

24



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

UBICACION CELULAR DEL ACIDO GAMMA AMNO BUTIRICO
Y LA ACETIL COLINA EN EL OIDO INTERNO DE RATAS
TRATADAS CON PROPILTIOURACILO.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

MA. DE LOURDES CERON RUIZ

México, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	40
RESULTADOS	54
DISCUSION	65
CONCLUSIONES	68
APENDICE	70
BIBLIOGRAFIA	74

RESUMEN

El epitelio sensorial vestibular es una de las principales fuentes de información que utiliza el Sistema Nervioso Central, (SNC), para mantener el equilibrio. La información es detectada en el vestíbulo por células pilosas sensoriales y enviada al -- SNC a través de fibras aferentes que las inervan, a su vez las células sensoriales reciben información central mediante conexiones eferentes. Existen evidencias de que la comunicación, - en ambos sentidos es de naturaleza química. Aunque su identidad aún no es conocida, se sospecha que pudieran ser el ácido gamma aminobutírico (GABA) un mediador aferente y la acetilcolina -- (Ach) uno de los eferentes.

Para aportar evidencias en ese sentido, en el presente tra bajo se midió la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima que sintetiza al GABA y la colin acetiltransferasa -- (CAT), enzima de síntesis de Ach, en homogenados de vestíbulo - aislado de la rata Long-Evans, ya que la presencia de estas enzimas se ha considerado como marcador específico de neuronas - GABAérgicas ó colinérgicas.

Con el propósito de localizar con la mayor precisión posible sus células de origen, se administró oralmente propiltiouracilo (PTU) a un grupo de hembras preñadas. El PTU es un agente que produce hipotiroidismo congénito y causa entre otros efectos un retardo en el desarrollo del epitelio sensorial vestibular, evitando especialmente, la formación de sinapsis eferentes, con lo que se tienen aisladas a las células pilosas sensitivas

sin la influencia eferente.

Se encontró que en homogenados de vestíbulo de rata Long-Evans, existía actividad tanto de la GAD como de la CAT lo que corroboraba la posible neuromediación GABAérgica y colinérgica en el vestíbulo de ratas. Al investigar ambas enzimas en el vestíbulo de ratas provenientes de aquellas a las que se les administró el PTU, la actividad de la GAD no se modificó, mientras que la de la CAT disminuyó notablemente. Cuando se hicieron experimentos de reemplazo hormonal inyectando tiroxina simultáneamente a la administración de PTU, se encontró que la actividad de la CAT no se modificaba. Estos hallazgos nos llevan a inferir que la GAD esta localizada en una estirpe celular del epitelio sensorial que no se altera con el PTU y que bien pudieran ser las células sensoriales, mientras que la CAT se encuentra en un tipo celular ó botón sináptico que se modifica con el tratamiento y que son posiblemente las terminales eferentes. Estos resultados, aunque indirectos, apoyan la idea de que el GABA pudiera ser un neurotransmisor aferente mientras que la Ach uno de los eferentes en el vestíbulo de la rata.

INTRODUCCION

Para sobrevivir, la mayor parte de los organismos tienen - que movilizarse y poseer un sentido de la orientación en cuanto a la posición propia y la de las cosas que los rodean. A fin de desplazarse de manera eficaz y orientarse dentro de su ambiente, los vertebrados terrestres, tienen que conocer la posición de su cuerpo en el espacio. Esto se logra mediante el sistema multimodal en el cual intervienen el sentido de la vista, los sensores en las articulaciones y en la piel y muy especialmente la porción vestibular del oído interno, que además tiene que ver con el mantenimiento del equilibrio y la postura.

El oído de los vertebrados terrestres está constituido por tres partes: el oído externo, el oído medio y el oído interno.

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

El oído medio ó caja del tímpano está constituido por tres pequeños huesos (martillo, yunque y estribo) y por la trompa de Eustaquio, que comunica al oído medio con la nasofaringe. El -- tímpano es una pequeña membrana oval unida en toda su circunferencia externa a la parte final de la cavidad ósea del conducto auditivo externo, su parte central sobresale un poco hacia el -

interior, donde se une con el martillo, este se une al yunque y éste último se articula con el estribo; estos huesecillos unidos entre sí son los responsables de transmitir las vibraciones desde el tímpano al oído interno, amplificándolas más de diez veces. El oído medio y el oído interno se comunican mediante dos pequeñas perforaciones: la ventana oval cubierta por la base del estribo y la ventana redonda cubierta por una membrana transparente.

El oído interno situado profundamente dentro del hueso temporal del cráneo, contiene los receptores al sonido y los que ayudan al mantenimiento del equilibrio, la postura y la orientación. Consiste en un conducto membranoso (laberinto membranoso), encerrado en un análogo óseo (laberinto óseo). El laberinto membranoso está constituido fundamentalmente por tres conductos semicirculares, que parten de una cavidad llamada utrículo conectado con otra llamada sáculo. Desde el sáculo el conducto membranoso gira en espiral varias veces para formar la cóclea ó caracol, que contiene el órgano que percibe las vibraciones sonoras también llamado órgano de Corti. (fig. 1).

El laberinto óseo está lleno de líquido cuya composición es semejante al líquido cefalorraquídeo llamado perilinfa y el laberinto membranoso a su vez está lleno de la endolinfa, un líquido de composición química especial que tiene una concentración elevada de potasio. (1), (7).

AUDICION: Las variaciones de presión del aire causadas por los sonidos, hacen vibrar el tímpano y esas vibraciones son conducidas hasta la ventana oval, alcanzando el caracol ó cóclea a través del líquido del oído interno. El movimiento de este líquido repercute así en la membrana basilar en uno de cuyos lados esta el órgano de Corti, constituido por células pilosas -- sensitivas provistas de prolongaciones citoplasmáticas llamadas estereocilios que alcanzan con su punta la membrana tectoria ad yacente. Cuando el órgano de Corti se mueve por las variaciones de presión del líquido del caracol y sus células se doblan contra la membrana tectoria, las células pilosas envían señales a miles de fibras nerviosas con las que están vinculadas. Estas - fibras, que forman primero el nervio coclear y después el nervio auditivo, transmiten señales a las zonas auditivas del cerebro, donde son interpretadas como sonidos.

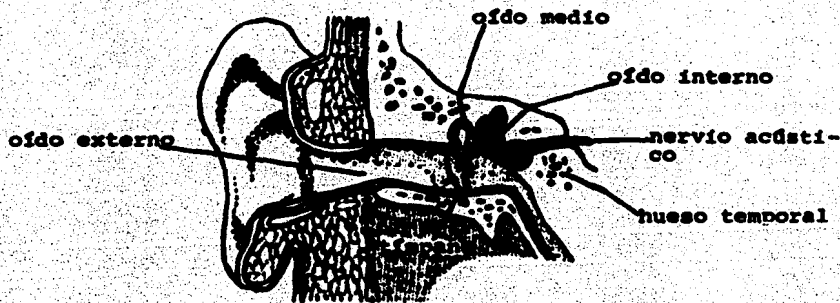


Fig. 1 Esquema que representa el oído humano. (2)

SENTIDO DEL EQUILIBRIO: La audición como ya dijimos no es la única función del oído. Todas las acciones desde la más simple a la más compleja, como caminar, correr, trepar, e incluso sentarse, necesitan del sentido del equilibrio. Este sentido -- depende en parte del vestíbulo, (localizado en el oído interno), que registra las variaciones de movimientos (aceleraciones), la posición de la cabeza así como la fuerza de la gravedad.

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

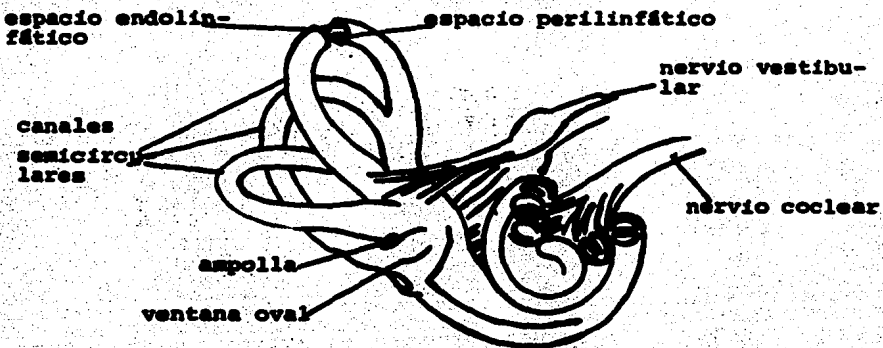


Fig.2. Diagrama de los órganos que componen al oído interno (2)

Los movimientos de la cabeza son percibidos por células especializadas en la mecanorrecepción, como en el caso de la cóclea. Las células pilosas sensitivas ubicadas en los ensanchamientos (ampollas) de donde parten los conductos semicirculares, que se encuentran dispuestos en planos perpendiculares entre sí

y están llenos de líquido (la endolinfa). Las células pilosas - sensitivas están coronadas por una cúpula de material gelatinoso, constituyendo la cresta ampular. Cuando la cabeza cambia de posición, la endolinfa contenida en los conductos se mueve y -- ejerce presión sobre las células pilosas ubicadas en las crestas, las cuales generan señales. Estas señales son enviadas al cerebro a través de las fibras aferentes del nervio vestibular y éste responde en la forma de un reflejo que es enviado a través del sistema oculomotor o vestibulo espinal.

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

Otros factores que cooperan en el sentido del equilibrio - son: la vista, que ayuda al individuo a adaptar la posición del cuerpo al ambiente, de manera que el equilibrio pueda conservar se correctamente, también contribuye al equilibrio la sensación del movimiento de las demás partes del cuerpo mediante receptores somáticos (sensores en las articulaciones y en la piel). En realidad el sistema del mantenimiento del equilibrio es multimodal, pues utiliza también información procedente de otros sentidos. (fig.3).(3).

Las porciones del epitelio sensorial son los verdaderos órganos sensitivos del vestibulo dispuestos de tal forma que constituyen un sistema muy eficiente para ayudar en la orientación en el espacio y la percepción de la aceleración lineal y angu--

lar. (fig.4).(4).

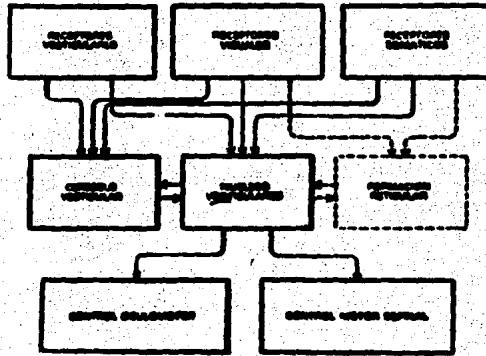


Fig.3. Esquema representativo de los órganos que constituyen el sistema del mantenimiento del equilibrio (3).



Fig.4 Porciones sensoriales en el oído interno, (4).

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

Las células pilosas tipo I, tienen forma de botella, con la base redondeada y la porción del cuello angosto; en su parte apical presentan una cutícula a la cual está anclada un cilio verdadero ó cinocilio y varias prolongaciones de la membrana plasmática llamados pelos sensorios ó estereocilios. En su parte basal están contactadas con la envoltura calciforme de la prolongación terminal de una fibra nerviosa aferente. A esta prolongación llegan fibras nerviosas eferentes y forman sinapsis. (fig.5).

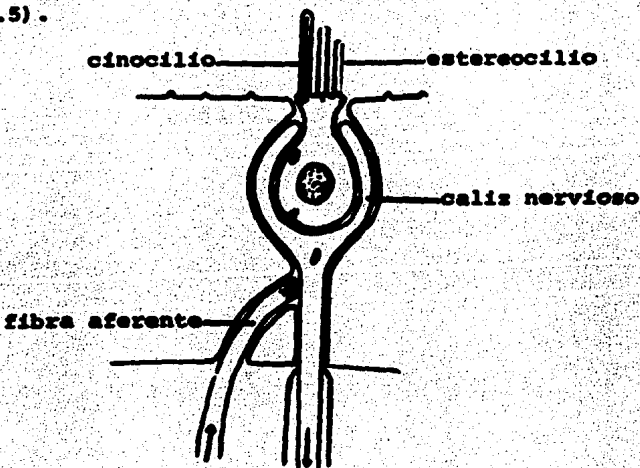


Fig. 5 Esquema de la célula pilosa tipo I. (4).

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

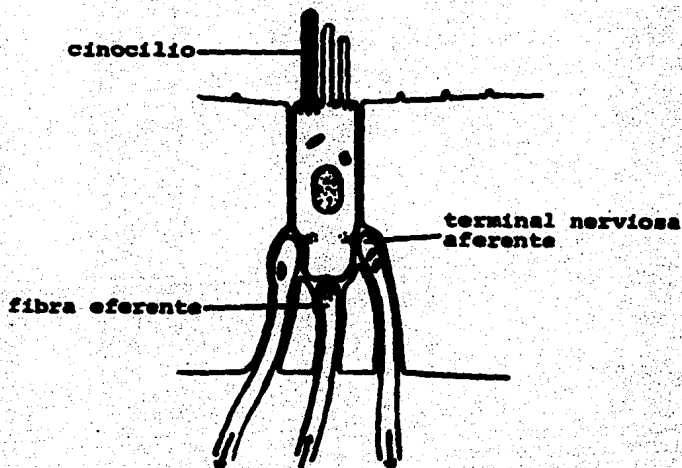


Fig.6. Esquema de la célula pilosa tipo II.(4).

