinocilio, los canales que están abiertos en la parte apical en el estado de reposo, son rápidamente cerrados, la contribución del área apical al potencial de membrana decrece y la diferencia de potencial se incrementa a -65 milivolts. Los canales de transducción en la parte apical de la membrana son los responsables del cambio en el potencial no parecen ser altamente selectivos a los iones.

Después de considerar lo que se conoce acerca del mecanismo de transducción de la célula pilosa, lo siguiente es saber como el cambio en el potencial de ésta dirige el mensaje al cerebro - (Transmisión).

Cuando los canales de transducción de la célula pilosa se abren hay una caída en el potencial de membrana y éste cambio muy rápidamente en toda la célula. En el área basal de la membrana celular hay muchos canales que selectivamente admiten iones

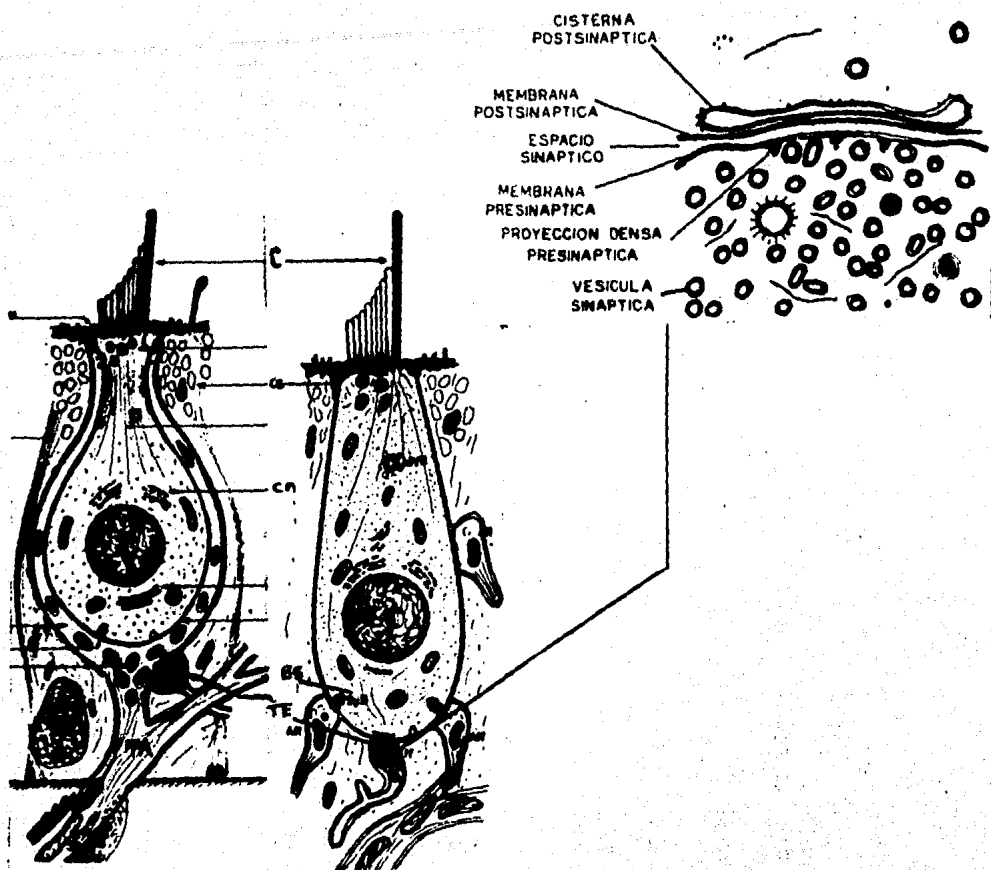


FIGURA 6. Esquema que muestra las células pilosas tipo I y II; Cinocilio C, células de soporte cs, fibra nerviosa - FN caliz nervioso cn, estructuras sinápticas es, terminal nerviosa aferente TA; terminal nerviosa eferente TE; barras sinápticas bs (en la parte superior derecha se ve una amplificación de la sinapsis eferente formada por la célula pilosa tipo II y una fibra nerviosa eferente).

calcio.

La acción de los canales de calcio es dependiente del voltaje: cuando hay una despolarización, los canales se abren.

Una vez que los iones calcio son admitidos en la célula por un mecanismo que aún se desconoce para estas células, ocasionan que un mensajero químico sea liberado de la célula presináptica a la región intersináptica.

Cuando esta substancia atraviesa este espacio y llega a la terminal nerviosa aferente se combina con los receptores de ésta y causan un cambio en la permeabilidad de la membrana lo que provoca una despolarización.

#### Transmisión Química en la Sinapsis Eferente.

Poco se sabe de los mecanismos iónicos de la transmisión eferente y del significado funcional de estas terminales, aunque existen evidencias que indican que esta comunicación es de naturaleza química y que el neurotransmisor eferente es probablemente la acetilcolina.

Se ha demostrado histoquímicamente actividad de acetilcolinesterasa en la cresta ampular, sáculo y utrículo en el oído interno en la Chinchilla (Iurato, S. 1971).

Hay evidencias que demuestran la presencia de acetilcolinesterasa, a nivel de la base externa de las células pilosas tipo II (Dohlman, G.F. 1974).

Se ha demostrado actividad de Colin acetiltransferasa, la en

zima que sintetiza la acetilcolina, en las fibras eferentes de la línea lateral en pez y se han registrado potenciales inhibitorios postsinápticos en la célula pilosa (Flock y Lam, 1974).

Estos hallazgos forman parte de los criterios que debe llenar una sustancia química para ser aceptada como neurotransmisor algunos otros criterios son: El compuesto debe encontrarse almacenado en la terminal presináptica y estar fácilmente disponible; el compuesto debe ser liberado de la terminal presináptica por estimulación de la neurona presináptica y algunas veces liberado espontáneamente; la acción del compuesto liberado sobre la neurona postsináptica debe ser inmediata; el compuesto aplicado externamente en el sitio de la sinapsis debe producir los mismos efectos que el transmisor natural; las drogas que interfieren la transmisión en sinapsis conocidas, deben actuar sobre la sinapsis en estudio, esta acción se debe observar a pesar de que el transmisor sea liberado endógenamente o el candidato sea aplicado exógenamente; debe haber un receptor específico postsináptico del compuesto en cuestión que pueda ser identificado bioquímicamente y particularmente por ligandos que son fijados por esta estructura; la acción molecular en la membrana postsináptica debe ser idéntica para el transmisor natural y el candidato aplicado externamente (Werman, R. 1966).

El conocimiento de las propiedades de las enzimas que sintetizan los neurotransmisores es particularmente importante, no sólo



lo porque la velocidad de formación del neurotransmisor, como de cualquier metabolito, depende de la actividad sintetizante, sino también porque existen evidencias experimentales de que la poza metabólica de la cual se liberan preferentemente los neurotransmisores al espacio sináptico es una poza de neurotransmisor recientemente sintetizado. Este último hecho indica que desde el punto de vista de la transmisión sinéptica, las enzimas degradativas de los transmisores son menos importantes que las sintetizantes.