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

riales se encuentran células de soporte ó sostén del epitelio cúbico con características especiales como un núcleo basal y gran cantidad de gránulos posiblemente secretores en la porción supranuclear.

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

MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE LA CELULA PILOSA: Como ya dijimos, la parte apical de las células pilosas consiste de 40 a 80 estereocilios y en el vestíbulo un cilio verdadero o cinocilio, el cilio aparece en el extremo del haz y los estereocilios aumentan de tamaño desde el otro extremo siendo más largos los más cercanos al cinocilio.

Los pelos sensorios de los mecanorreceptores de las crestas están incluidos en la cúpula que se extiende hasta el lado opuesto de la ampolla. (fig.7). La aceleración angular en el mismo plano que el canal semicircular causa que el fluido dentro del canal, por inercia tienda a resistir el movimiento presionando contra la cúpula, esta presión causa que la cúpula se deforme ya sea en forma cóncava ó convexa doblando así a los pelos sensorios, este doblamiento inicia un fenómeno denominado transducción, que altera la polarización eléctrica de la superficie de la membrana de las células pilosas. La célula se despolariza si la punta del haz de estereocilios se dobla hacia el cinocilio mientras que se hiperpolariza cuando se estimula en dirección -

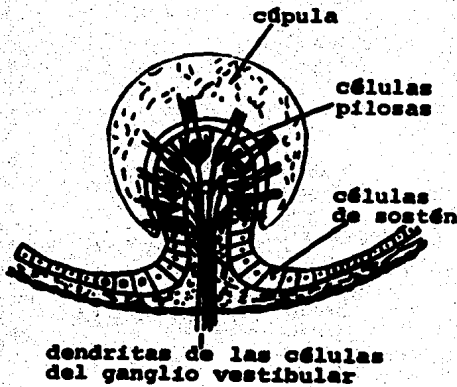


Fig.7. Representa la ampolla de uno de los canales semicirculares.

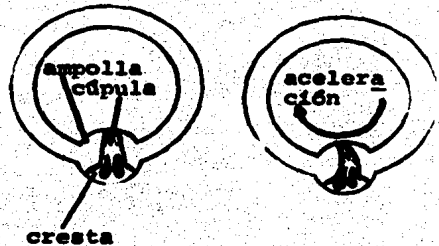


Fig.8. Representa los estímulos que reciben las crestas (2).

opuesta. Debido a que todas las células pilosas de las crestas están orientadas en la misma dirección con respecto al cinocilio, todas responden en la misma forma. (fig.8).

Los pelos de las células sensoriales en las máculas están cubiertos por una membrana otolítica gelatinosa cubierta con -- cristales de carbonato de calcio, llamados otoconias. (fig.9). Debido a que la otoconia es más densa que el fluido que la rodea, la membrana otolítica tiende a moverse bajo la influencia de la aceleración lineal, por ejemplo, cuando la mácula del utrículo normalmente en posición horizontal se mueve, la fuerza de

gravedad tiende a mantener la membrana otolítica en posición horizontal, esta hace que se doblen los pelos sensorios. Puesto - que las máculas contienen células pilosas que tienen dos diferentes orientaciones, este doblamiento hace que algunas células se despolaricen y otras se hiperpolaricen. (fig.10), (2).

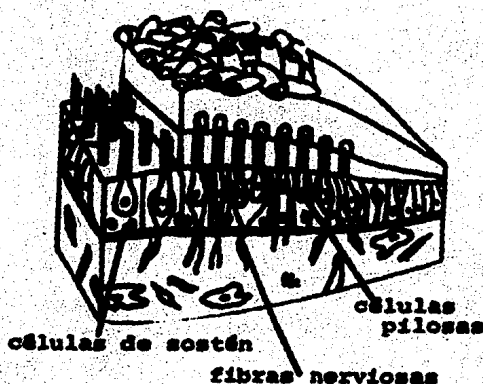


Fig.9. Esquema que representa el receptor otolítico (3).

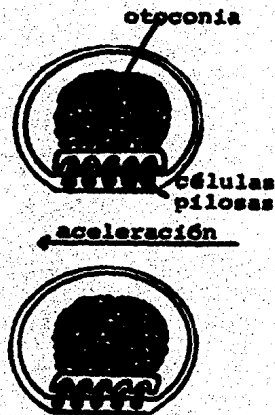


Fig.10. Representa los estímulos que recibe la mácula.

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

Se ha pensado que el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la transducción se encuentra asociado a canales iónicos presentes en los estereocilios. (2). En la célula pilosa hay -

siempre canales iónicos abiertos; cuando los estereocilios se doblan en dirección al cinocilio se abren más canales provocando la entrada de iones potasio (2) atraídos por el potencial negativo de la célula pilosa que cae a -40 milivolts. Si los estereocilios se doblan en dirección opuesta, los canales que inicialmente estaban abiertos son rápidamente cerrados y el potencial de membrana baja a -65 milivolts. Cuando los canales de transducción de la célula pilosa se abren, hay un cambio en el potencial de reposo de la propia célula que se extiende hasta su parte basal. El potencial ahora se denomina potencial receptor.

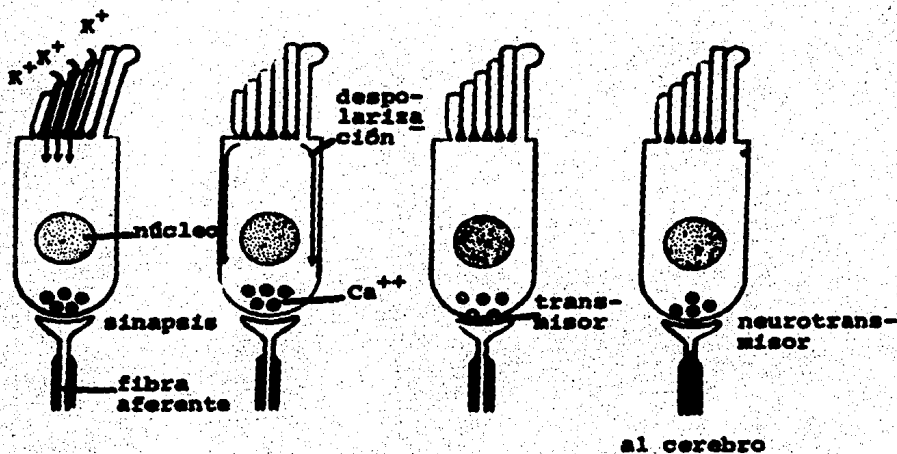


Fig.11 Representación esquemática de los eventos que desencadena un estímulo sobre el haz de estereocilios en la célula pilosa (2).

Este cambio de potencial provoca que se abran canales iónicos en la parte basal de la célula permitiendo selectivamente la entrada de Ca^{2+} . (fig.11).

Una vez que los iones calcio son admitidos en las células pilosas, por un fenómeno que aún se desconoce para estas células, esto ocasiona que un mensajero químico sea liberado a la región intersináptica. Cuando esta sustancia atraviesa este espacio y llega a la terminal nerviosa aferente, se une con los receptores específicos sobre la membrana de ésta y provoca una despolarización que produce un potencial de acción, transformándose así en una señal eléctrica (impulso nervioso) que viaja hacia el cerebro. (fig.11). A este tipo de sinapsis se les llama sinapsis química ya que están mediadas por un mensajero químico, que se denomina neurotransmisor. Existen evidencias de tipo morfológico y fisiológico de que la sinapsis tanto aferente como eferente a nivel vestibular son efectivamente de naturaleza química aunque se desconoce la identidad del mediador. (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18).

VIAS VESTIBULARES: Las vías nerviosas que conectan al aparato vestibular con el cerebro y la médula espinal, son complejas y no están tan bien rastreadas como lo están las de otros sistemas sensoriales; se sabe, sin embargo, que todas las señales nerviosas del nervio vestibular viajan inicialmente hacia uno de los dos destinos siguientes: el tallo cerebral, justo sobre la médula espinal, o al cerebelo, en la parte posterior del cerebro. Las fibras del nervio vestibular que llegan al tallo -

cerebral terminan en alguno de los cuatro grupos celular-nervioso llamados núcleos vestibulares: el superior, el lateral o de Deiters, el medio, el descendente ó inferior. (fig.12).

Tres de estos grupos neuronales, el medio, el lateral y el inferior reciben la mayoría de las terminaciones centrales de las fibras aferentes que inervan los órganos otolíticos (utrículo y sáculo) del laberinto. Las fibras nerviosas aferentes que inervan los canales semicirculares terminan principalmente en los núcleos vestibulares superiores, medio y lateral, pero muchas fibras continúan hasta el cerebelo. Además de estas vías vestibulares aferentes, los núcleos vestibulares también reciben fibras de la médula espinal, del cerebelo, del tallo cerebral y de centros superiores. (fig. 12) (6).

La porción vestibular del cerebelo ó arquicerebelo recibe fibras de los núcleos vestibulares superior, medio e inferior, además de un pequeño número de fibras directas del nervio vestibular. En dirección opuesta, las fibras del arquicerebelo terminan en el complejo nuclear vestibular. El papel del arquicerebelo en cuanto al mantenimiento del equilibrio, se efectúa a través de las vías que van de los núcleos vestibulares a las neuronas motoras bajas y mediante las conexiones reticuloespinales y cerebelorreticulares, que influyen en el tono muscular en el contexto de postura y locomoción. (fig.12).

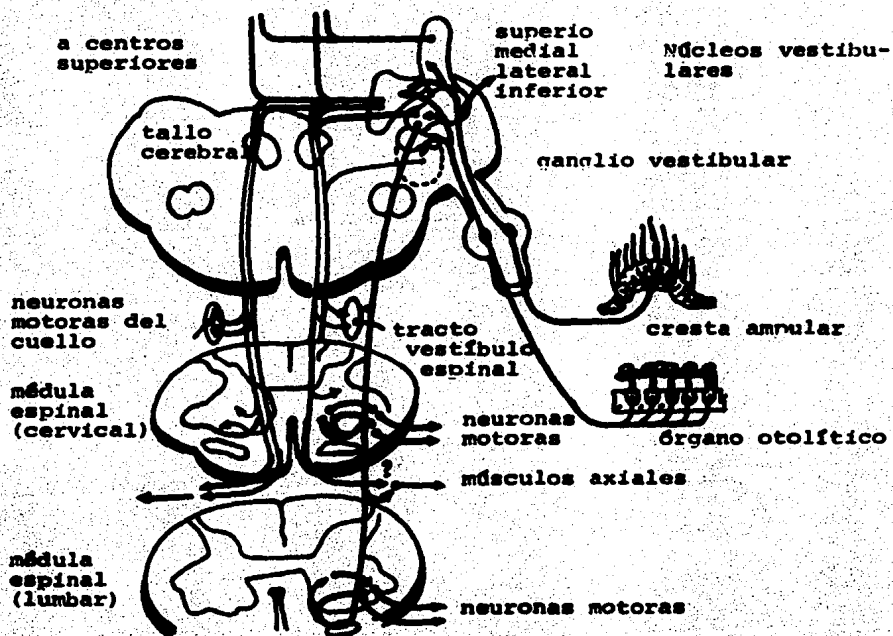


Fig.12 Esquema de las vías vestibulares.

VIAS INVOLUCRADAS EN LOS REFLEJOS VESTIBULARES

REFLEJOS ESPINALES: El tracto vestibular espinal que es directo se origina exclusivamente en el núcleo vestibular lateral. Las fibras atraviesan la médula oblongada detrás del núcleo olivar y continúan por el funículo anterior de la médula espinal. Las fibras vestibulo-espinales terminan en las neuronas motoras alfa y gamma en todos los niveles de la médula espinal, especialmente en las intumescencias cervical y lumbar. Este tracto es de primordial importancia para regular el tono muscular en todo el cuerpo a fin de mantener el equilibrio. (fig 13).

REFLEJOS OCULARES: Dentro del tallo cerebral en la porción ascendente dentro del fascículo longitudinal medio, las fibras que lo constituyen conectan los núcleos vestibulares con los núcleos de los nervios abductor, troclear y oculomotor. Las fibras del núcleo vestibular superior son directas en tanto que las de los núcleos lateral e inferior son cruzadas, y el núcleo vestibular medial contribuye con fibras para ambos fascículos. Esta parte del fascículo longitudinal medial proporciona movimientos sincronizados o conjugados de los ojos, coordinados con movimientos de la cabeza a fin de mantener la fijación visual. Dicha coordinación se basa principalmente en la información recibida por los núcleos vestibulares de los conductos semicirculares. (7).

La actividad vestibular también alcanza al tálamo, al colículo superior y otros centros superiores, pero la vía exacta --

aún no se conoce. (fig.14).

La integridad del aparato vestibular ha sido tradicionalmente evaluada por medición de los movimientos oculares (nistagmus) producidos en respuesta a la estimulación de las crestas ampulares, ya que los reflejos oculomotores en especial la fase lenta del nistagmus, son producidos como respuestas a estímulos vestibulares. (8).

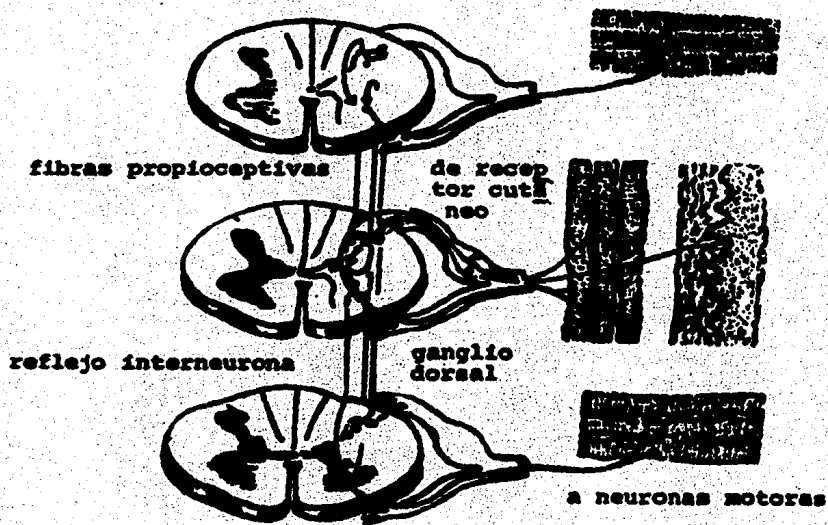


Fig.13 Representación esquemática del mecanismo efector espinal (6).

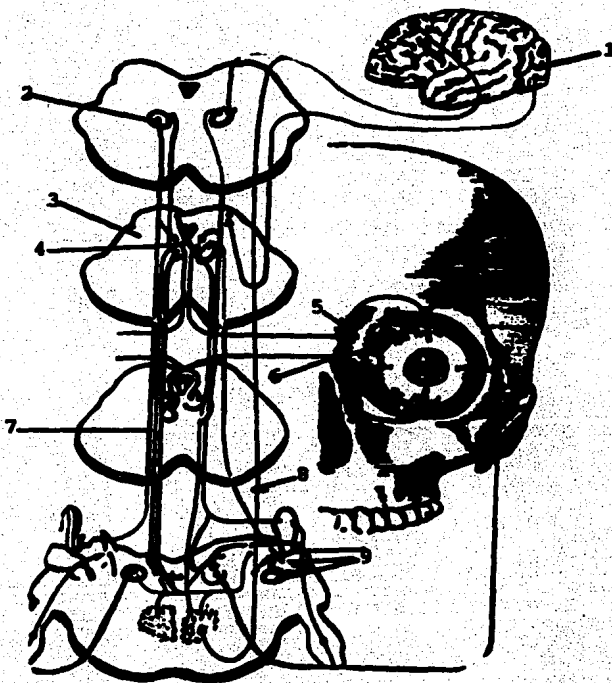


Fig.14 Reflejos oculares. Vías que participan en el control del movimiento de los ojos.

1 representa el campo occipital de los ojos, 2 el núcleo intersticial de Cajal, 3 el colículo superior, 4 el núcleo oculomotor, 5 nervio oculomotor III, 6 - nervio Troclear IV, 7 el núcleo troclear, 8 el tracto ascendente Deiters, 9 el núcleo vestibular.

NISTAGMUS: Consiste en un movimiento ocular sincrónico compuesto de dos fases: la fase lenta, en la que los ojos se mueven en forma progresiva semejante al movimiento de los ojos para enfocar un objeto y la fase rápida, en la cual hay un movimiento brusco (una rápida sacudida) de retorno de los ojos al punto en donde se inició la fase lenta. Por convención la dirección del componente rápido, es usado para especificar la dirección del nistagmus.

El nistagmus se caracteriza por diferentes parámetros: forma, dirección, frecuencia, intensidad y circunstancias en que se presenta, y estas características nos orientan en el diagnóstico.

En la mayoría de los casos el nistagmus se puede clasificar en dos categorías:

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

Nistagmus Vestibular: Es un nistagmus horizontal rotatorio, se origina por un estímulo prolongado y asimétrico en el receptor de un canal semicircular o por desórdenes neurológicos que inducen estimulación asimétrica de los núcleos vestibulares ó en la vía vestibulo cerebelosa. El nistagmus vestibular puede inducirse clínicamente, es una prueba muy importante de la función normal vestibular, y se le conoce como nistagmus calórico.

Cuando se inyecta, en el canal auditivo externo de un oído agua fría o tibia dependiendo de la orientación de la cabeza del paciente, el calor ó el frío producen una excitación prolongada sobre uno ó más canales semicirculares produciéndose así el nistagmus con el componente rápido en dirección opuesta al lado estimulado si se usa agua fría, y con dirección del oído estimulado si el agua está tibia. (9), (10).

Como hemos dicho, para que se produzca el nistagmus vestibular es necesario que la cresta ampular de un canal semicircular se estimule asimétricamente. La estimulación asimétrica se produce cuando uno ó varios canales semicirculares de un lado son excitados por una aceleración angular sostenida mientras que los del otro lado se inhiben. Por ejemplo, veamos lo que sucede cuando se presenta una aceleración angular horizontal hacia la izquierda: los impulsos del canal semicircular horizontal izquierdo excitan a las neuronas de los núcleos vestibulares lateral y medial izquierdos, mientras que los núcleos vestibulares del lado derecho reciben menos impulsos que lo normal de el canal semicircular horizontal derecho. Las neuronas de los núcleos vestibulares del lado izquierdo actúan excitando a las neuronas motoras que controlan a los músculos rectus medial izquierdo y rectus lateral derecho de los ojos y además, excitan al nervio abductor, VI par de los nervios craneales, que amplifica la excitación del músculo rectus medial izquierdo. Simultáneamente - las neuronas motoras que controlan los movimientos antagónicos de estos músculos están inhibidos por los núcleos vestibulares. Como los estímulos al canal semicircular continúan, el circuito

en los núcleos vestibulares y la formación reticular actúan como un integrador para producir un constante incremento en la señal excitatoria e inhibitoria que llega a las neuronas motoras extraoculares. Los ojos, entonces se mueven lentamente hacia la derecha.

Cuando la actividad vestibulo-oculomotor responsable de la fase lenta del nistagmus, llega a cierto nivel, es interrumpida abruptamente por el mecanismo de la fase rápida que regresa los ojos a su posición original. Este mecanismo depende de un grupo separado de neuronas que repentinamente se activan cuando el nervio oculomotor llega a un nivel de excitación alto. (fig.15), (6).

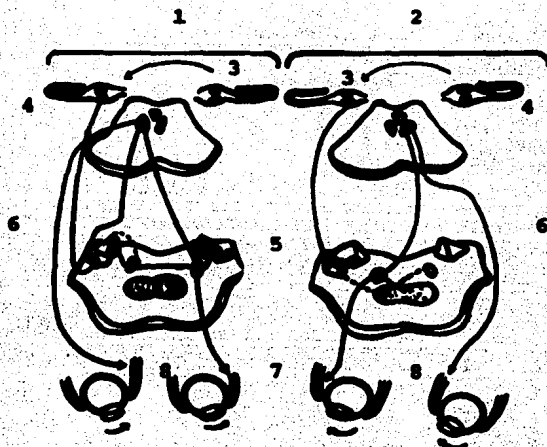


Fig.15 Esquema que representa las vías para la producción del Nistagmus. 1 representa la fase lenta, 2 la fase rápida, 3 la dirección de la aceleración, 4 los canales semicirculares horizontales, 5 los núcleos vestibulares, 6 los nervios oculomotor III, 7 el músculo rectus lateral, 8 el músculo rectus medial.

Localización de la lesión en humanos que se detectan con la prueba del nistagmus rotacional.

Cuando se realiza la prueba de nistagmus rotacional el reflejo ocular vestibular (VOR) se vé alterado en: lesiones vestibulo cerebelares bilaterales; en este caso el VOR se vé incrementado bilateralmente; en las lesiones del laberinto o del octavo nervio, el VOR se observa disminuido; en lesiones del lóbulo parietal unilateral, el VOR se encuentra normal. (10).

**REQUISITOS QUE SE SOLICITAN A UNA SUSTANCIA CANDIDATO
A NEUROTRANSMISOR**

Según Werman (19) los criterios que deben cumplirse para que una sustancia química sea aceptada como neurotransmisor -- son:

- 1) Presencia de enzimas determinantes de la síntesis del posible transmisor en la neurona que lo produce.
- 2) Presencia del transmisor propuesto en la neurona que lo produce y encontrarse potencialmente accesible para su utilización.
- 3) Liberación del transmisor. Durante la estimulación nerviosa la sustancia transmisora debe ser detectada en el fluido extracelular, de la región de la sinápsis activada.
- 4) Inactivación. Presencia de un sistema responsable de la eliminación del transmisor una vez efectuada su acción.
- 5) Identidad de acción. El transmisor propuesto debe inducir el mismo resultado que el transmisor natural en las células post sinápticas. Es decir, debe modificar a través de los mismos mecanismos la conducta iónica de la membrana.
- 6) Identidad farmacológica. Agentes que interactúan con los agentes sinápticos fisiológicos debe interaccionar con el -- transmisor propuesto de la misma forma.

En forma general, de los criterios anteriormente mencionados, los tres primeros pertenecen a la presinápsis y pueden medirse con métodos bioquímicos, en cambio, los otros tres tienen

que ver con la postsinapsis y se requieren técnicas de electrofisiología en su determinación, aunque el último de ellos también pudiera medirse bioquímicamente.

ANTECEDENTES QUE APOYAN AL GABA Y A LA ACETILCOLINA COMO NEUROTRANSMISORES EN EL VESTIBULO

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

- 1) Se ha encontrado síntesis de GABA a partir de glutamato en el vestibulo del pez, la rana, el pollo y el cuy, lo que implica la presencia de la descarboxilasa glutámica (GAD). (20), (31), (21), (22).
- 2) Presencia de un sistema de captación de alta afinidad de ^3H GABA en vestibulo de pollo. (23).
- 3) Presencia de un receptor de tipo postsináptico determinado bioquímicamente en el vestibulo del pollo. (24).
- 4) El GABA aplicado iontoforéticamente imita la acción del estímulo neuronal en el laberinto del gato. (25).
- 5) Las respuestas espontáneas y evocadas en el laberinto de la raya son inhibidas por picrotoxina (un inhibidor del receptor a GABA). (26).
- 6) La picrotoxina aplicada sistémicamente, bloquea los efectos del vértigo de origen periférico sensorial vestibular. (27).

Y para la acetilcolina:

- 1) Se ha demostrado actividad de la colinacetiltransferasa (CAT) en crestas aisladas de oído interno del pollo y del cuy y la aparición de esta actividad coincide con la llegada tardía de las fibras eferentes al epitelio durante el desarrollo. (28), (22).
- 2) Se ha demostrado actividad de colinacetiltransferasa (CAT) - en el oído interno de la rana. (31).
- 3) La presencia de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que degrada a la Ach, a nivel de la base externa de las células pilosas tipo II. (29).
- 4) Se ha demostrado histoquímicamente actividad de la AChE, en la cresta ampular, sáculo y utrículo en el oído interno de la chinchilla y el cuy. (30).
- 5) Se ha demostrado actividad de colinacetiltransferasa (CAT) la enzima que sintetiza acetilcolina, en las fibras eferentes de la línea lateral del pez y se han registrado potenciales inhibitorios postsinápticos imitados por Ach y bloqueados por tubocurarina. (26).

Estos hallazgos, como puede verse, cumplen con los criterios que debe llenar una sustancia química para ser aceptada como neurotransmisor.

La mayoría de las evidencias que apoyan al GABA y a la acetilcolina como neurotransmisores en el vestibulo, se han obteni-

do en peces, anfibios y aves; en mamíferos este tipo de estudio, a causa de la inaccesibilidad de su oído interno, existe solamente un reporte en donde estos dos mediadores participan en la neurotransmisión en el vestíbulo del cuy (22).

En el presente trabajo, hemos escogido otro modelo para aportar evidencias más numerosas que apoyan a la anterior. Para esto se usará el vestíbulo aislado de ratas pigmentadas (Long-Evans), en el cual se determinará la actividad de las enzimas sintetizantes de acetilcolina y GABA como criterio principal para postular a estos dos compuestos como candidatos a neurotransmisores en el vestíbulo.

Este criterio es importante, no sólo porque la velocidad de formación del neurotransmisor, como de cualquier metabolito, depende de la actividad de la enzima sintetizante, sino también -- porque la poza metabólica de la cual se liberan preferentemente los neurotransmisores al espacio sináptico es una poza de neurotransmisor recientemente sintetizado. Además la localización de las enzimas sintetizantes, desde el punto de vista de su distribución tanto regional como subcelular, se correlaciona bastante bien con la función sináptica del neurotransmisor.

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

camente del ectodermo, y es de esperarse que se comporten en forma similar a sus parientes las neuronas. (34).

PROPIEDADES DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD)

(Que como se ha dicho es marcador de neuronas GABAérgicas)

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



Como todas las descarboxilasas de aminoácidos, la GAD requiere de fosfato de piridoxal como coenzima: existen evidencias experimentales de que la enzima no está saturada con su coenzima ni in vitro ni in vivo, y de que gran parte de su actividad depende del fosfato de piridoxal libre. Esta coenzima parece ser un importante factor de la regulación de la actividad de la GAD. (34).

El glutamato, sustrato de la GAD, está fácilmente disponible, se conocen bien sus rutas de formación a partir de intermediarios del ciclo de Krebs, de las cuales la más importante parece ser la transaminación del cetoglutarato con otros aminoácidos particularmente el aspartato (transaminasa glutámico-oxalacética). Además existen evidencias de que hay una poza de glutamato derivada de la glutamina, que forma un compartimiento especial y que probablemente esté íntimamente relacionada con la poza liberable de GABA. (34). En cuanto al fosfato de piridoxal, se sintetiza a

partir de piridoxal y ATP por acción de la piridoxal cinasa. -- (34).