Este concepto se apoya en el hecho de que la degradación metabólica de los neurotransmisores no es el más frecuente mecanismo de su eliminación del espacio sináptico (de hecho solo la acetilcolina parece eliminarse enzimáticamente), sino que otros de los cuales el más importante es el transporte del transmisor al interior de la neurona presináptica o de la propia terminal presináptica.

Además, la localización de las enzimas degradativas, desde el punto de vista de su distribución tanto regional como subcelular no se correlaciona con la función sináptica del neurotransmisor en tanto que hay en general una buena correlación con la distribución de las enzimas sintetizantes (Tapia y Meza, 1981).

Se ha considerado a la colin acetiltransferasa (CAT) como un marcador específico de neuronas colinérgicas y se ha observado que la actividad de esta enzima presenta características simi

lares en el S.N. de especies diferentes localizándose en las terminales sinápticas.

La acetilcolina se sintetiza en una reacción que es catalizada por la CAT:



La colina para la síntesis de acetilcolina es concentrada en la terminal nerviosa por un sistema de captura de alta afinidad dependiente de sodio (Jope, R.S. 1977).

La acetyl-CoA puede ser sintetizada a partir de piruvato proveniente de glucosa (Szutowicz, 1981), el piruvato es convertido a acetyl-CoA y  $\text{CO}_2$ , por el complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH) unido a las mitocondrias.

Se han propuesto tres diferentes fuentes de acetyl-CoA para la síntesis de acetilcolina (Jope, R.S. 1979):

a) La acetyl-CoA (intramitocondrial) es convertida a citrato el cual es transportado al citoplasma donde la ATP: citrato-liasa (EC 4.1.3.6.) convierte al citrato a acetyl-CoA y oxaloacetato.

b) La acetyl-CoA por sí misma puede ser transportada directamente o difundirse a través de la membrana mitocondrial.

c) La terminal nerviosa colinérgica contiene un CPDH soluble.

Todos los puntos anteriores están ilustrados en una hipotética terminal colinérgica en la figura 7.

Propiedades de la CAT: los estudios de la actividad de la CAT en fracciones subcelulares del cerebro han demostrado que tiene una doble distribución: en forma soluble y unida a membranas.

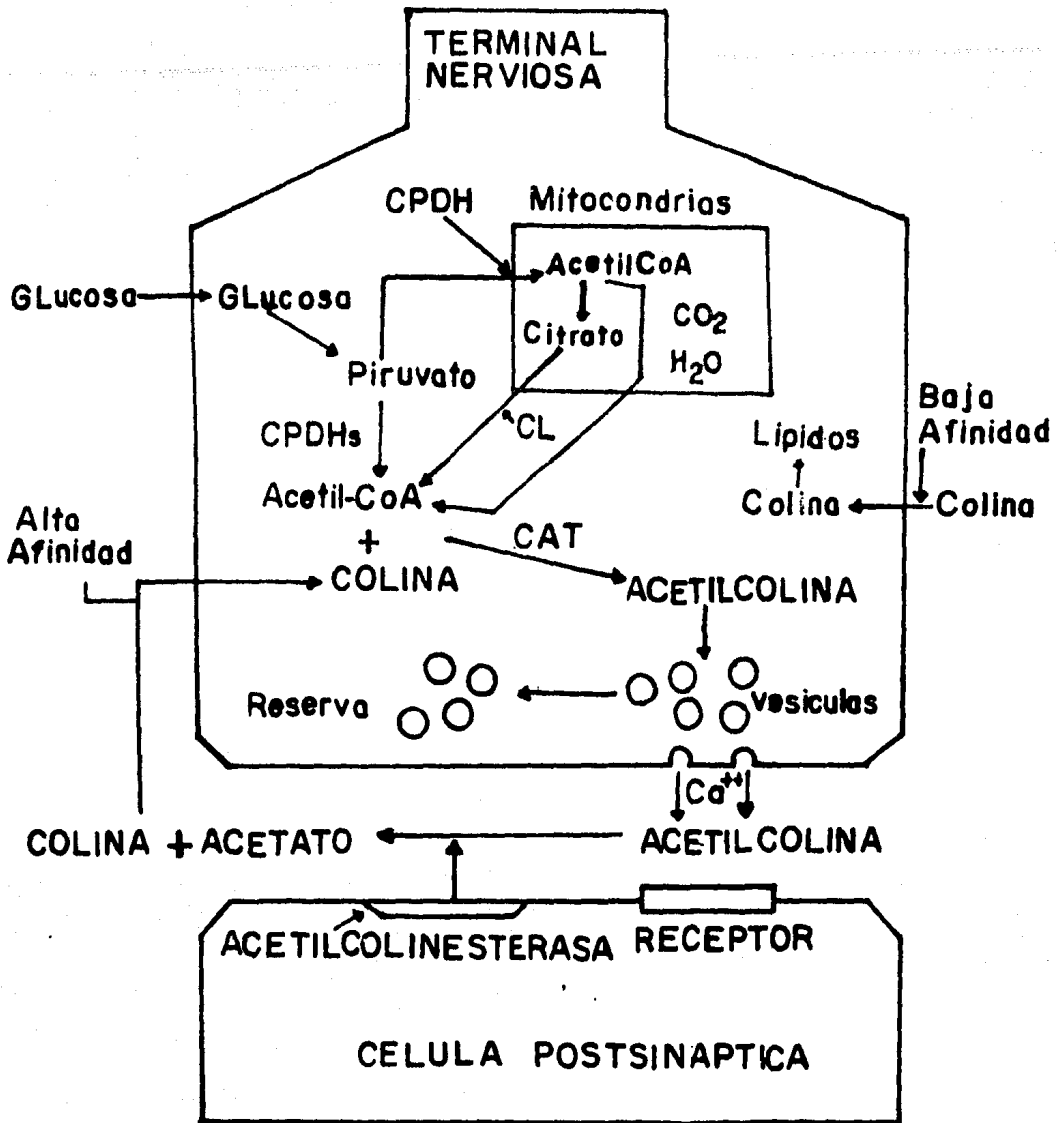


Fig.7 Modelo bioquímico de las sinapsis colinérgicas.

(Binishin, 1982).

Se han detectado por electroforesis tres formas moleculares con diferentes puntos isoeléctricos en cerebro de ratón y de mono, en el órgano eléctrico del pez torpedo y cerebro de conejo - se han encontrado dos formas moleculares (D-Malthe-Sorensen, - - 1976).

La unión de la CAT a fragmentos de membrana puede ser explicada por la atracción iónica de la CAT cargada positivamente a las membranas cargadas negativamente.