En las terminales GABAérgicas, el GABA es sintetizado por dos poblaciones diferentes de la GAD. Una de ellas es la enzima soluble, que solo depende de coenzima firmemente unida a la apoenzima y que sintetiza GABA a partir de una poza de glutamato -- formada preferentemente a partir de glutamina. El GABA formado de esta manera se libera por despolarización de la terminal, por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} . La segunda población de la GAD que se señaló, es aquella que se encuentra probablemente unida a la membrana presináptica in vivo, en presencia de K^+ y/o Ca^{2+} , y depende del fosfato de piridoxal libre. El glutamato que esta población de GAD usa como sustrato proviene probablemente del ciclo de Krebs. (fig.16).

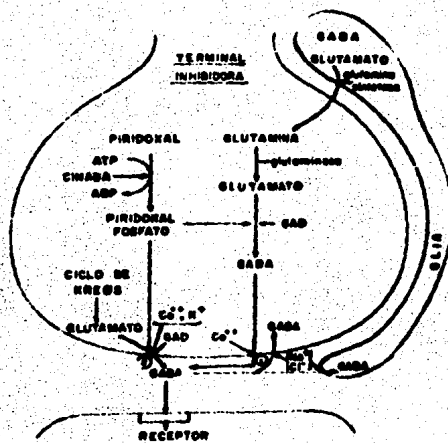
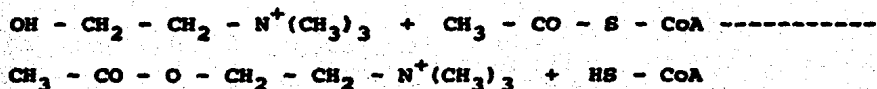


Fig. 16 Modelo bioquímico del funcionamiento de las sinapsis GABAérgicas (34).

PROPIEDADES DE LA COLINACETILTRANSFERASA (CAT)
(Marcador de neuronas ó sinapsis colinérgicas).

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



La colina para la síntesis de acetilcolina proviene del medio extracelular mediante un sistema de captura de alta afinidad dependiente de Na^+ . (36). En cuanto a la acetil-CoA que se usa para la síntesis de acetilcolina, proviene fundamentalmente del piruvato, aunque existen evidencias de que también puede formarse en pequeñas cantidades a partir del acetato y de citrato.

La síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato esta catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (CPDH). Puesto que la CAT es una enzima soluble que se encuentra en el citoplasma de las terminales sinápticas, y el CPDH ha sido localizado en las mitocondrias, se ha planteado el problema de cómo la acetil-CoA mitocondrial se hace accesible a la CAT citoplásmica, por lo que se han propuesto tres diferentes fuentes de acetil-CoA para la síntesis de acetilcolina (35):

- a) La acetil-CoA (intermitocondrial) es convertida en citrato el cual es transportado al citoplasma donde la ATP citratoliasa convierte al citrato a acetil-CoA y oxalacetato.
- b) La acetil-CoA por si misma puede ser transportada directamente ó difundir a través de la membrana mitocondrial.

c) La terminal nerviosa colinérgica contiene un CPDH soluble.

Estudios cinéticos de la CAT han demostrado que existen dos poblaciones diferentes, una soluble y la otra unida a la membrana (34), y por electroforesis se han encontrado diferentes formas moleculares en cerebro de rata, gato, conejo, ratón y mono, así como en el órgano eléctrico del pez torpedo que difieren sólo en su carga de superficie. (33).

Se ha visto que una de las propiedades de la CAT es que es activada por sales y se propone que el ión cloruro podría servir como un regulador específico. (fig.17), (34).

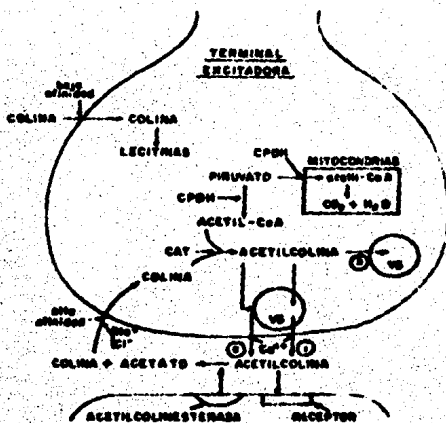


Fig. 17 Modelo bioquímico del funcionamiento de las sinapsis colinérgicas (34).

LOCALIZACION CELULAR DE LA GAD Y DE LA CAT

La demostración de la síntesis, tanto de GABA como de Ach - no es una prueba terminante para inferir su función neurotransmisi-va, sino que es necesario demostrar que su ubicación celular - corresponde a la función que se le atribuye.

Para determinar esta localización celular se pensó en aprovechar el efecto de alguna sustancia que dañara selectivamente - un tipo celular del vestibulo dejando intactos los demás.

El estado de hipotiroidismo congénito lo tomamos como un mo- delo natural que nos permite tener separada las poblaciones celu- lares vestibulares de las fibras nerviosas.

El propiltiouracilo (PTU), (2-tio-4-hidroxi-6-n-propil-piri- midina) un agente que produce hipotiroidismo congénito, retarda el desarrollo del epitelio sensorial, causando, entre otros efec- tos, un retardo en la llegada de terminales eferentes en la có- clea de la rata. (fig.18), (17), (36), (37).

El PTU, que se ha usado en la terapéutica como tratamiento del hipertiroidismo, actúa como una droga antitiroidea, y su me- canismo de acción es inhibir la formación de hormonas tiroideas interfiriendo en la incorporación de yodo a los residuos de tiro- silo de la tiroglobulina; también inhibe el acople de yodo tiro- silo para formar yodotironinas. Esto implica que interfiere en - la oxidación del ión yoduro y de los grupos yodotirosilo, pero - el mecanismo detallado todavía no está completo. Taurog (38), ha propuesto que inhibe la peroxidasa, impidiendo así, la oxidación del yoduro o grupos yodotirosilo al estado activo requerido. --

Cualquiera que sea el mecanismo exacto, la inhibición de la síntesis de la hormona produce con el tiempo deplesi6n de las reservas de tiroglobulina yodada cuando la proteina se hidroliza y -- las hormonas se liberan a la circulaci6n (38).

Aunque se conocen pocos datos acerca de la distribuci6n y - metabolismo de este compuesto, se cree en general que se degrada o excreta con r6pidez, lo que obliga a administrarlo a intervalos relativamente frecuentes. Es importante el hecho de que este fármaco sea capaz de atravesar la placenta e inhibir la funci6n tiroidea del feto. Tambi6n se excreta con la secreci6n mamaria y - puede ser transmitido por tanto a los ni6os lactantes. (39), (40).

La hormona tiroidea tiene un papel vital en el desarrollo - del sistema nervioso. El examen del cerebro de animales hipotiroides revela un desarrollo deficiente, particularmente de las redes ax6nicas y dendríticas; deja severos disturbios de sinaptog6nesis, neurotransmisi6n, mielinizaci6n, diferenciaci6n y migraci6n neural, as6 como un retardo en la maduraci6n de la glia -- (41), (42), (43). Los efectos m6s significativos de las hormonas - tiroideas tienen lugar durante el per6odo cr6tico de desarrollo del cerebro, cuando las neuronas empiezan a diferenciarse. Aunque cada neurona parece 6nica en su funci6n, todas las neuronas experimentan una transformaci6n morfol6gica com6n durante este per6odo.

HIPOFUNCION TIROIDEA: Un gran n6mero de anomal6as estructurales y funcionales pueden conducir a la producci6n deficiente de hormonas tiroideas. El estado cl6nico que se produce - se denomina hipotiroidismo (38). En este transtorno tiroideo la

deficiencia de hormona puede manifestarse a cualquier edad. En el adulto se habla simplemente de hipotiroidismo bocioso o particularmente cuando es severo, de mixedema. El hipotiroidismo rara vez aparece en el momento del nacimiento; la edad en que comienzan a manifestarse los síntomas depende del grado de afectación de la función tiroidea del niño. El hipotiroidismo intenso que comienza en la infancia se denomina cretinismo. El sello del cretinismo es el retraso del desarrollo mental y del crecimiento.

El cretinismo endémico es una alteración específica del desarrollo, que sucede en regiones de endemia bociosa muy intensa. Por lo general, ambos padres del cretino endémico son bociosos y el enfermo, además de o en lugar de las características clásicas del cretino descrito anteriormente, a menudo exhibe sordomudez y tiene trastornos de la función motora, que pueden ser hereditarios o bien, son el resultado de un aporte intensamente defectuoso de la hormona tiroidea materna durante la vida fetal precoz, antes que se inicie la función tiroidea del feto. Esto puede ser debido a que los agentes antitiroideos pasan fácilmente la placenta y se segregan en la leche materna; por ello, la administración de un agente antitiroideo a una mujer embarazada o lactante para el tratamiento de hipertiroidismo puede producir hipotiroidismo bocioso en el niño (40).

El tratamiento de este padecimiento consiste en la administración de hormonas tiroideas. Se cree que el agente de elección para la terapéutica es la L-tiroxina (T_4).

En forma general podemos decir que la depleción de la función tiroidea resulta en un retardo en el desarrollo del sistema

nervioso central. Estudios realizados de la interacción de la -- hormona tiroidea con la sección colinérgica del sistema nervioso, han dado evidencias experimentales sugiriendo que las hormonas - tiroideas podrían interferir en el sistema colinérgico modificando los potenciales de membrana, ya que la acetilcolina es importante en determinadas actividades eléctricas del músculo (44).

Otro efecto de la depleción de la hormona tiroidea, es la - pérdida de la función auditiva. Estudios morfológicos hechos en pollos y en ratones recién nacidos, han demostrado que el hipotiroidismo congénito puede llevar a anomalías en el órgano de Corti.(45),(46). En la rata, también se ha comprobado que un hipotiroidismo congénito inducido por PTU, resulta en una ausencia del principio de la función coclear y alteraciones estructurales en el órgano de Corti.(36),(37),(fig.18).

Se ha demostrado en ratones y en ratas hipotiroideas que estas anomalías no ocurren si a los animales previamente tratados con PTU, se les administra pequeñas dosis de tiroxina (47), durante el período normal del desarrollo coclear. Ahora 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 - (47),(48).

Estudios previos de microscopía electrónica hechos en coclea, han demostrado que inyecciones de bajas dosis de T_4 , aplicadas - durante períodos apropiados del desarrollo, enteramente corrigen algunas de las anomalías estructurales inducidas por PTU. - (48).

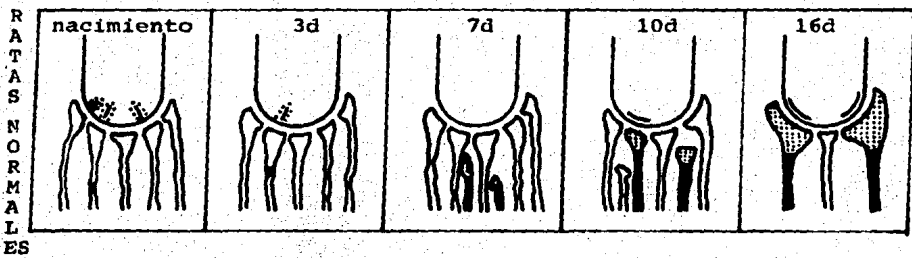
Con respecto a la porción vestibular, en una especie tan in

madura como es la rata al nacimiento en la cual la función tiroidea comienza en el día 18° de gestación, el rápido incremento en los niveles de hormona tiroidea coincide con una fase importante en el desarrollo morfológico y funcional de los receptores vestibulares. (39), (49).

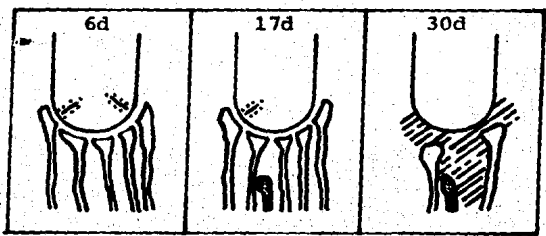
En el vestibulo, el hipotiroidismo lleva a disturbios en la maduración de estos receptores afectando la diferenciación de las células pilosas. El retraso en la maduración del epitelio sensorial se observa ya al nacimiento y persiste a la edad de 33 días. A esta edad, los receptores vestibulares en animales hipotiroideos, especialmente en la parte inferior de la cresta y en la periferia de la mácula utricular, aún exhiben marcados signos de inmadurez. Además se observa cálices no desarrollados, uniones sinápticas inmaduras y la persistencia de sinapsis eferentes axo somáticas en contacto con las células tipo I, que en animales normales son transitorias. El más importante resultado del hipotiroidismo fué la persistente inmadurez de los contactos sinápticos. (fig.18).

Aprovechando entonces que en el hipotiroidismo el vestibulo se encontraría, esencialmente, en ausencia de contactos sinápticos maduros y sólo con células pilosas que han alcanzado la madurez, en el presente trabajo se determinaron tanto la GAD como la CAT en vestibulos aislados de ratas Long-Evans.

El razonamiento de estos experimentos sería que al medir -- las dos enzimas se esperaría encontrar ambas en los vestibulos normales, pero al medirlas en las estructuras vestibulares de ratas hipotiroideas se debería observar una disminución de aquella



RATAS
HIPOTIROIDEAS.



- terminales aferentes
- terminales eferentes
- cuerpo sináptico
- especialización postsináptica
- substancia amorfa
- d días después del nacimiento

Fig. 18. El PTU, un agente que produce hipotiroidismo congénito, retarda el desarrollo del epitelio sensorial, causando, entre otros efectos, un retardo en la llegada de terminales eferentes.

enzima que se encontrara en las terminales sinápticas (que en -- nuestros postulados sería la CAT) mientras que la que se encontra en las células receptoras, que no son afectadas por el hipotiroidismo (que se postula ser la GAD) no debería sufrir modificaciones.

Esto trató de apoyarse realizando la terapia de reemplazo hormonal con L-tiroxina (T_4) a animales previamente tratados con PTU, con lo que se esperaba una reversión de los efectos del -- PTU.

Además, se siguió el efecto del hipotiroidismo sobre el estado general de salud de los animales, y se efectuaron mediciones del nistagmus, que en la clínica es un reflejo de la función vestibular.

Los experimentos realizados y los resultados obtenidos se describen a continuación.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron ratas (machos y hembras) sanas pigmentadas (Long-Evans) de 13,14,23,26,30,35,38,44,49,50 días de edad, (32), 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 de IMSS.

TECNICAS DE DISECCION

Fueron implementadas en el laboratorio arriba mencionado, para lo cual se abrió el cráneo sagitalmente, se extrajo totalmente el cerebro, se separaron las bulas auditivas del hueso temporal y bajo el microscopio estereoscópico se extrajo el vestíbulo completo (los canales semicirculares conteniendo las crestas ampulares; el utrículo, y el sáculo) los cuales se recibieron en el medio de reacción enfriado con hielo.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD

La actividad de la descarboxilasa glutámica se determinó por el método de Wayne y Brady (50) con algunas modificaciones: FUNDAMENTO: La GAD cataliza la descarboxilación del grupo carboxilo 1 del glutamato formando GABA y CO_2 . En nuestro ensayo se usó como fuente de la enzima el tejido vestibular homogenado el cual se incubó con ácido glutámico marcado con carbono 14 en el carbono 1 y fosfato de piridoxal; el CO_2 marcado que se desprende en la reacción se capturó en una base fuerte y se midió la -

radiactividad en un contador de centelleo líquido

REACTIVOS:

- 1.- Solución amortiguadora de KH_2PO_4 (MCR), 0.2M, pH 7.3, 1.361 g/50 ml.
- 2.- Fosfato de piridoxal (SIG), 10^{-4} M (final) 0.013 g/5ml
- 3.- Mercaptoetanol (SIG), 10 mM (final) 0.1755 ml/25ml
- 4.- Acido L-glutámico (SIG) 10 mM (final) pH 7.3 0.2646 g/50 ml
- 5.- Acido L (1- ^{14}C) glutámico (New England Nuclear, Chicago USA) 0.48 μCi (final), 0.08 ml/0.5ml, actividad específica 49.6 mCi/nmol.
- 6.- Liquifluor 250 ml (1g de 2.5 difeniloxazol (SIG) 0.0125 g de 1,4 bis 2-5 fenilaxazol) en 250 ml de tolueno (J.T.B.M.)
- 7.- H_2SO_4 (J.T.B.M.) 3.6 N, 9.8 ml/100ml de H_2O .
- 8.- Hidróxido de hiamina en metanol 1M (AMER)

Clave de la fuente de reactivos:

SIG.- Proveniente de la compañía Sigma, San Luis Missouri, E.U.A.

J.T.B.M.- J.T.Baker, México.

AMER.- Amersham International plc.

PROCEDIMIENTO:

Se siguió esencialmente el que indica en la fig. 19 y que aquí se detalla, para lo cual una vez que se hubo extraído el vestibulo total de los dos oídos internos de cinco ratas, se recibió en un tubito de 1 ml sumergido en hielo que contenía el medio de reacción el cual esta constituido por:

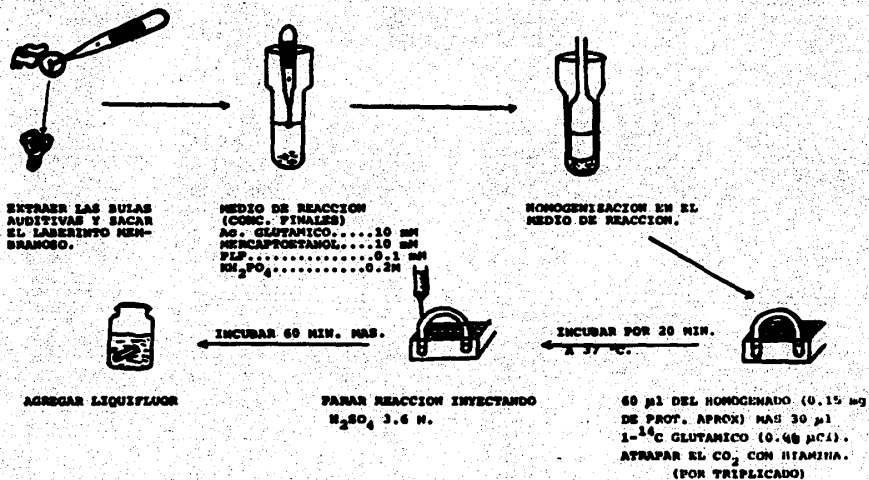


Fig.19 Esquema que representa el procedimiento para determinar la actividad de la GAD.

	VOLUMEN ADICIONADO	CONCENTRACION FINAL
Acido L glutámico	250 μ l	10 mM
Mercaptoetanol	100 μ l	10 mM
Fosfato de piridoxal	50 μ l	10^{-4} M
Sol. amortiguadora de fosfatos	200 μ l	0.2 M
Volumen total 600 μ l		

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

Se colocaron 60 μ l de este homogenado y 30 μ l de ácido -- L (1- 14 C) glutámico (0.48 μ Ci) en tubos de 3 mm de diámetro y 30 mm de largo, obteniendo un volúmen total de 90 μ l por tubito, - de la manera siguiente:

TUBO #	Ac. L(1- 14 C) glutámico 30 μ l	H ₂ SO ₄ 0.1 ml	HOMOGENADO 60 μ l
1		—	
2 problemas		—	
3		—	
4			
5 blancos			
6			

A los blancos se les agregaron 100 μ l de H₂SO₄ 3.6 N, al inicio para detener la reacción al tiempo "cero". Una vez que se agregó el homogenado, se agitó la mezcla en un agitador tipo vortex y cada tubito se conectó mediante una manguera de hule de --

10 cm de longitud a otro tubito que contenía 0.1 ml de hidróxido de hiamina. Se incubó inmediatamente a 37°C por 20 minutos, con agitación. Cada determinación se realizó por triplicado. Se detuvo la reacción inyectando a través de la manguera 0.1 ml de H₂SO₄ 3.6 N, Se post-incubó por 60 minutos más para que se desprendiera todo el CO₂ y se equilibrara la reacción. Pasado este tiempo, los tubitos que contenían la hiamina se depositaron en frascos - viales con 8 ml de liquifluor y mediante una varilla de vidrio - se hizo salir la hiamina del tubito para que se mezclara con el líquido de centelleo. Se dejó reposar por 24 horas en la oscuridad y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido modelo MINAXI TRI-CARB 4000 series UNITED TECHNOLOGIES - PACKARD., dos minutos en el canal de carbono catorce. El homogenado sobrante se guardó en refrigeración para la determinación de proteínas.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CAT.

La actividad de la CAT se determinó por el método de Fonnum modificado por Meza y López (1984). (51), (52).

FUNDAMENTO: La CAT cataliza la transferencia del grupo acetilo - de la acetil-CoA, a la colina formando acetilcolina y coenzima-A reducida. En nuestro ensayo se usó como fuente de la enzima el -- tejido vestibular homogenado, el cual se incubó en una solución - amortiguadora que contenía acetil coenzima-A marcada con tritio en el acetato, y colina. La acetilcolina marcada que se formó en la reacción se midió en un contador de centelleo líquido.

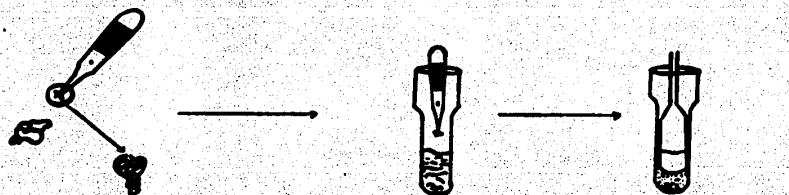
REACTIVOS:

- 1.- Solución amortiguadora de NaH_2PO_4 (M.R.C.) 0.038 M, pH 7.4, 2.626 g/500ml
- 2.- NaCl (Mallinckrodt, México) 3.6 M, 21 g/100ml
- 3.- EDTA (SIG) 0.066 M, 2.457 g/100ml ajustado a pH 7.4 con -- NaOH.
- 4.- Sulfato de eserina (SIG) 1 mM, 3.82 mg/5ml EDTA, pH 7.4
- 5.- Cloruro de colina (SIG) 0.2 M, 0.46 g/10ml
- 6.- Tritón x-100 (SIG) 10% (1 ml de tritón + 9 ml de H_2O)
- 7.- Tetrafenilborato (SIG) 500 mg en 100 ml de acetonitrilo (J.T. B.M.)
- 8.- Liguifluór 500 ml (2g de 2-5 difeniloxazol (SIG) 0.025 g - de 1,4 bis 2-5 feniloxazolil) benceno; 2,2 p-fenileno bis (5-feniloxazol) (SIG), en 500 ml de tolueno (J.T.B.M.)
- 9.- s-acetil-coenzima A (SIG) 0/6 mM, 0.00121 g/1 ml H_2O
- 10.- Coenzima A acetil ^3H -Acetil (New England Nuclear, Chicago USA) 0.05 mCi/0.5 ml, actividad específica 49.6 mCi/mmol, en solución acuosa.

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

PROCEDIMIENTO:

En la fig. 20 se esboza y se detalla como sigue: una vez que se extrajo los vestibulos totales de los dos oídos internos de dos ratas, se recibió en un vaso de precipitados de 5 ml sumergido en hielo que contenía el medio de reacción el cual estaba constituido por:



ENTRAER LAS BULAS AUDITIVAS Y SACAR EL LABERINTO MEMBRANOSO.

MEDIO DE REACCION (CONC. FINALES)

NaCl.....	300mM
EDTA.....	10mM
CLORURO DE COLINA.....	10mM
NaN ₃ PO ₄	10mM
TRITON.....	0.05%
ESERINA.....	0.1mM

HOMOGENEIZACION EN EL MEDIO DE REACCION.

46



PARA LA REACCION POR DILUCCION CON BUFFER FRIO.



PARA SEPARAR EL ³H-ACETIL COA QUE NO REACCIONA DE LA

³H ACETIL COLINA . SE LE AGREGAN 2 ml DE TETRAFENIL BORO EN ACETONITRILLO. AGREGAR LIQUIDO DE CENTIFUGO.

136 μl DEL HOMOGENIZADO MAS 50 μl DE ³H ACETIL COA (0.02 μCi Y SE INCUBA POR 15 MIN. A 37 °C) SE HACE POR TRIPLICADO.

Fig. 20. Esquema que representa el procedimiento para determinar la actividad de la CAT.

	Conc. inicial	Vol. adicionado	Conc. final por tubo
NaCl	3.6M	250 μ l	300mM
NaH ₂ PO ₄	0.0388M	250 μ l	10mM
Sulfato de eserina	0.001M	200 μ l	0.1mM
EDTA	0.066M	500 μ l	10mM
Cloruro de colina	0.200	150 μ l	10mM
Tritón x100	10%	10 μ l	0.05%
	Volumen total	1360 μ l	

El medio de reacción que contenían los vestíbulos completos, se pasó a un homogenizador de vidrio y se homogenizó con 20 golpes a 550 rpm con un pistón de teflón.

Se midieron 136 μ l de este homogenado y 50 μ l de acetil -- ³H-CoA (0.1 μ Ci) en tubos de 3mm de diámetro por 30 mm de largo, obteniendo un volumen total de 186 μ l por tubo, de la manera siguiente:

TUBO	Acetil ³ H-CoA 50 μ l	Homogenado 136 μ l
1		
2 blancos		
3		
4		
5 problemas		
6		

Una vez que se colocó la acetil ³H-CoA, se agitó la mezcla con un agitador tipo vortex y se incubaron inmediatamente los tubos a 37°C, por 15 minutos con agitación. Cada determinación se realizó por triplicado; se detuvo la reacción por dilución al a-

agregar 10 ml de la misma solución amortiguadora de fosfatos usada en la reacción, pero enfrida en hielo, en una jeringa hipodérmica, teniendo previamente el tubo con la mezcla de reacción en un frasco vial. Se le agregaron 2 ml de Kalignost (tetrafenilborro) en acetonitrilo y 8 ml de liquifidor. Se efectuó la misma operación con los tubos blancos excepto que la reacción se detuvo a tiempo "cero". Tanto los problemas como los blancos se dejaron reposar 24 horas en la oscuridad y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido modelo MINAXI TRI-CARB 4000 series UNITED TECHNOLOGIES PACKARD, dos minutos en el canal de Tritio. El homogenado sobrante se guardó en refrigeración para realizar la determinación de proteínas.

DETERMINACION DE PROTEINAS: La concentración de proteínas de cada homogenado se determinó por el método de Lowry y Col (53), usando albúmina sérica bovina como estandar y llevando a cabo el análisis en un espectrofotómetro marca Beckman Modelo DU-6.