En cuanto a la cinética para la reacción que cataliza la CAT se han propuesto varios mecanismos: ping-pong, orden secuencial, Theorell Chance y un mecanismo secuencial al azar (Hersh, L. 1980).

Se ha visto que una de las propiedades de la CAT es que es activada por sales, en el caso de la CAT proveniente de placenta humana y cerebro bovino (Schubert, 1966 y Hersh, L. 1978), y se ha propuesto que esta activación se realiza en términos de un cambio conformacional en la enzima que da lugar a un incremento en la velocidad de disociación de la Coenzima A de un complejo binario enzima-coenzima A (Hersh, L. 1978).

En contraste con estos resultados, estudios realizados en la enzima de cerebro de rata dan como conclusión que el ión cloruro incrementa la  $K_i$  para la acetilcolina, se propone que el ión cloruro podría servir como un regulador específico de la CAT

por un incremento de la velocidad de reacción y relevando al producto de inhibición, la acetilcolina (Rossier, 1977).

Transmisión eferente colinérgica en el epitelio sensorial - vestibular del oído interno del pollo.

Se ha visto por una gran cantidad de estudios, que el sistema auditivo de las aves es un modelo muy accesible en la investigación del oído, pudiéndose comparar con el de mamíferos ya que existen varias similitudes en el sistema auditivo entre los dos grupos.

Dos de las más importantes son:

a) Hay dos diferentes tipos de células pilosas con diferentes inervaciones aferentes y eferentes.

b) Hay dos distintos tipos de neuronas cocleares eferentes y al menos dos clases diferentes de neuronas aferentes (Whitehead, M.C. 1981).

En el pollo se ha descrito el epitelio sensorial vestibular y se ha observado que está compuesto por dos tipos de células pilosas: las grandes células pilosas, las cuales hacen contacto sináptico con grandes terminales eferentes, o con pequeñas y extremadamente largas terminales nerviosas eferentes en el pollo. -- (Strutz, J. 1982).

Las terminales nerviosas eferentes hacen sinapsis con células tipo II, pero no con células pilosas tipo I; en éstas, el contacto se realiza con la fibra eferente.



FIGURA 8. Micrografía electrónica de un corte a nivel de la porción basal del epitelio sensorial de una cresta en la que se observa una sinapsis eferente (célula pilosa - HC; fibra eferente EB; las flechas señalan las cisternas subsinápticas en la parte basal de la célula pilosa).

Se ha estudiado la formación de los dos tipos de sinápsis -- durante el desarrollo embrionario, y se ha encontrado que las terminales nerviosas aferentes llegan muy tempranamente al epitelio-sensorial, al contrario de las eferentes, que aparecen hacia al -- final del desarrollo (Ginzberg, R.D. 1980), también se ha reportado en conejo que la aparición de las fibras nerviosas eferentes -- es tardía en las crestas ampulares del oído interno (Nakai, Y. -- 1970).

Nosotros hemos tomado como modelo las crestas aisladas del oído interno del pollo en el que por microscopía electrónica hemos encontrado la presencia de células pilosas tipo I y II, y sinap--sis tanto aferentes como eferentes, por lo que quisimos averiguar si, éstas últimas eran colonérgicas (figura 8).

Para ello nos propusimos investigar si había actividad de colin acetil transferasa y si ésta enzima presenta características similares en el Sistema Nervioso de especies diferentes, como son su activación por cloruro y su inhibición por el ión fosfato.

Determinamos ésta actividad por el método de Fonnum (1975) -- con algunas modificaciones.

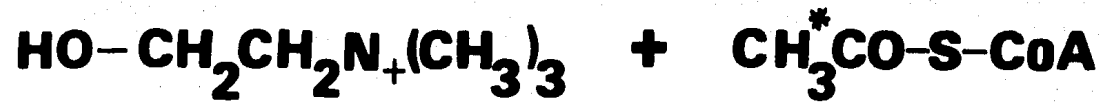
Fundamento: la CAT cataliza la transferencia del grupo acetilo de la acetil-CoA, a la colina, formando acetilcolina y coenzi--ma-A reducida (figura 9). En nuestro ensayo para la determina--ción de la actividad de la CAT se usa como fuente de la enzima el tejido vestibular homogenado en una solución amortiguadora incu--

bándolo con acetil-CoA marcada con tritio en el acetato y colina.

La acetilcolina marcada que se forma en la reacción es extraída y su radiactividad es evaluada en un contador de centelleo líquido.

Para saber en que tipo de célula está localizada ésta actividad se aprovechó que la embriogénesis del oído interno del pollo se conoce y se ha reportado que las fibras eferentes llegan muy tardíamente al epitelio, y al determinarse la CAT en la ontogenia es de esperarse alguna correlación entre la aparición de las fibras eferentes y la actividad de la enzima, se midió por tanto la actividad de la CAT en un homogenado de tejido vestibular extraído de embriones de pollo de 15,17,19,21 y de un día de nacidos.





CAT 1L



( \* =  $^3\text{H}$ - tritio )

CAT (EC 2.3.1.6)

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se usaron pollitos machos de un día de nacidos Rhode Island Reds provenientes de la granja Armour Hatchery de México obtenidos el mismo día del experimento. También se usaron huevos fértiles de la misma fuente, incubados a 37.8°C y 60% de humedad relativa en una incubadora de huevos marca Galván Hnos., ubicada en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Para la obtención del tejido se disecaron las crestas vestibulares del oído interno de pollitos de un día y embriones de pollo de 15, 17, 19 y 21 días, de la siguiente manera:

Se sacrifican los pollitos por decapitación, se abre el cráneo sagitalmente, de esa manera se visualiza el cerebro, el cual se extrae en su totalidad. Una vez retirado el contenido encefálico se abre la pared interna craneal para extraer las crestas vestibulares del oído interno de los pollos, y de la misma manera se procede con los embriones.

## Reactivos:

- 1.- Buffer de  $\text{H}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (MRC), 0.038 M, pH 7.4, 2.626 g/500 ml
- 2.- NaCl (Mallinckrodt, México) 3.6 M, 21 g/100 ml.
- 3.- Sulfato de eserina (S°) 1 mM, 3,82 mg/5 ml de EDTA, pH 7.4
- 4.- EDTA (S°) 0.066 M, 2.457 g/100 ml ajustado a pH 7.4 con NaOH
- 5.- EDTA (S°) 0.132 M, 2.457/50 ml ajustado a pH 7.4 con NaOH

- 6.- Cloruro de colina (S°) 0.2 M, 0.46 g/10 ml
- 7.- Triton X-100 (S°) 10% (1 ml de triton + 9 ml de H<sub>2</sub>O).
- 8.- Buffer citrato de sodio (Monterrey, México) 1.8 M, pH 6.2, - 50 ml (18.91 g de ácido cítrico (Monterrey, México) en 50 ml de H<sub>2</sub>O, 26.46 g de citrato de sodio en 50 ml de H<sub>2</sub>O. Se mezclan 7.2 ml de ác. cítrico y 42.8 ml de citratode sodio).
- 9.- Tetrafenilboro (S°) 500 mg en 100 ml de acetonitrilo (J.T.B.M.).
- 10.- Liquiflúor 500 ml (2 g de 2,5 difenioxazol (S°), 0.025 g de 1,4 bis 2-5 fenioxazolil) benceno; 2,2 p-fenileno bis (5-feniloxazol (S°), en 500 ml de tolueno (J.T.B.M.).
- 11.- S-acetil-Coenzima A (S°) 0.6 mM, 1.21 mg/2.5 ml de H<sub>2</sub>O
- 12.- CoenzimaA acetil<sup>3</sup>H-Acetil (New England Nuclear, Chicago USA) 0.05 mCi, 0.05 mg/0.5 ml, actividad específica 850.0 mCi/mmol, en solución acuosa m pH 5.
- 13.- Albumina serica bovina (S°) 0.00625 g/25 ml de H<sub>2</sub>O.
- 14.- NaOH (J.T.M.B.) 0.1 g + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (J.T.M.B.) 0.5 g en 25 ml de H<sub>2</sub>O.
- 15.- Tartrato doble de sodio y potasio (MRC) 0.5 g/25 ml de H<sub>2</sub>O.
- 16.- Sulfato de cobre (J.T.M.B.) 0.25 g/25 ml de H<sub>2</sub>O.
- 17.- Reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu (S°) 1:1 (50 ml de H<sub>2</sub>O + 50 ml de H<sub>2</sub>O).

Clave de la fuente de reactivos: S°.- Proveniente de la com

pañía Sigma, San Luis Missouri, E.U.A.; J.T.B.M.- J.T. Beker, -- México.; MRC.- Merck, México.

Procedimiento: una vez que se han extraído las crestas, se hacen homogenados de éstas, de 5 a 10 pollitos (aproximadamente- 36 mg de tejido) en 1.5 ml de buffer de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.038 M, pH 7.4- con un homogenizador de vidrio, dando 20 golpes a 550 rpm con un pistón de teflón. Para los embriones se usaron 5 a 10 por homogenado.

Medio de incubación para la determinación de la CAT.

TABLA I

	Conc. Inicial	Volumen adic cionado	Conc. Final
NaCl	3.600 M	25 $\mu$ l	300 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0.038 M	25 $\mu$ l	10 mM
Sulfato de eserina	0.001 M	20 $\mu$ l	0.1 mM
EDTA	0.066 M	50 $\mu$ l	10 mM
Cloruro de colina	0.200 M	15 $\mu$ l	10 mM
Tritón X-100	10.00 %	$\frac{1 \mu l}{136 \mu l}$	0.05 %

Acetil- $^3\text{H}$ -CoA, 0.02  $\mu\text{Ci}$  en 100  $\mu$  l (se toman 2.08 ml de acetil CoA 0.6 mM y se adicionan 20  $\mu$  l de acetil- $^3\text{H}$ -CoA).

Homogenado: se usaron 50  $\mu$  l (0.02 mg de proteína) de homogenado.

Forma de realizarse:

Se colocan 136  $\mu$ l del medio de incubación, 100  $\mu$ l de acetil- $^3$ H-CoA y 50  $\mu$ l del homogenado en tubos de 3 mm de diámetro -- por 30 mm de largo, obteniendo un volumen total de 236  $\mu$ l por tubo.

TUBO	Medio	136 $\mu$ l	acetil- $^3$ H-CoA	100 $\mu$ l	Homogenado	50 $\mu$ l	
1		↓		↓		↓	Blanco
2							Problema
3							" "

Una vez que se ha colocado el homogenado, se agita la mezcla con un vortex y se incuba inmediatamente los tubos a 37°C, por 15 minutos. Cada determinación se realiza por duplicado, se detiene la reacción por dilución al agregarle 10 ml de buffer de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.038 M, teniendo el tubo con la mezcla de reacción en un frasco-vial con una jeringa hipodérmica, y se le agregan 2 ml de Kaliginost (tetrafenil boro en acetonitrilo) y 8 ml de liquiflúor. Se efectúa la misma operación con un tubo blanco excepto que la reacción se detiene a tiempo "cero", se dejan reposar 24 horas en la obscuridad. Se determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido modelo Beckman L.S. 7000, dos minutos en el canal para tritio. Todo el procedimiento se ilustra en la figura 10.

Se realizaron determinaciones de la CAT a diferentes concentraciones de proteína, haciendo homogenados desde 5, 10, 15, 20, 25 y 30 pollitos, para investigar el efecto de la concentración de enzima.