LOCALISACION CELULAR

Se usó Propiltiouracilo (PTU) (2-tio-4hidroxi-6-n-propil-pirimidina), (SIG).

El hipotiroidismo fue inducido en ratas preñadas a partir del 17° día de gestación, por la administración diaria de 50 mg de propiltiouracilo (PTU), disuelto en el agua de los bebederos.

Dosis del PTU: Para obtener el dato de agua total que bebían las ratas preñadas a partir del 17° día de gestación, se hizo un grupo de 8 ratas y al inicio de este período se midió el

volumen de agua bebida diariamente y en forma individual, y se administró el promedio (tabla 1). El dato que se obtuvo fue de 160 ml diariamente, en los cuales se disolvió el PTU.

Alimento ingerido: Para averiguar si el PTU provocaba algún cambio en los hábitos alimenticios, se llevó un control en peso, de la comida que ingerían (tabla 1).

Dado los resultados obtenidos, concluimos que el PTU no causaba perturbación en su apetito.

Tiempo de gestación: Para determinarlo con precisión, y sabiendo que una rata tiene un periodo gestacional de 21 días, se tomaba como día 0 el día en que el macho se ponía con tres hembras; a partir de este día se empezaba a llevar un control del peso de la hembra, y se encontró que había un aumento lineal de éste con respecto al tiempo (gráfica 1), por lo que se extrapoló de la gráfica el día 17° de gestación. Este control se llevó a cabo tanto en las hembras a las que se les administró el PTU, como a las que sirvieron de control.

Tratamiento con PTU. Este fue iniciado en el día 17° de gestación y continuado durante la lactancia, permitiendo que tanto las madres como las crías bebieran de la botella conteniendo el fármaco, hasta el día 38 de vida postnatal.

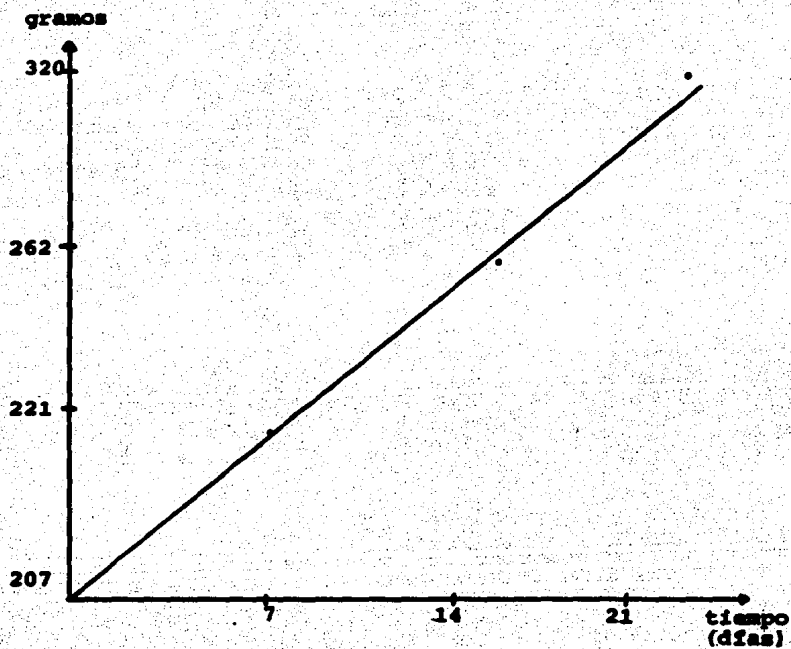
Las ratas control y las ratas tratadas con PTU eran de la misma edad. Al terminar el tratamiento se hicieron determinaciones tanto de GAD como de CAT en ambos grupos, (control y tratados).

Terapia de reemplazo hormonal: Para realizarla se usó L-tiroxina (SKI). Esta terapia consistió en administrar L-tiroxina -

TABLA 1
CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA

	CONTROL	PTU
ALIMENTO (gr)	30	28
AGUA (ml)	159.3	162.4

LOS DATOS REPRESENTAN EL PROMEDIO DE UN GRUPO DE 5 RATAS CONTROL Y 5 RATAS TRATADAS CON PTU A LAS QUE SE LES DETERMINO EL PESO -- DEL ALIMENTO INGERIDO Y EL VOLUMEN DE AGUA BEBIDA, A PARTIR DEL DIA 17^o DE GESTACION HASTA EL NACIMIENTO DE LAS CRIAS, DIARIAMENTE.



Gráfica I. Curva que nos muestra el aumento de peso de las ratas preñadas. Los puntos representan el promedio de un grupo de 8 ratas.

inyectada intramuscularmente, a ratas crías tratadas con PTU, durante un período crítico de su desarrollo vestibular, que en la literatura se ha descrito ser entre los 12 y los 17 días de la vida post natal (48).

La dosis de hormona administrada depende de la edad del animal (días) y fue calculada de los datos obtenidos por Vigouroux, cuya tabla aparece en el trabajo hecho por Uziel y Legrand (47).

Edad (días)	Dosis de T_4 (ug)
3	0.040
4	0.050
6	0.086
7	0.110
9	0.160
10	0.172
11	0.192
13	0.200
14	0.207
15	0.213
16	0.218
17	0.223
18	0.226
19	0.230

La hormona se empezó a administrar a partir del 12° día de vida post natal, diariamente, hasta el día 38 en que se sacrificaron los animales para realizar las determinaciones de GAD y CAT.

Para hacer este experimento se utilizaron 3 grupos de animales donde un grupo fue el control, esto es, no se le administró PTU ni se inyectó T_4 , otro fue el grupo PTU- T_4 y al otro sólo se le administró PTU.

Prueba de Nistagmus Rotacional; Para hacer las determinaciones de esta prueba, se usó un aparato con un disco giratorio integrado cuyo mecanismo permitía controlar la velocidad de giro, esto es, las revoluciones por minuto (rpm). La prueba se le hizo a tres grupos de ratas, un grupo control, uno PTU y otro PTU- T_4 , a las edades de 23, 26 y 49 días. Cada grupo consistía de tres animales y las determinaciones se hicieron en presencia de luz y en ausencia de luz, ambas por triplicado. Esta prueba consistió en poner al animal sobre el disco giratorio, aplicar una velocidad de 45 rpm en un período de 25 vueltas, parar el aparato y contar el número de movimientos nistágmicos que se presentaran midiendo el tiempo de duración de dichos movimientos.

Nota: La velocidad y el número de vueltas se escogieron -- después de haber hecho una serie de experimentos a diferentes -- rpm y diferentes número de vueltas y observar que con estos parámetros eran con los que se obtenían datos sumamente reproducibles.

RESULTADOS

El valor obtenido en las determinaciones de GAD en los homogenizados del vestíbulo de rata de 38 días es el resultado de 3 experimentos, y fue de 21.6 nanomoles/hora/mg. de proteína (tabla 1). El dato que se obtuvo en las determinaciones de CAT es el resultado de 4 experimentos y fue de 72 picomoles/minuto/mg. de proteína (tabla 1).

Para asegurarnos que tanto la GAD como la CAT habían alcanzado sus niveles máximos a los 38 días en la rata, se midieron ambas actividades en el vestíbulo de la rata durante el desarrollo. Al medir la actividad de la GAD a diferentes edades que van desde 13 días hasta 44 días del desarrollo postnatal (DPN), obtuvimos una gráfica que se muestra en la fig. 1 en donde vemos que la actividad de la enzima se incrementa gradualmente al ir aumentando la edad del animal. Sin embargo, de los 38 días en adelante sus niveles prácticamente se mantienen constantes.

Cuando se midió la actividad de la CAT a diferentes edades (las mismas de la GAD), se obtuvo una gráfica que se muestra en la fig. 2, y aquí observamos que la actividad de la CAT es prácticamente indetectable hasta el día 16 del DPN de la rata y aumenta súbitamente el día 17 del DPN incrementándose paulatinamente de ese día en adelante; además se observa que a partir del día 38 la actividad enzimática mantiene sus niveles en forma constante.

Cuando a las ratas preñadas se les administró PTU, los animales de su descendencia presentaron una alteración de su estado

general, que se manifestó días después del nacimiento, y que fue desde pérdida del sentido del equilibrio (los animales al caminar lo hacían con movimientos lentos y torpes) hasta disminución del peso corporal (fig 3).

Entre estas alteraciones se observó, que los animales provenientes de ratas tratadas con PTU (que en adelante llamaremos hipotiroideos) tardaron en promedio 4 días más en abrir los ojos - que los control, además el conducto auditivo externo permanecía obstruido hasta el día 23, siendo que en los controles éste conducto se abre en el día 17 del DPN.

En las determinaciones del nistagmus, en los animales hipotiroideos se observó un incremento gradual de la frecuencia de éste, especialmente en el medido en ausencia de luz, mientras que en las ratas control se mantiene constante (tabla II). Con respecto a su reflejo de enderezamiento, éste es casi normal los animales sólo tardan en enderezarse 1 segundo más que los controles.

Al determinar las actividades enzimáticas en los vestíbulos de los animales hipotiroideos, se obtuvo una actividad enzimática de la CAT de 43.62 pmoles/minuto/mg. de proteína, que con respecto al control, que fue de 72.7 pmoles/minuto/mg. de proteína, se observa un decremento del 60%. La actividad de la GAD no se modificó (tabla III).

Para determinar la especificidad del efecto del PTU sobre el oído interno se realizaron determinaciones de la actividad de la GAD y de CAT en cerebro de animales hipotiroideos, (tabla IV), y se observa que ninguna de las dos enzimas se ve afectada por -

el tratamiento con PTU ya que la actividad no cambia en los animales tratados con respecto a su control.

Cuando se llevó a cabo una terapia de reemplazo hormonal en la cual a los animales hipotiroideos se les administró tiroxina - simultáneamente al tratamiento con PTU, (paralelamente se efectuó un experimento con PTU y uno control), (tabla III), no se obtuvo -- ninguna alteración de la actividad de la CAT pues ésta era de -- 65.43 pmoles/min/mg de proteína, lo que representa un 90% con respecto a su control. Tampoco se vio ninguna diferencia en la actividad de la GAD comparada con el control.

Para ver el efecto del PTU sobre el comportamiento de las en simas un tiempo más prolongado, se realizó un experimento en las mismas condiciones que el anterior (con tres grupos de animales) - pero a los 50 días de edad. A este tiempo el decremento de la actividad de la CAT en los vestibulos de los animales hipotiroideos con respecto al control fue de un 67%, mientras que la actividad de la GAD tampoco se modificó. En el experimento de la terapia de reemplazo hormonal, se obtuvo una actividad enzimática de la CAT de un 91% con respecto al control (tabla III).

El efecto del tratamiento con PTU sobre el aumento de peso - de los 3 grupos de animales: grupo control, PTU y PTU-T₄, se muestra en la fig. 3.

En esta gráfica, podemos observar que los animales de los 3 grupos incrementan su peso en forma esencialmente igual hasta los 14 días de edad. A partir de ese día, los animales del grupo control aumentan de peso casi en forma logarítmica. Este mismo efecto puede verse en los animales a los cuales se les hizo el trata-

miento de reemplazo hormonal, pero en éste el aumento se vé retra
sado alrededor de 8 días. En cambio, los animales hipotiroideos -
conservaron el mismo peso desde los 14 días de edad hasta el fi--
nal del experimento.

TABLA I

ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA Y DE LA COLINACETILTRANSFERASA EN EL LABERINTO DE LA RATA DE 38 DIAS DE EDAD.

ENZIMA	ACTIVIDAD*
GAD	21.6 ± 0.68 (3)
CAT	72.0 ± 2.0 (4)

*EXPRESADA COMO nMOLES/HORA/mg DE PROTEINA (GAD), Y pMOLES/MIN/ mg DE PROTEINA (CAT).

+ ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO DEL NUMERO DE EXPERIMENTOS POR TRIPLICADO INDICADO EN EL PARENTESIS.

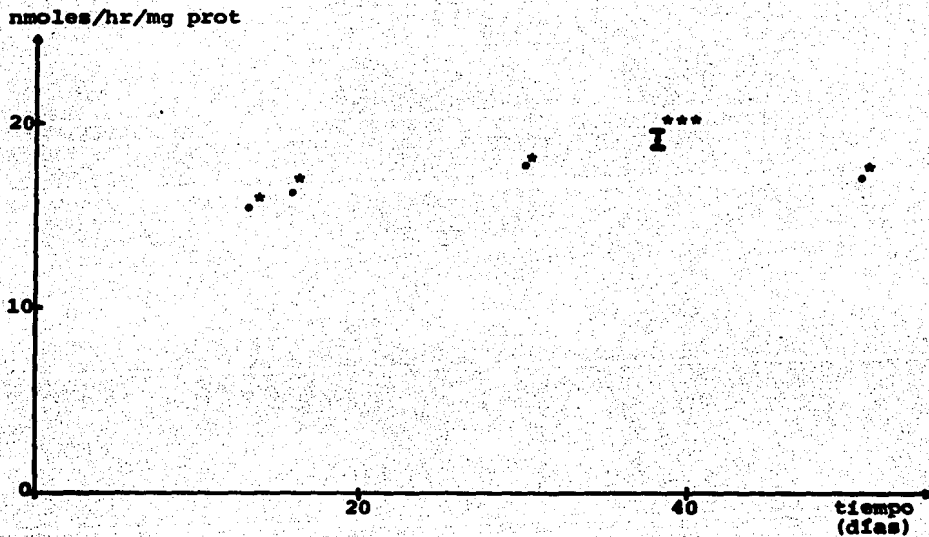


Fig.1. Curva de actividad de GAD en función del tiempo.

Los valores están expresados en nmoles/hr/mg de proteína.

Los * representan el promedio de 2 experimentos realizados por triplicado.

Los *** representan el promedio de 4 experimentos realizados por triplicado, siendo la barra el error estandar.

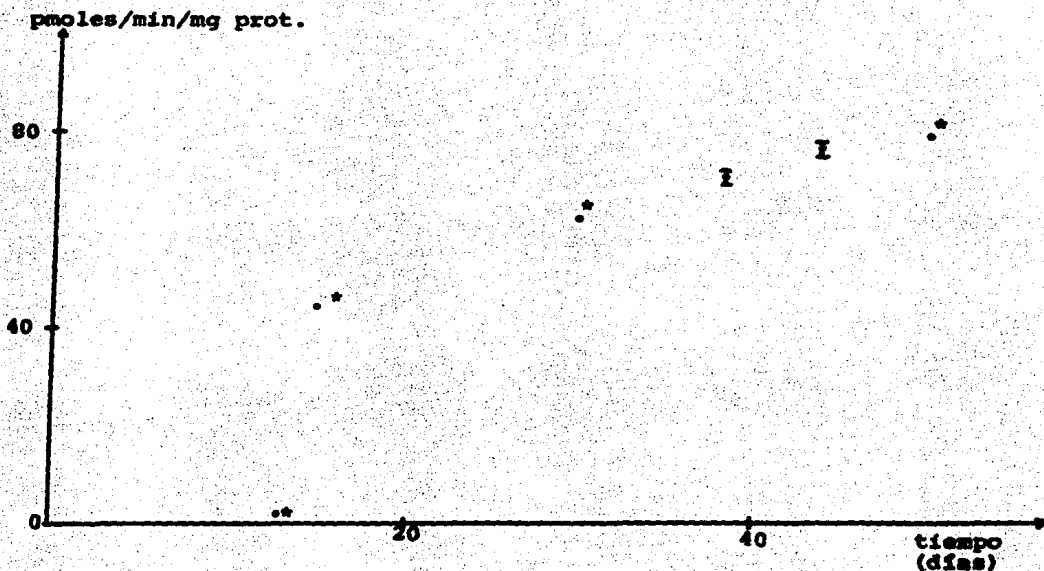


Fig.2. Curva de actividad de CAT en función del tiempo.

Los valores están expresados en pmoles/min/mg de proteína.

Los * representan el promedio de 2 experimentos efectuados por triplicado.

Los demás representan el promedio de 4 experimentos efectuados por triplicado, siendo las barras el error estándar.

TABLA II

DETERMINACION DE NISTAGMUS

EDAD		CONTROL	PTU	PTU-T ₄
23 días	c/L	17.88 ± 0.76 (9)	19.88 ± 0.74 (9)	
	s/L	19.55 ± 0.72 (9)	20.0 ± 0.6 (9)	
26 días	c/L	18.0 ± 0.8 (9)	21.11 ± 1.0 (9)	
	s/L	22.3 ± 0.6 (9)	23.8 ± 0.69 (9)	
49 días	c/L	18.33 ± 0.68 (9)	23.66 ± 1.59 (9)	18.0 ± 0.23 (9)
	s/L	15.09 ± 0.59 (9)	24.66 ± 1.5 (9)	15.0 ± 0.20 (9)

ESTOS DATOS SE OBTUVIERON DESPUES DE 25 VUELTAS A 45 rpm.

± ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO DEL NUMERO DE EXPERIMENTOS INDICADO EN EL PARENTESIS.

c/L = con luz.

s/L = sin luz.

LOS VALORES INDICAN LA FRECUENCIA DE MOVIMIENTOS NISTAGMICOS. (MOVIMIENTOS/TIEMPO).

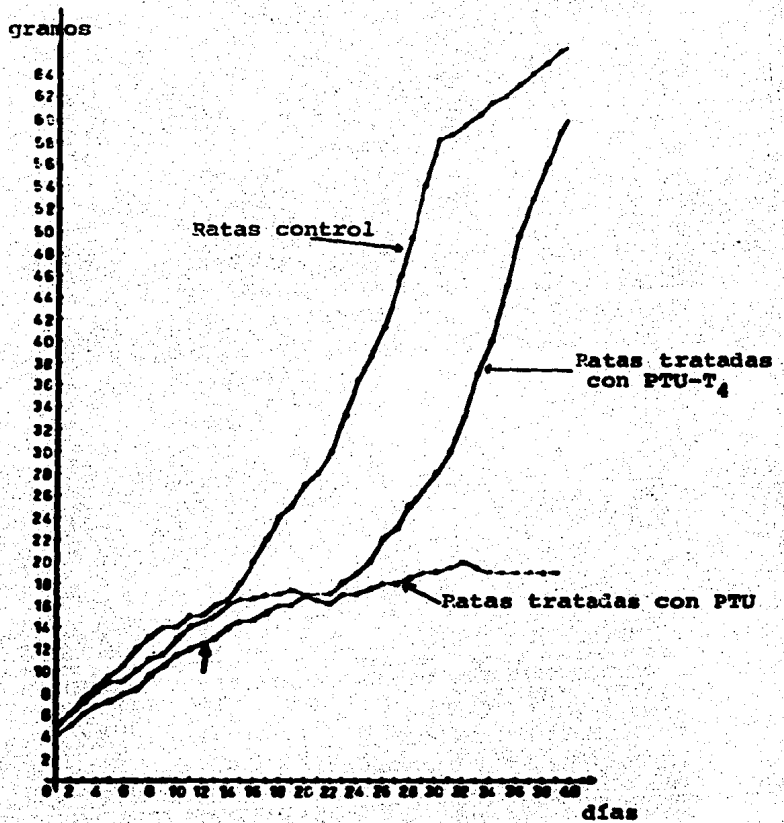


Fig.3 Gráfica del aumento de peso de las ratas contra el tiempo.

↑ Inicio de la terapia de reemplazo.

TABLA III

ACTIVIDAD DE LA GAD Y DE LA CAT EN EL LABERINTO DE RATAS CONTROL, RATAS HIPOTIROIDEAS (HT) Y RATAS HT TRATADAS CON T₄ A LOS 38 Y 50 DIAS DE EDAD.

A C T I V I D A D						
EDAD	ENZIMA	CONTROL	HT	HT-T ₄		
38	GAD	19.83± 0.57(5)	19.2 ±0.62(4)	20.18	(2)	
38	CAT	72.7 ± 3.8 (4)	43.62±2.5 (4) (60)*	65.43±3.8(4) (90)**		
50	GAD	17.33 (2)	18.86 (1)	16.4	(2)	
50	CAT	79.2 (2)	53.7 (2) (67)*	72.4	(1) (91)**	

LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ESTA EXPRESADA COMO nMOLES/HORA/mg DE PROTEINA PARA LA GAD, Y pMOLES/MIN./mg DEPROTEINA PARA LA CAT.

± ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO DEL NUMERO DE EXPERIMENTOS POR TRIPLICADO INDICADO EN EL PARENTESIS.

* PORCIENTO DE DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD CON RESPECTO AL CONTROL.

** PORCIENTO DE ACTIVIDAD DE LA CAT CON RESPECTO AL CONTROL.

TABLA IV

**ACTIVIDAD DE LA GAD Y DE LA CAT EN EL HOMOGENADO
DE CEREBRO DE RATAS LONG-EVANS HIPOTIROIDEAS DE
38 DIAS DE EDAD.**

	GAD	CAT
CONTROLES	53.37 ± 0.7 (3)	390.0 ± 12 (4)
TRATADAS	52.39 ± 0.8 (3)	380.0 ± 13 (5)

**LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ESTA EXPRESADA COMO nMOLES/HORA/mg
DE PROTEINA PARA LA GAD Y pMOLES/MIN./mg DE PROTEINA PARA LA
CAT.**

**± ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO DEL NUMERO DE EXPERIMENTOS POR
TRIPLICADO INDICADO EN EL PARENTESIS.**

DISCUSION

Para tratar de apoyar la idea de que el GABA y la Ach pudieran actuar como transmisores aferentes y eferentes, respectivamente, en este trabajo se utilizaron laberintos aislados del oído interno de la rata a los que se les determinaron la actividad de GAD y CAT para establecer si estas enzimas, que sintetizan GABA y acetilcolina, estaban presentes en el vestíbulo.

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo, es evidente que existe actividad de ambas enzimas en homogenados totales del vestíbulo de la rata, lo que podría indicar que las sustancias que sintetizan podrían estar actuando como neurotransmisores en el vestíbulo de la rata.

El tipo de experimentos descritos anteriormente no nos permite señalar a la población celular en la que están localizadas estas actividades enzimáticas. Para tratar de averiguar la ubicación celular de la GAD y de la CAT, se efectuaron una serie de experimentos similares a ciertos experimentos descritos en la literatura en los que, al administrar propiltiouracilo a ratas preñadas, se observaba que en la progenie se retardaba el desarrollo del epitelio sensorial especialmente la maduración de los contactos sinápticos.

Cuando se administró el PTU desde el día 17 del desarrollo a ratas preñadas, se observó que la progenie presentaba las características generales de los animales hipotiroideos como al teración del aumento del peso corporal, además, presentaban daño vestibular medido por la prueba del nistagmus ro-

tacional. En esta prueba, los animales presentaban un aumento en el número de movimientos nistágmicos.

Al medir la actividad de la GAD y de la CAT en homogenados de vestíbulos de ratas cuyas madres habían sido tratadas con -- PTU (animales hipotiroideos), se encontró una marcada disminución de la actividad de la CAT, mientras que la actividad de la GAD no se modificaba, ni en las ratas de 38 días de edad ni en las de 50 días.

Este efecto parece ser atribuible solamente al tratamiento ya que ninguna de las dos enzimas incrementa su valor más allá de los 38 días de edad, a pesar de que al determinarlas en el desarrollo se observó que su actividad no es simétrica con respecto a éste.

Al realizar la terapia de reemplazo hormonal, administrando tiroxina simultáneamente a ratas tratadas con PTU, se comprobó que la actividad de la CAT no sufría una notable modificación comparando con los animales hipotiroideos, y al igual que con el tratamiento en que sólo se administrara PTU, la GAD no sufrió ninguna alteración en su actividad. Esto quería decir que al parecer en los animales hipotiroideos, en los cuales otros autores habían demostrado un retardo en la maduración de las terminales sinápticas, la única enzima que sufre modificación es la CAT, y aunque ese estudio no indica claramente que eran las eferentes las alteradas, comparando con lo que sucede con la coclea, en la que la llegada de estas terminales al epitelio sensorial son las esencialmente retardadas, al parecer esto mismo sucede en el vestíbulo. Esta interpretación parece además,

estar apoyada por los experimentos realizados durante el desarrollo, ya que la actividad de la GAD y de la CAT parecen tener un desarrollo asimétrico como el que ya ha sido descrito para el pollo y para el cuy (54), (55) en cuyos vestíbulos se observó que la actividad de la CAT aparece muy tardíamente coincidiendo con el desarrollo de las terminales eferentes que contactan a la célula pilosa tipo I que al parecer es de tardía madurez en el epitelio sensorial.

Este efecto, además parece ser específico para el oído ya que al medir la actividad de la GAD y de la CAT en el cerebro de los animales tratados con PTU, no se encontró ninguna modificación.

CONCLUSIONES

- 1.- Las actividades de la GAD y de la CAT están presentes en homogenizados de vestíbulo de ratas Long-Evans, lo que apoya la postulación del GABA y la Acetilcolina como neurotransmisores a ese nivel.
- 2.- Después del tratamiento con PTU, tanto a su progenitora como a los propios animales, la actividad de la CAT disminuye y la actividad de la GAD no se modifica, por tanto, puede decirse que la GAD está localizada en una estirpe celular del epitelio sensorial que no se altera con el PTU y que pudieran ser las células sensoriales, mientras que la CAT se encuentra en una población celular que sufre un daño por la administración de este fármaco, probablemente en las terminales sinápticas de origen eferente.
- 3.- La depresión de la actividad de la CAT causada por el PTU en el vestíbulo de la rata, se ve modificada en animales hipotiroideos a los que se ha administrado la tiroxina (T_4), en períodos críticos de su desarrollo.
- 4.- El efecto deletéreo de la administración de PTU parece ser específico para el oído interno ya que no altera la actividad ni de la GAD ni de la CAT en el cerebro.
- 5.- Estos hallazgos apoyan la participación del GABA y la ace-

tilcolina como neurotransmisores, aferente y eferente, respectivamente, en el vestíbulo de la rata.