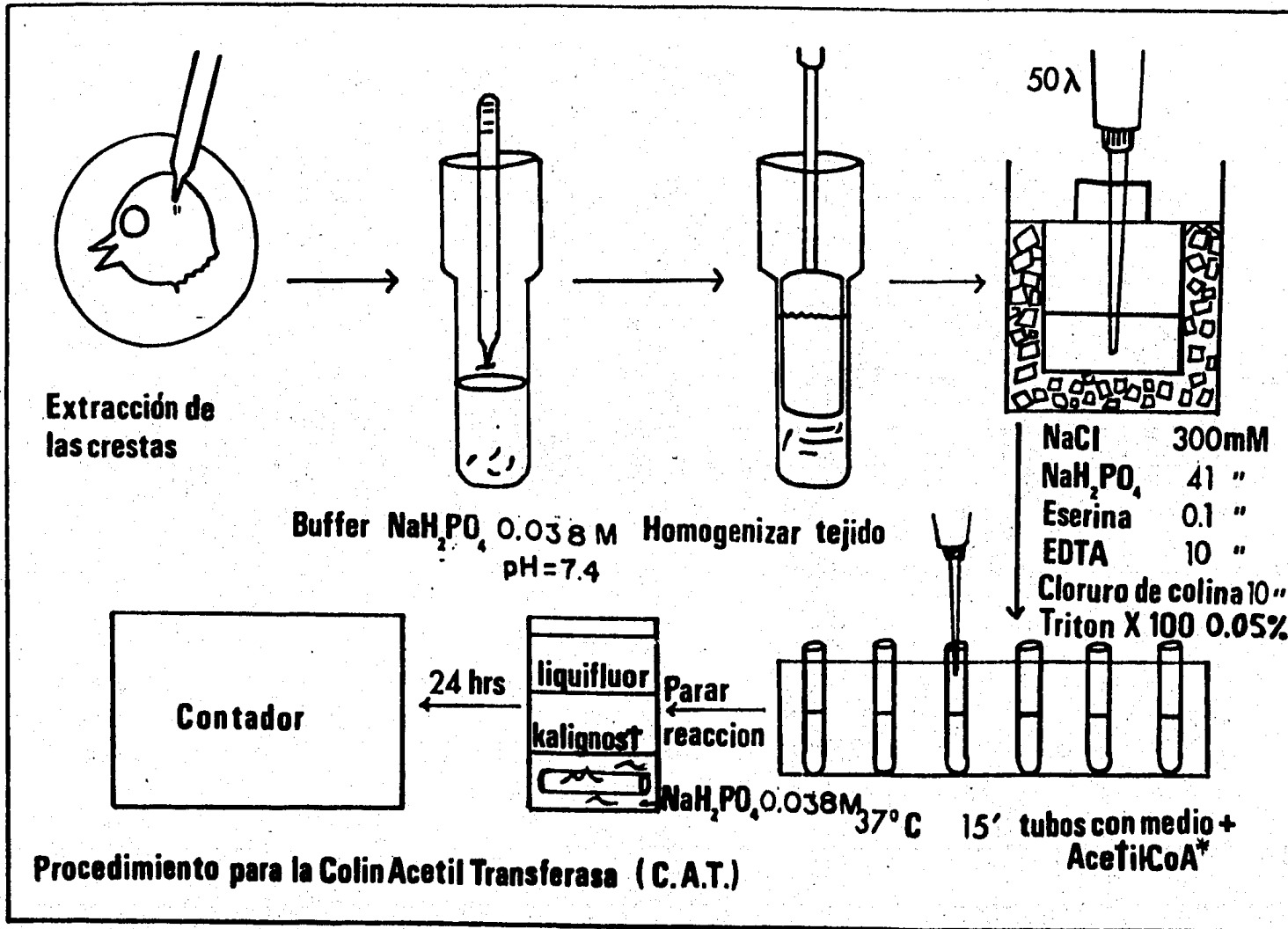


Figura 10.

También se determinó la actividad de la CAT a diferentes -- tiempos de incubación, para investigar si había linealidad en -- cuanyo a la actividad de la enzima con respecto al tiempo. Se -- realizó desde 5 minutos de incubación hasta 60 minutos.

Para observar el efecto del ión fosfato y del ión cloruro -- se procedió de la siguiente manera:

Se llevó a cabo la incubación del tejido para la determina-- ción de la actividad de la CAT en las condiciones señaladas ante-- riormente, pero en presencia de fosfatos 10 mM ó 200 mM.

Para observar el efecto del ión cloruro, se determinó la ac-- tividad de la CAT, teniendo una concentración de NaCl 300 mM fi-- nal (medio de la tabla I) comparando con experimentos paralelos-- en los que se reemplazó el cloruro por el ión citrato, mediante-- la adición de buffer citrato de sodio 300 mM final (medio de la-- tabla I reemplazando el  $\text{Cl}^-$  por citratos).

Los experimentos en los homogenados del tejido embrionario-- se llevaron a cabo como se ha indicado anteriormente usando el -- medio de incubación explicado en la tabla I.

#### Determinación de la proteína:

La proteína fue determinada por el Método de Lowry et al -- (1951) usando albúmina sérica bovina como estándar y llevando a-- cabo el análisis con un espectrofotómetro marca Karl-Zeiss, mode-- lo M4QIII.

Cálculos para obtener la actividad de la CAT en nmoles/minu

to/mg de proteína:

Se tiene una concentración de acetil-CoA fría = 0.6 mM en -  
1000 ml 600 molar en 100 ml, en 0.1 que se pone en la mezcla de-  
reacción:

$$\begin{aligned} 600 \mu \text{ molas} &- 1000 \text{ ml} \\ x &- 0.1 \text{ ml} \\ x &= 0.06 \mu \text{ molas en } 0.286 \text{ ml de la mez-} \end{aligned}$$

cla de reacción.

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

$$\begin{aligned} 1 \mu \text{ Ci} &- 2.22 \times 10^6 \text{ DPM} \\ 0.02 \mu \text{ Ci} &- x = 4.44 \times 10^4 \text{ DPM} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} 4.44 \times 10^4 \text{ DPM} &- 0.06 \mu \text{ molas} \\ x &- 1.00 \mu \text{ mola} \end{aligned}$$

$x = 740\ 000 \text{ DPM en } 1 \mu \text{ mola por lo que en una}$   
nanomola tendremos 740 DPM.

Se tiene pues 740 DPM/nmol de acetil-CoA

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

$$\text{CPM} - 41.3 \%$$

$$X - 100 \%$$

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



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

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

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

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

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

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

## R E S U L T A D O S

Al medir la actividad de la CAT a diferentes concentraciones de proteína se ve que esta es lineal hasta 0.05 mg (figura 11).

Cuando se determinó la actividad de la CAT a diferentes tiempos de incubación puede observarse que aumenta proporcionalmente hasta 45 minutos de incubación (figura 12).

El valor obtenido en la determinación de la CAT en los homogenados de las crestas del oído interno del pollo es el resultado de 8 experimentos y fue de 4.16 nmoles/minuto/mg de proteína.

Si se compara con valores obtenidos de diversas áreas del sistema nervioso del pollo para la enzima (tabla II) puede observarse que es de la misma magnitud excepto por el ganglio ciliar.

En la tabla III la actividad de la CAT en ausencia del ión cloruro o en presencia del ión fosfato a una concentración de 200 mM, puede observarse una disminución de aproximadamente 60% de la actividad de la CAT al cambiar la concentración de fosfatos 10 mM (que es la concentración que se utiliza en el medio de incubación) a 200 nM.

En el caso del ión cloruro se ve una disminución de 80% de la actividad de la enzima al eliminarlo del medio de incubación y sustituirlo por citrato de sodio, por tanto la presencia del ión  $\text{Cl}^-$  activa a la enzima lo que concuerda con lo observado para la CAT de otras especies (Hersh, L.B. 1980).

La actividad de la CAT se determinó a diferentes estadios - en la embriogenesis del pollo desde 15, 17, 19, 21 y 1 día de nacido y se vió que esta es apenas detectable al día 15 con un valor de 0.17 nmoles/minuto/mg de proteína, aumentando gradualmente hasta el día 19 en el cual se ve una actividad de 2.48 nmoles/minuto/ mg de proteína.

Se observó, además que en el día de la eclosión la actividad de la enzima era de 4.1 nmoles/minuto/mg de proteína lo que significa que a esa edad dicha actividad es ya la misma a la observada el día uno después de la eclosión.

TABLA II

ACTIVIDAD DE LA CAT EN EL OIDO INTERNO COMPARADA CON VALORES DE LA ENZIMA DE OTRAS AREAS DEL SISTEMA NERVIOSO DEL - POLLO.		
Origen de la CAT	nmoles/min/mg de prot.	Referencia
Cresta ampular del pollo.	4.16	Nuestro tra bajo.
Retina	2.50*	Ross and Mc. Douglas 1972.
Iris	5.00	Marchi et al 1980.
Ganglio lumbar simpático	8.30	" "
Ganglio ciliar	50.00	" "

\* Los valores fueron calculados teniendo en cuenta un contenido de 10% de proteína y 90% de agua por tejido.

TABLA III

EFECTO DE LOS IONES FOSFATO O CLORURO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CAT.	
Condiciones del ensayo	nmoles/minuto/mg de proteína
Control	4.16 ± 0.34 (8)
Fosfato 200 mM	1.68 ± 0.11 (8)
Control	4.04 ± 0.09 (5)
Citrato de sodio 300 mM	0.88 ± 0.14 (5)

Las cifras son la media de experimentos separados efectuados por duplicado y en paralelo de las condiciones experimentales indicadas en la tabla. La actividad se expresa como nmoles/minuto/mg de proteína ± E.S.M. para el número de experimentos entre paréntesis.

La composición del medio de incubación de los controles -- fue la misma que se indicó en Métodos. En los experimentos sólo se varió la concentración de fosfatos ó se substituyó el Cl<sup>-</sup> por citratos.

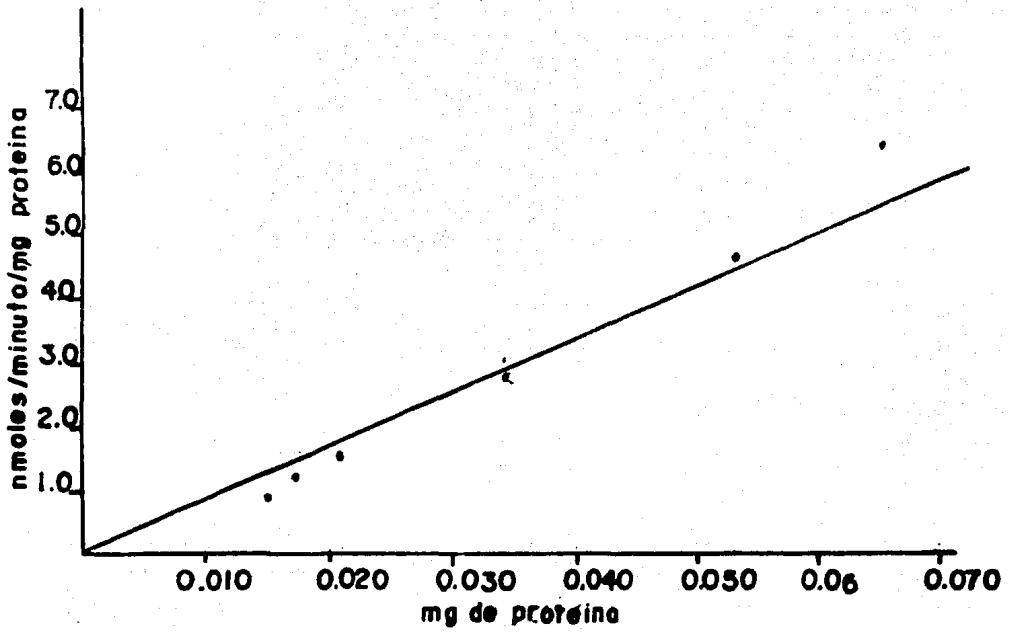


FIGURA 11. Curva de actividad de la CAT en función de la concentración de proteína. Los valores graficados están expresados en nmoles/minuto/mg de proteína ( $r^2 = 0.926$ ).

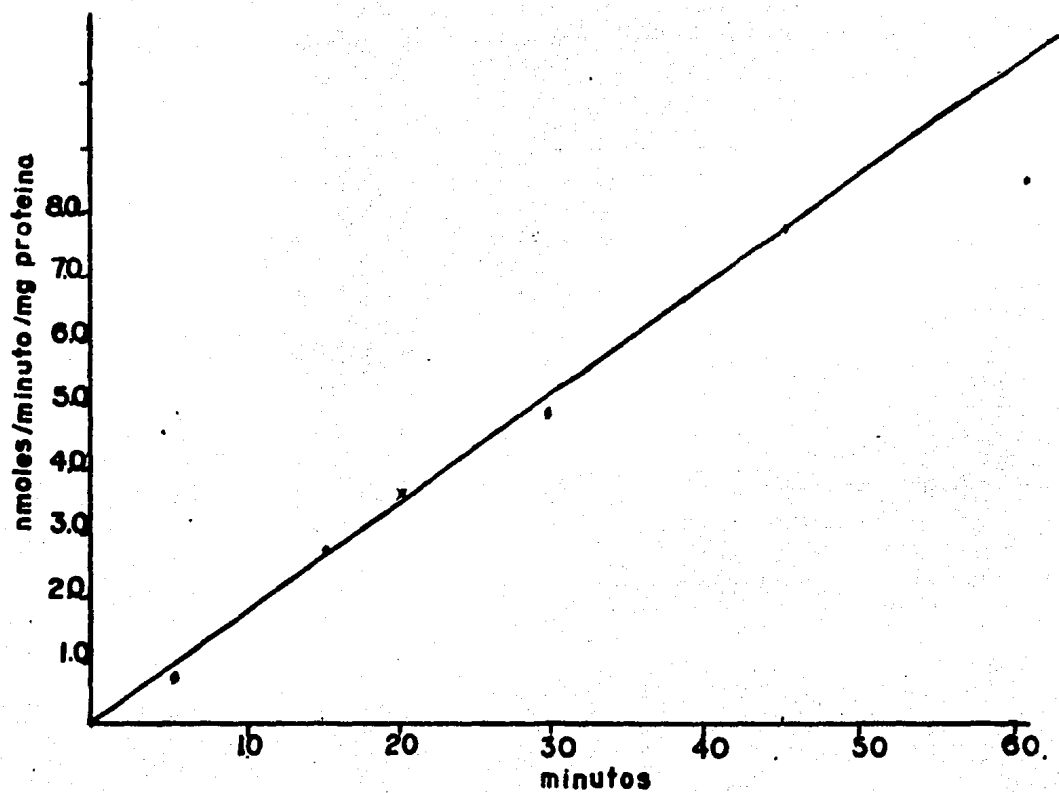


FIGURA 12. Curva de actividad de la CAT contra tiempo. Los valores están expresados en nmoles/minuto/mg de proteína. ( $r^2 = 0.982$ ).