APENDICE

CALCULOS DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN nMOLES/HORA/mg DE PROTEINA:

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

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

$$x \text{ ----- } 0.09 \text{ ml}$$

$$x = 900 \text{ nM en } 0.09 \text{ ml de la mezcla de reacción.}$$

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

$$1 \mu\text{Ci} \text{ ----- } 2.22 \times 10^5 \text{ DPM}$$

$$0.48 \mu\text{C.} \text{ ----- } x$$

$$x = 1056000 \text{ DPM}$$

(0.48 μ Ci es lo que ponemos en la mezcla de reacción).

$$1056000 \text{ DPM} \text{ ----- } 900 \text{ nM}$$

$$x \text{ ----- } 1 \text{ nM}$$

$$x = 1173.33 \text{ DPM en } 1 \text{ mol}$$

Es decir 1173.33 DPM/nmol de L-glutamato

Para obtener los DPM de las cuentas por minuto (CPM) (CPM-problema - CPM blanco), la eficiencia del sistema es del 63.3%

$$\text{CPM} \text{ ----- } 63.3 \%$$

$$x \text{ ----- } 100 \%$$

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

Las nmoles del ácido glutámico que se descarboxila se obtienen:

$$\frac{\text{DPM de las CPM}}{1173.33 \text{ DPM/nmol}} = \text{nmoles}$$

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

nmoles de ácido L-glutámico x 3 = nmoles/hr
 y esto se divide entre los miligramos de proteína en 0.06 ml, es decir, lo que se pone del homogenado en la reacción:

$$\frac{\text{nMoles/hr}}{\text{mg de proteína}} = \text{nmoles/hr/mg de proteína}$$

CALCULOS PARA OBTENER LA ACTIVIDAD DE LA CAT EN NMOLES/---MINUTO/mg DE PROTEINA.

Se tiene una concentración de acetil-CoA fría = 0.6 mM en 1000 ml, 600 µmoles en 1000 ml, en 0.05 que se pone en la mezcla de reacción:

$$\begin{array}{r} 600 \mu\text{moles} \text{ ----} 1000 \text{ ml} \\ \times \quad \quad \quad \text{----} 0.05 \text{ ml} \\ \hline x = 0.03 \mu\text{moles en } 0.186 \text{ ml de la mezcla de} \\ \text{reacción.} \end{array}$$

Para obtener la cantidad de µCi por tubito:

$$\begin{array}{r} 50 \mu\text{Ci} \text{ ----} 0.5 \text{ ml} \\ \times \quad \quad \quad \text{----} 0.02 \text{ ml} \\ \hline x = 2 \mu\text{Ci} \end{array}$$

2 μ Ci ----- 1 ml (acetil-CoA frfa 0.6nM +
0.02ml acetil-CoA*)
x ----- 0.05 ml (es lo que se pone de
la mezcla radiactiva)

$$x = 0.1 \mu\text{Ci}$$

Para obtener las desintegraciones por minuto DPM

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

$$0.1 \mu\text{Ci} \text{ ----- } x$$

$$x = 222000 \text{ DPM}$$

$$222000 \text{ DPM} \text{ ----- } 0.03 \mu\text{moles}$$

$$x \text{ ----- } 1.0 \mu\text{moles}$$

$$x = 7\,400\,000 \text{ DPM en } 1 \mu\text{mol}$$

por lo que en una nmol tendremos 7400 DPM.

Se tienen pues 7400 DPM/nmol de acetilCoA

Para obtener los DPM de las cuentas por minuto (CPM) (CPM--
problema-CPMblanco), la eficiencia del sistema es de 63.3%

$$\text{CPM} \text{ ----- } 63.3 \%$$

$$x \text{ ----- } 100 \%$$

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

Los nmoles de la acetil CoA que se desacetila se obtienen
de la siguiente manera:

$$\frac{\text{DPM de las CPM}}{7400 \text{ DPM}} = \text{nmoles}$$

$$7400 \text{ DPM}$$

Ya que se tienen calculadas las nmoles de acetil-CoA, como
se reporta por minuto y como se incubaba por 15 minutos, se divi-
de entre 15:

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

Esto se divide entre los mg de proteína en 0.136 ml, es -
decir lo que se pone de homogenado en la reacción:

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

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Murray, B.L. (1974) Sistema auditivo y sistema vestibular - en Sistema Nervioso Humano. pp. 271-290. Ed.Harla, S.A. de C.V. Méx.
- 2.- Hudspeth, A.J. (1983). The Hair Cells of the Inner Ear. - Scientific American 247: 42-54.
- 3.- Parker, D.E. (1981). The Vestibular Apparatus. Scientific - American 243: 48-111.
- 4.- Novick R. y Demares R.S. (1984). El Sistema Nervioso Humano Mac. -Graw Hill, México.
- 5.- Engstrom H. and Engstrom, B. (1981). The structure of vestibular sensory epithelia in the vestibular system: function and morphology (Torquato Gualtierotti ed.) Pp 3-33. Springer verlag New York, Heidelberg, Berlin.
- 6.- Netter, F.H. (1983). Nervous System. Part 1. Anatomy and Physiology. The CIBA Collection of Medical Illustrations .
- 7.- Meza, G. Cáraz, A. and Ruiz M. (1982) "GABA synthesis in -- vestibular tissue of chick inner ear". Brain Res. 241: 157 -161.
- 8.- Cohen B. (1977). Stored neural activity, in the vestibular testing in aminoglycoside Ototoxicity (Lorner Murts and Hawkins and Hawkins Eds.). Little Brown. pp 89.
- 9.- Honrubia, V. and Birns J. (1981). Slow and Fast components of Nystagmus two systems with diferent characteristics in - Aminoglycoside Ototoxicity. (Lorner, Mats, Hawkins eds.) Little Brown Boston.
- 10.- Honrubia, V., Brasier. (1982). Nystagmus and Vertigo. Clinical approaches to the patient with dizziness. Academic -- Press.
- 11.- Hudspeth, A.J. (1983). Transduction and Tuning by vertebrate hair cells. Trends Neurosci. 6(9): 366-369.
- 12.- Bugger Sjoback, D. and Culley, R.L. (1979). Synaptic structures in the type II hair cell in the vestibular system of guinea pig. Acta Otolaryngol 88: 401-411.

- 13.-Engstrom H. (1958). On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol* 49: 109-118.
- 14.-Furukawa, T. and Ishii, Y. (1967). Neurophysiological studies on hearing in gold fish. *J. Neurophysiol* 30: 1977.
- 15.-Rossi, M.L., Valli, P. and Casella, C. (1977). Post-synaptic potential recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. *Brain Res.* 135: 67-75.
- 16.-Rossi, M.L., Prigiani, I., Valli, P., and Casella. (1980). Activation of the efferent system in the isolated frog labyrinth: effects on the afferent epsps and spike discharge -- recorded from single fibers of the posterior nerve. *Brain Res.* 185: 127-137.
- 17.-Wersall, J., Flock, A. and Lundquist, R.G. (1965). Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Cold Spring Harb. Symp quant Biol.* 30: 115-145.
- 18.-Wersall, J. and Bagger-Sjoberg, D. (1974). Morphology of vestibular sense organ. *Handbook of sensory physiology*, H.H. Kornhuber, Ed. Springer-Verlag, Heidelberg New York. Vol. 6 pp. 70-120.
- 19.-Werman, R. (1966). Criteria for identification of a central nervous system transmitter. A review comp. *Biochem. Physiol* 18: 745-766.
- 20.-Flock, A. and Lam, D. (1974). Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. *Nature.* 249: 142-144.
- 21.-Mesa G. (1984). Some characteristics of glutamic acid decarboxylase of chick inner ear. *J. Neurochemistry* Vol. 43 No. 3 634-639.
- 22.-Iturbe, A.G. and Mesa, G. (1985). Probable localisation of GABA and Ach synthesis in the vestibule of streptomycin treated guinea pigs. *Soc. Neurosci. Abst.* 11, 696.
- 23.-Mesa G. Hernández, C. and Ruiz M. (1981) ³H-GABA uptake in isolated vestibular cristae of chick inner ear. *Soc. Neurosci. Abstr.* (7): 147.

- 24.-Meza,G.and González-Viveros,T.and Ruiz M.(1985).Specific --
³H gamma aminobutyric acid binding to vestibular membranes
of the chick inner ear.Brain Research. 337:179-183.
- 25.-Felix and Ehrenberger.(1982). The action of putative neuro-
transmitter substance in the cat labyrinth. Acta Otolaryng.
93: 101-105.
- 26.-Flock. An ultrastructure and function in the lateral line
organs. In P. Cohen (eds). Lateral line detectors, Indiana
Univ. Bress.Bloomington,In 163-197.
- 27.-Ehrenberger,K.,Benko,E.and Felix,D.(1982). Suppressive ac-
tion of picrotoxin, a GABA antagonist, on labyrinthine spon-
taneous nystagmus and vertigo in man. Acta Otolaryngol. 13:
269-273.
- 28.-Meza G.and López I.,(1984).Possible cholinergic neurotrans-
mission in the cristae ampullares of the chick inner ear. -
Neuroscience letter 49: 93-98.
- 29.-Dohman,G.G.(1974). Histochemistry and metabolism of the --
Inner ear, Handbook of sensory Physiology: vestibular sys-
tem. Part.pp 185-212 (tornhuber,H.H. eds.). Springer verlag
Berlin Heidelberg.
- 30.-Iurato,S.,Luciano,L.,Pannese,E.and Reale,E.(1971).Histoche-
mical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity
in the inner ear. Acta Otolaring. supp 279:1-50.
- 31.-Meza,G.,López,I.and Fera-Velasco,A.(1985). Possible effe-
rent cholinergic neurotransmission in the inner ear of the
frog. Soc.Neurosci. Abstr. 11. 696.
- 32.-Bock,G.R. and Steel,K.P.(1984). Use of albino animals for -
auditory research.Hearing Research,13: 201-202.
- 33.-Stone,L.S.(1933).The development of the lateral line sense
organs in amphibians, observed in living and vital stained
preparations. J.Comp.Neural. 57:507-540.
- 34.-Tapia,R.and Meza,G.(1981).Propiedades bioquímicas de las si-
napsis GABAérgicas y colinérgicas, en temas selectos de fi-
siología celular (Bena,A.,Drucker,R.y Tapia,R. eds) pp 223-
240. UNAM, MEXICO,D.F.

- 35.-Hawkins, J.E., Preston, E.R. (1975). Vestibular ototoxicity in the vestibular system (R.F.Naunton Ed.) New York academic - pp. 321-349.
- 36.-Uziel, A., Rabie, A. and Marot, M. (1980). The effect of hypothyroidism on the onset of cochlear potentials in developing rats. Brain Research, 182: 172-175.
- 37.-Uziel, A., Pujol, R., Legrand, Ch. and Legrand, J. (1983). Cochlear synaptogenesis in the hypothyroid Rat. Brain Research. 7:-- 295-301.
- 38.-Goodman, Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 6ta. Edición. Ed. Panamericana 1982.
- 39.-Dememes D., Dechesne C., Legrand Ch. and Sans A. (1986). Effects of hypothyroidism on postnatal development in the peripheral vestibular system. Developmental Brain Research, - 25: 147-182.
- 40.-Williams Robert H. (1984). Tratado de Endocrinología. 6a. ed. Ed. Interamericana pp 186-259.
- 41.-Hébert, R. and Dussault, J.H. (1984). Permanent peripheral hearing system alteration following transient neonatal hyperthyroidism in rats. Brain Research, 14: 159-164.
- 42.-Granholm Ach. (1985). Effects of Thyroid hormones deficiency on glial constituents in developing cerebellum of the rat. Exp. Brain Res. 59: 451-456.
- 43.-Hoovler, Dennis W. Bang H. (1985). Effects of triiodothyronine and PTU on regeneration of catecholaminergic nerve terminals in the paraventricular hypothalamic Nucleus of the --- Adult Rats. Experimental Neurology 89.
- 44.-Moliniengo Luigi, Cassone Chiara and Oggero Livio. (1986) Action of hypo and hyperthyroidism on the post mortal decay - of acetylcholine in the rat spinal cord. Neuroendocrinology 42: 28-31.
- 45.-Entrikin R. and Larson D. (1985). Avian muscular dystrophy serum thyroid defect and limited improvement with Methimazole and Propylthiouracil. Experimental Neurology 87, 318.
- 46.-Atterwill C.K., Atkinson D.J., Bermudez I. and Balazs R. ---

- (1985). Effect of thyroid hormone and serum on the development of Na^+ , K^+ adenosin triphosphatase and associated ion fluxes in cultives from rat Brain. *Neurosci.* Vol.14.No.1.
- 47.-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. *Brain Research*, 19: 111-122.
- 48.-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. *Brain Research*, 19: 123-127.
- 49.-Favre D., Demames D., and Sans A. (1986). Microtubule organization and synaptogenesis in the vestibular sensory cells. *Developmental Brain Research*, 25: 137-142.
- 50.-Wayne-Brady (1959). The distribution of glutamic decarboxylase in the nervous system of the Rhesus Monkey. *J. Biol. Chem*, 234 No. 4. pp 926-928.
- 51.-Fonnum, F. (1975). Radiochemical assay for choline acetyltransferase. In *Research Methods in Neurochemistry*. (Mark, N. and Rodnight, eds). Plenum Press.
- 52.-Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24: 407-409.
- 53.-Lowry, O.H., Rosebroug, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) - Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol-Chem* 193: 265-275.
- 54.-Iturbe, A.G. and Mesa G. (1986). Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. - *Int. J. Develop. Neurosci.* 4(supp 4) 532.
- 55.-Mesa G. and Hinojosa R. (1986). Ontogenetic approach to the cellular localization of neurotransmitter in the chick vestibule. *Int. J. Dvelop. Neurosci.* 4(supp), 517.
- 56.-Meisami Esmail. Complete recovery of growth deficits after reversal of PTU-induced postnatal hypothyroidism in the female rat. A model for catch-up growth. *Life Sciences*. Vol. 34: 1487-1496.