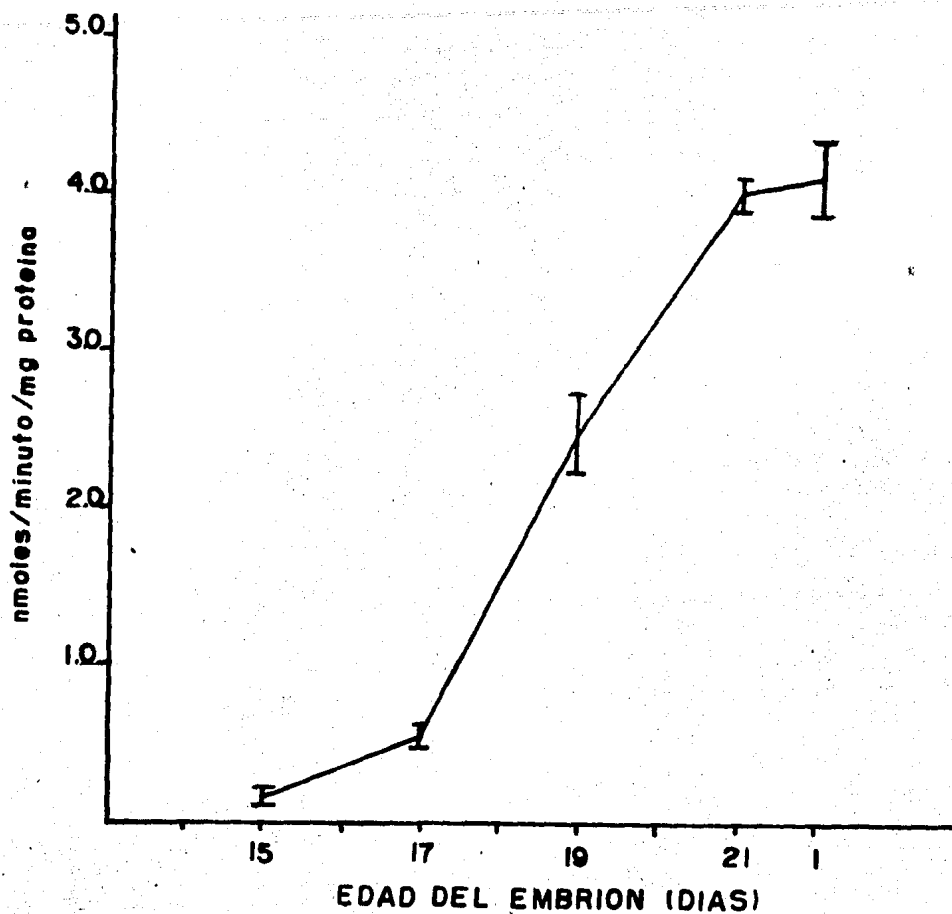


FIGURA 13. Actividad de la CAT en el oído interno del pollo en -  
diversos estadios durante la embriogenesis. Los valo-  
res están expresados en nmoles/minuto/mg de proteína.  
Los resultados representan el promedio de 3 experimen-  
tos independientes  $\pm$  E.S.M.



## D I S C U S I O N

En este trabajo se utilizaron crestas aisladas del oído interno del pollo, y se determinó la actividad de la CAT en un homogenado crudo de las mismas teniendo como antecedentes el hallazgo por microscopía electrónica de sinapsis eferentes, formadas por las fibras nerviosas eferentes y la parte basal de las células pilosas en este modelo.

Se realizó una curva de actividad de la CAT contra concentración proteínica para lo cual se utilizaron homogenados de las crestas aumentando la cantidad de estas para tener una concentración de proteína desde 0.015 mg por tubo hasta 0.065 mg. Se ve que la actividad aumenta en forma directa a la concentración de proteína.

Se realizó también una curva de actividad de la CAT contra tiempo desde el tiempo cero hasta 60 minutos de incubación y se observa un aumento de ésta en relación al tiempo de incubación hasta 45 minutos, por lo que nuestros experimentos realizados a 15 minutos de incubación se encuentran en la parte lineal de la reacción.

Al determinar la CAT en las condiciones de altas concentraciones de fosfatos o en ausencia del ión cloruro se observa una inhibición de la actividad enzimática semejante a lo observado por Rossier, J. 1981. En ausencia del ión cloruro se ve una disminución de la actividad con respecto al control (Hersh, L. 1980).

Estos resultados concuerdan con lo reportado para la CAT de otros vertebrados.

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo, es evidente que existe actividad de la CAT en las crestas aisladas del oído interno del pollo y que el valor obtenido para esta actividad cae dentro de los valores reportados en otros tejidos.

Cuando se determinó la actividad de la CAT durante la embriogénesis del pollo, se ve que se detecta al final del desarrollo, concordando con los reportes de la aparición tardía de las fibras eferentes al neuroepitelio (Ginzberg, R. 1980., Nakai, Y. 1970. y Tanaka, K. 1980) por lo que podemos decir que probablemente la enzima se encuentre en estas células.

## CONCLUSIONES

- 1.- Por los resultados presentados en este trabajo es evidente que existe actividad de la colin acetiltransferasa en las crestas aisladas del oído interno del pollo y que el valor obtenido cae dentro del rango de las cifras reportadas en otros tejidos del pollo.
- 2.- Cuando se determina la actividad a diversas concentraciones de proteína se vió que ésta observa una linearidad proporcional a su concentración, y cuando la actividad se mide contra tiempo se presenta lineal hasta los cuarenta y cinco minutos de incubación.
- 3.- La actividad de la enzima presenta características similares a las del Sistema Nervioso de especies diferentes, es decir, hay una activación por cloruros y una inhibición por fosfatos a altas concentraciones.
- 4.- En cuanto a la localización celular, se encontró que la colin acetiltransferasa es medible solamente a estadios muy avanzados de la embriogénesis, coincidiendo con la llegada de las fibras eferentes al epitelio sensorial, por lo que la enzima parece estar ubicada en terminales nerviosas eferentes.
- 5.- Aunque hacen falta otras evidencias para probar la célula de

origen de ésta actividad enzimática, los resultados pueden tomarse a favor de que la acetilcolina podría ser el transmisor eficiente en la periferia sensorial vestibular.

## R E F E R E N C I A S

- 1.- Benishin, C.G. y Carroll, P.T. (1982). A comparison of soluble and membrane bound forms of choline-o-acetyltransferase in mouse brain nerve endings. *Proc. W. Pharmacol. Soc.* 25, 343-345.
- 2.- Brunetti, F., Rossi, G., Voena, G., Buongiovanni, S. y Cortesina, G. (1964). L'action locale de l'acetylcholine de substances anticholinestérasiques sur la fonction vestibulaire. *Acta-Oto-laryng.* 57,294-298.
- 3.- Cooper, J., Bloom, F. y Roth, R. (1978). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York. pp. 73-101.
- 4.- Dohlman, G.F. (1974). Histochemistry and Metabolism of the Inner ear, en *Handbook of Sensory Physiology: vestibular system*. Part1. pp 185-212. (Kornhuber, H.H. ed). Springer Verlag. Berlin Heidelberg, New York.
- 5.- Ekström, J. (1978). Acetylcholine synthesis and its dependence on nervous activity. *Experientia.* 34, 1247-1253.
- 6.- Engström, H. y Engström, B. (1981). The structure of the -- vestibular sensory epithelia, en *The Vestibular System: function and morphology* (Torquato Gualtierotti ed.). pp 3-33. Springer -- Verlag-New York, Heidelberg, Berlin.

- 7.- Flock, A. y Lam, D. (1974). Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. *Nature*. 249,142-144.
- 8.- Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24, 407-409.
- 9.- Fonnum, F. (1975) Radiochemical assays for choline acetyltransferase and acetylcholinesterase, en *Research Methods in Neurochemistry*. (Marks, N. y Rodnight, eds). Plenum Press. New York. -- 18,253-275.
- 10.- Ginzberg, R.D. y Gilula, N.B. (1980). Synaptogenesis in the vestibular sensory epithelium of the chick embryo. *J. Neurocytol.* 9,405-424.
- 11.- Guyton, A.C. (1977). Funciones motoras del tallo cerebral y ganglios basales; reflejos de formación reticular, aparato vestibular, equilibrio y tallo vestibular, en *Tratado de Fisiología Médica*. pp 694-708. Ed. Interamericana, S.A. de C.V., México 4. D.F., - México.
- 12.- Hajós, F., Tapia, R., Wilkin, G., Johnson, A.L. y Baláz, R. (1974) Subcellular fractionation of rat cerebellum: An electron microscopic and biochemical investigation. I.- Preservation of large fragments of cerebellar glomeruli. *Brain Research*. 70,261-279.
- 13.- Ham, A.W. (1975). Terminaciones nerviosas aferentes y órganos

especiales de los sentidos, en Tratado de Histología. pp 906-920.  
Ed. Interamericana, S.A. de C.V. México 4, S.F., México.

14.- Hersh, L. (1980). Studies on the Kinetic mechanism and - -  
salt activation of bovine brain choline acetyltransferase. J. --  
Neurochem. 34, 1077-1081.

15.- Hersh, L. (1980). The lack of specificity towards salts in  
the activation of choline acetyltransferase from human placenta.  
J. Neurochem. 32, 991-996.

16.- Hoover, D., Muth, E. y Jacobowitz, D (1978). A mapping of-  
the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase ans  
acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. Brain re- -  
search 153, 295-306.

17.- Hudspeth, A.J. (1983). The hair cells of the inner ear. --  
Scientific American. 247, 42-54.

18.- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. y Reale, E. (1971). -  
Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. -  
Acta Otolaryng. 71,147-152.

19.- Iurato, S., Luciano, L. Pannese, E. y Reale, E. (1971). -  
Histochemical Localization of Acetylcholinesterase (AChE) Activii  
ty in the Inner Ear. Acta Oto-laryngol. Supplement. 279,5-46.

20.- Jope, R. (1979). High affinity choline transport and acetyl

CoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. Brain Research Review. 1, 313-344.

21.-Lowry, O.H., Rosebroug, H.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. -- (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193,265-275.

22.- Macarulla, J.M. y Abad, C. (1980). Nociones de estadística-Bioquímica, en Esquemas de Bioquímica. pp 152-167. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.

23.- Malthe-Sorensen, D. (1976). Molecular properties of choline acetyltransferase from direct species investigated by isoelectric focusing and ion exchange adsorption. J. Neurochem. 26, 861-865.

24.- Marchi, J., Hoffman, D.W., Giacobini, E. y Fredrickson, T., (1980) Acetyltransferase activities in autonomic ganglia and iris of chick. Develop. Neurosc. 3,235-247.

25.- Meza, G., Cuadros, P., López, I., Ruiz, M. (1982). "El oído interno del pollo durante la embriogenesis": un modelo para la localización celular de posibles neurotransmisores en la periferia sensorial vestibular. XXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guadalajara. México. (Resumen).

26.- Murray, B.L. (1974). Sistema auditivo y Sistema vestibular, en El Sistema Nervioso Humano. pp 271-290. Ed. Harla, S.A. de --



C.V. México.

27.- Nakai, Y. (1970). The Development of the Sensory Epithelium of the Cristae Ampullares in the Rabbit. *Pract. Oto-rhino-laryng.* 32, 268-278.

28.- Noback, C.R. y Demarest, R.J. (1980). Oído, Sistema Auditivo y Sistema Vestibular, en *Sistema Nervioso Humano, Fundamentos de Neurobiología*. pp 235-251. McGraw-Hill Eds, México.

29.- Otorrinolaringología (1980). Centro Científico Richter. Año II, número 5, pp 4-18. Actualización Médica Continua.

30.- Parker, D.E. (1981). The Vestibular Apparatus. *Scientific American*. 243, 98-111.

31.- Planel, H. (1982). La Biología en la Ingravidez. *Mundo Científico, La Recherche*. 16,700-712.

32.- Ross, C.D. y Mc. Dougal, D.B. (1979). The distribution of choline acetyltransferase in vertebrate retina. *J. Neurochem.* 26, 521-526.

33.- Rossier, J., Spantadakis, Y. y Benda, P. (1977). The effect of  $Cl^-$  on choline acetyltransferase kinetic parameters and a proposed role for  $Cl^-$  regulation of acetylcholine synthesis. *J. Neurochem* 29,1007-1012.

34.- Schubert, J. (1966). Choline acetyltransferase purification and effects of salts on the mechanism, of the enzyme-catalized -- reaction. *Biochem. Biophys. Acta.* 122, 407-481.

35.- Strutz, J. y Schmidt, C.L. (1982). Acoustic and vestibular-efferent neurons in the chicken (*Gallus domesticus*). A horseradish peroxidase study. *Acta Oto-laryngol.* 94,45-51.

36.- Szutowicz, A., Bielarczyk, H. y Lysiak, W. (1981). The role of citrate derived from glucose in the acetylcholine synthesis in rat brain synaptosomes. *Int. J. Biochem.* 13, 887-892.

37.- Tapia, R. y Meza-Ruiz, G. (1981). Propiedades Bioquímicas de las sinapsis Gabaérgicas y Colinérgicas, en *Temas Selectos de Fisiología Celular.* (Peña, A., Drucker, C. y Tapia, R. eds.). pp-223-240. UNAM, México, D.F.

38.- Testut, L. y Latarjet. A. (1966). Sentido del Oído, en *Anatomía Humana, Tomo III.* pp 730-880. Salvat eds, S.A. Barcelona, - España.

39.- Tanaka, K. y Smith, C.A. (1978). Structure of the chickens - inner ear: SEM and TEM study. *Am. J. Anat.* 153:251-271.

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

41.- Whitehead, M.C. y Morest, D.K. (1981). Dual populations of efferent cochlear axons in the chicken. *Neuroscience*. 6, 2351-2651.

42.- Wilson, V.J. y Jones, G.M. (1979). Peripheral Morphology, en *Mammalian Vestibular Physiology*. pp 5-39-Plenum Press. New York.